



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

NANOFIBRAS CONTENDO COMPOSTOS DE MICROALGAS COMO INDICADORES
DE pH PARA O MONITORAMENTO DA QUALIDADE DOS ALIMENTOS

SUELEN GOETTEMS KUNTZLER

PROF^a. DR^a. MICHELE GREQUE DE MORAIS

Orientadora

PROF^a. DR^a. ANA PAULA DUTRA RESEM BRIZIO

Coorientadora

RIO GRANDE, RS

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

NANOFIBRAS CONTENDO COMPOSTOS DE MICROALGAS COMO INDICADORES
DE pH PARA O MONITORAMENTO DA QUALIDADE DOS ALIMENTOS

SUELEN GOETTEMS KUNTZLER

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título
de mestre/doutor em Engenharia e
Ciência de Alimentos.

PROF^a. DR^a. MICHELE GREQUE DE MORAIS

Orientadora

PROF^a. DR^a. ANA PAULA DUTRA RESEM BRIZIO

Coorientadora

RIO GRANDE, RS

2021

Ficha Catalográfica

K96n Kuntzler, Suelen Goettems.
Nanofibras contendo compostos de microalgas como indicadores de pH para o monitoramento da qualidade dos alimentos / Suelen Goettems Kuntzler. – 2021.
150 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2021.

Orientadora: Dra. Michele Greque de Moraes.

Coorientadora: Dra. Ana Paula Dutra Resem Brizio.

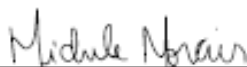
1. Clorofila 2. *Electrospinning* 3. Ficocianina 4. Indicador de pH
5. Nanotecnologia 6. Segurança Alimentar I. Moraes, Michele Greque de II. Brizio, Ana Paula Dutra Resem III. Título.

CDU 664:639.64

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

APROVAÇÃO

Tese defendida por Suelen Goettens Kuntzler, com orientação da Profa. Dra. Michele Greque de Moraes, aprovada em 14 de julho de 2021, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:



Profa. Dra. Michele Greque de Moraes – FURG



Profa. Dra. Vilásia Guimarães Martins – FURG



Profa. Dra. Ana Priscila Centeno da Rosa – FURG



Profa. Dra. Luciane Maria Colla - UPF

Dedico esta tese a minha família, pela compreensão da minha ausência e apoio em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar força e coragem para enfrentar os desafios e por sempre me guiar na
minha jornada

Aos meus pais, Gilberto e Ingrid, que são meus exemplos e que sinto muito orgulho da
trajetória profissional e da superação em momentos difíceis. Vocês são meus maiores
incentivadores por eu ter chegado até aqui, obrigada pelo amor incondicional e por sempre
acreditarem em mim

A minha irmã Helen e a minha sobrinha Antonella por me recepcionarem com muita alegria e
amor todas às vezes que cheguei em casa, por compreender minha ausência e pelo incentivo
que me deram forças para continuar

Ao meu namorado, Guilherme, por tolerar minha ausência e pela paciência em todas as horas
de crises e desesperos. Agradeço também por acreditar em mim, pelo incentivo, conselhos e
apoio em todas minhas decisões, pelo amor e cumplicidade

A minha querida e sempre presente orientadora, professora Michele Moraes, pelo incentivo e
apoio em minhas decisões, pela disponibilidade mesmo em período de férias para resolver
problemas, correções e sugestões para melhorar o trabalho, pela dedicação e confiança no
meu trabalho e pelas oportunidades de continuar crescendo profissionalmente

A minha coorientadora, professora Ana Paula Brizio, por compartilhar seus conhecimentos,
pelo apoio e disponibilidade no desenvolvimento deste trabalho

Ao professor Jorge Alberto Vieira Costa, que foi o grande idealizador do curso de graduação
em Engenharia Bioquímica o qual fiz parte da primeira turma na FURG, por me proporcionar
grandes experiências e oportunidades de crescimento profissional e por abrir as portas do LEB
para desenvolvimento do meu trabalho

Ao iniciante científico, Guilherme Saraçol, pelo apoio na execução desse estudo, pela
dedicação e responsabilidade, mesmo em períodos de provas e trabalhos

Aos amigos e colegas do LEB e MiBi, pelas sugestões e ideias para melhorar meu trabalho,
pelo auxílio nas dúvidas e correções, por momentos de alegria, boas risadas e conversas
principalmente no café!

As minhas amigas Bruna Cardias e Priscila Muniz que estão presentes nos momentos mais importante da minha vida e sempre com uma palavra, solução ou conselho que me deram forças para continuar. Pela companhia de conversa durante horas na estrada até a região noroeste e pela parceria de praia. Vocês são minhas irmãs de alma!

Aos meus amigos do MiBi em especial: Cleber, Bruna Vargas, Adriano por estarem sempre presente nas horas mais difíceis da minha vida, pelo apoio, bons momentos de diversão, pelos conselhos, pela parceria dentro e fora do ambiente de trabalho

Aos técnicos Adriano e Roque, pela disposição e ajuda na solução de problemas

Ao corpo docente, coordenação e administração da PPGECA que através de seus conhecimentos e boa vontade contribuíram para minha formação

A CAPES, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho

A FURG, que foi minha segunda casa durante esses 11 anos, onde tive a oportunidade de conhecer pessoas incríveis e ter as melhores experiências profissionais. Agradeço pela ótima infraestrutura para desenvolver este trabalho, tenho muito orgulho de fazer parte dessa universidade!

MUITO OBRIGADA!

“O Senhor é meu Pastor e nada me faltará.”
Salmo 23:1

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Polímeros e parâmetros do processo para produção de nanofibras em embalagens de alimentos.....	38
Tabela 2 – Indicadores colorimétricos a base de nanofibras para monitoramento do frescor de alimentos.....	45

ARTIO I

Tabela 1 – Imagens, distribuição do diâmetro (nm) e diâmetro médio (Dm, nm) das nanofibras produzidas com 8% PLA/4% PEO (m v ⁻¹) na proporção 6:4 de PLA:PEO com e sem biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 (Sp).	59
Tabela 2 - Temperatura de fusão (T _f), entalpia (H), temperatura inicial de degradação (T _{id}), temperatura final de degradação (T _{fd}) e temperatura de máxima degradação (T _{md}) da biomassa <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 (Sp), dos polímeros e nanofibras de 8% PLA/4% PEO na proporção 6:4 com e sem a biomassa.	60

ARTIGO II

Tabela 1 – Composição de biomassa e extrato microalgal com ficocianina nas soluções poliméricas contendo 8% (m v ⁻¹) de PLA e 4% (m v ⁻¹) de PEO para produção de nanofibras indicadoras de pH.	81
Tabela 2 – Aparência da cor do indicador de 3% (m v ⁻¹) de extrato de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 e 1% (m v ⁻¹) de ficocianina durante o armazenamento em diferentes pH.....	94

ARTIGO III

Tabela 1 – Especificações dos indicadores a base de nanofibras de PLA/PEO contendo 2% (m v ⁻¹) de biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 (a), 3% (v v ⁻¹) de extrato de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 e 1% (m v ⁻¹) de ficocianina (b).	113
Tabela 2 – Monitoramento da deterioração de filé de frango com os indicadores de pH contendo 2% (m v ⁻¹) de biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 (a), 3% (v v ⁻¹) de extrato de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 e 1% (m v ⁻¹) de ficocianina (b).....	115
Tabela 3 – Monitoramento da deterioração de filé de pescado com os indicadores de pH contendo 2% (m v ⁻¹) de biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 (a), 3% (v v ⁻¹) de extrato de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 e 1% (m v ⁻¹) de ficocianina (b).....	117

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 - Diagrama esquemático da produção de nanofibras contendo biomassa microalgal por *electrospinning*.42

ARTIGO I

Figura 1 – Solução tampão (pH 1-10) com biomassa microalgal para observar a alteração de cor.57

Figura 2 - Espectros FTIR da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (a), polímeros PEO (b) e PLA (c), nanofibras de 8% PLA/4% PEO na proporção 6:4 (d) com 1% (e), 2% (f) e 3% (m v⁻¹) de biomassa (g).61

Figura 3 – Molhabilidade da superfície das nanofibras produzidas com a) 8% PLA, b) 8% PLA/4% PEO na proporção 6:4 com c) 1%, d) 2% e e) 3% (m v⁻¹) de biomassa.....62

Figura 4 – Variação de cor dos indicadores compostos de nanofibras de 8% PLA/4% PEO na proporção 6:4 e biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (Sp) com 36,5±1,0 (a), 99,0±7,7 (b) e 165,0±4,5 µm (c) de espessura testadas em diferentes valores de pH.64

Figura 5 - ΔE em relação ao pH das nanofibras compostas de 8% PLA/4% PEO na proporção 6:4 e biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (1 (●), 2 (□) e 3 (▲) % m v⁻¹) com espessuras de 36,5±1,0 (a), 99,0±7,7 (b) e 165,0±4,5 µm (c).66

Figura 6 – Resposta de cor em função do pH (1-10) para diferentes tempos (1, 2, 3 e 4 h) dos indicadores com espessura de 99,0±7,7 µm e compostos de nanofibras de 8% PLA/4% PEO na proporção 6:4 com 1% (a), 2% (b) e 3% (m v⁻¹) (c) de biomassa.67

ARTIGO II

Figura 1 – Espectro UV-Vis e coloração das soluções de extratos de microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 (a), *Chlorella fusca* LEB 111 (b) e ficocianina (c) expostas em pH de 1 a 10.84

Figura 2 – ΔE dos indicadores de PLA/PEO com 4 e 5% (m v⁻¹) de biomassa *Spirulina* sp. LEB 18 (a); 2% (m v⁻¹) de biomassa *Spirulina* sp. LEB 18 + 1, 2 ou 3% (m v⁻¹) de ficocianina (b); 3% (m v⁻¹) de extrato de *Spirulina* sp. LEB 18 (Sp), 3% (m v⁻¹) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 (Ch), 3% (m v⁻¹) de extrato *Spirulina* sp. LEB 18 + 1% (m v⁻¹) de ficocianina, 3% (m v⁻¹) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 + 1% (m v⁻¹) de ficocianina (c).87

Figura 3 – Nanofibras de PLA/PEO com 5% (m v⁻¹) de biomassa *Spirulina* sp. LEB 18 (a), 2% (m v⁻¹) de biomassa *Spirulina* sp. LEB 18 + 3% (m v⁻¹) de ficocianina (b), 3% (m v⁻¹) de extrato de *Spirulina* sp. LEB 18 (c), 3% (m v⁻¹) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 (d), 3% (m v⁻¹) de extrato *Spirulina* sp. LEB 18 + 1% (m v⁻¹) de ficocianina (e) e 3% (m v⁻¹) de extrato *Chlorella fusca* LEB 111 + 1% (m v⁻¹) de ficocianina (f).89

Figura 4 – Distribuição do diâmetro das nanofibras de PLA/PEO com 5% (m v⁻¹) de biomassa *Spirulina* sp. LEB 18 (a), 2% (m v⁻¹) de biomassa *Spirulina* sp. LEB 18 + 3% (m v⁻¹) de ficocianina (b), 3% (m v⁻¹) de extrato de *Spirulina* sp. LEB 18 (c), 3% (m v⁻¹) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 (d), 3% (m v⁻¹) de extrato *Spirulina* sp. LEB 18 + 1% (m v⁻¹) de ficocianina (e) e 3% (m v⁻¹) de extrato *Chlorella fusca* LEB 111 + 1% (m v⁻¹) de ficocianina (f).90

Figura 5 – Cromaticidade das nanofibras de PLA/PEO com 5% (m v⁻¹) de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (a), 2% (m v⁻¹) de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 + 3% (m v⁻¹) de ficocianina, 3% (m v⁻¹) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 (b), (c) e 3% (m v⁻¹) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 + 1% (m v⁻¹) de ficocianina (d).91

Figura 6 – Estabilidade cor dos indicadores de 3% (m v⁻¹) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 e 1% (m v⁻¹) de ficocianina temperatura de congelamento (-16 °C), refrigeração (4 °C) e ambiente (25 °C) no pH 7. 93

ARTIGO III

Figura 1 – Indicador (a) e superfície das nanofibras (c) de PLA/PEO contendo 2% (m v⁻¹) de biomassa *Spirulina* sp. LEB 18 e indicador (b) e seção transversal das nanofibras de PLA/PEO contendo 3% (v v⁻¹) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 com 1% (m v⁻¹) de ficocianina (d). 109

Figura 2 - Espectros FTIR de PLA (a), PEO (b), biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (c), extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 (d), ficocianina (e), nanofibras de PLA/PEO (f) contendo 2% (m v⁻¹) de biomassa *Spirulina* sp. LEB 18 (g) e 3% (v v⁻¹) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 com 1% (m v⁻¹) de ficocianina (h)..... 110

Figura 3 – Difractogramas DRX de PLA (a), PEO (b), biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (c), extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 (d), ficocianina (e), nanofibras de PLA/PEO (f), contendo 2% (m v⁻¹) de biomassa *Spirulina* sp. LEB 18 (g) e 3% (v v⁻¹) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 com 1% (m v⁻¹) de ficocianina (h)..... 111

LISTA DE NOMENCLATURAS

Ch	<i>Chlorella fusca</i> LEB 111
Dm	Diâmetro médio
DRX	Difração de raios-X
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
H	Entalpia
PE	Potencial elétrico
PEO	Poli(óxido de etileno)
PLA	Poli(ácido láctico)
PVA	Permeabilidade ao vapor de água
Sp	<i>Spirulina</i> sp. LEB 18
TA	Taxa de alimentação
T _{fd}	Temperatura final de degradação
T _{fusão}	Temperatura de fusão
TGA	Análise termogravimétrica
T _{id}	Temperatura inicial de degradação
T _m	Temperatura de máxima degradação
ΔE	Diferença total de cor

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	22
RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	25
1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL.....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
CAPÍTULO II.....	30
3 REVISÃO DA LITERATURA	31
3.1 SISTEMAS INTELIGENTES EM EMBALAGENS DE ALIMENTOS.....	31
3.1.1 Indicador de pH.....	31
3.1.2 Indicador de tempo-temperatura.....	31
3.1.3 Indicador de frescor	32
3.1.4 Sensor de gases.....	33
3.2 POTENCIAL APLICAÇÃO DE MICROALGAS COMO CORANTES NATURAIS	34
3.2.1 <i>Chlorella</i>	35
3.2.2 <i>Spirulina</i>	36
3.3 INDICADORES INTELIGENTES BASEADOS NANOFIBRAS POLIMÉRICAS	37
3.3.1 Processo do <i>electrospinning</i>	39
3.3.1.1 Propriedades da solução polimérica	40
3.3.1.2 Parâmetros do processo	41
3.3.1.3 Condições ambientais	43
3.4 APLICAÇÃO DAS NANOFIBRAS COMO INDICADORES INTELIGENTES	44
3.5 HISTÓRIO DA LINHA DE PESQUISA EM ENGENHARIA DE NANOFIBRAS.....	44
CAPÍTULO III	47
4 DESENVOLVIMENTO DA TESE.....	48
ARTIGO I INDICADOR COLORIMÉTRICO DE PH DESENVOLVIDO A PARTIR DE NANOFIBRAS CONTENDO BIOMASSA DE <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.....	49
RESUMO.....	51
1 INTRODUÇÃO	51
2 MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1 POLÍMEROS E BIOMASSA MICROALGAL.....	53
2.2 PREPARO DA BIOMASSA E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE MUDANÇA DE COR.....	53
2.3 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS.....	54
2.3.1 Soluções poliméricas e processo de <i>electrospinning</i>	54
2.3.2 Morfologia das nanofibras.....	54
2.3.3 Viscosidade das soluções poliméricas	54
2.3.4 Análises térmicas da nanofibras.....	54
2.3.5 Caracterização estrutural das nanofibras.....	55

2.3.6 Molhabilidade das nanofibras.....	55
2.4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE COR DOS INDICADORES DE pH.....	55
2.4.1 Medidas de resposta colorimétrica.....	55
2.4.2 Espessura	56
2.4.3 Estabilidade da cor no tempo.....	56
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
3.1 AVALIAÇÃO DA MUDANÇA DE COR DA BIOMASSA MICROALGAL.....	57
3.2 PRODUÇÃO DAS NANOFIBRAS DE PLA/PEO/BIOMASSA MICROALGAL E VISCOSIDADE DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS.....	58
3.3 PROPRIEDADES TÉRMICAS E ESPECTROSCOPIA FTIR	60
3.4 MOLHABILIDADE DAS NANOFIBRAS.....	62
3.5 ANÁLISE DE RESPOSTA DAS CORES DOS INDICADORES DE pH.....	63
4 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ARTIGO II EXTRATOS DE MICROALGAS E FICOCIANINA ADICIONADOS AS NANOFIBRAS: AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA COR PARA POTENCIAL APLICAÇÃO EM EMBALAGENS INTELIGENTES	75
RESUMO	77
1 INTRODUÇÃO.....	77
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	79
2.1 MATERIAL	79
2.2 OBTENÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL	79
2.3 PREPARO DA BIOMASSA E DOS EXTRATOS DE MICROALGAS	79
2.4 ALTERAÇÃO DE COR DA FICOCIANINA E DOS EXTRATOS DE MICROALGAS.....	80
2.5 SOLUÇÕES POLIMÉRICAS E PROCESSO DE <i>ELECTROSPINNING</i>	80
2.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS NANOFIBRAS	80
2.7 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	81
2.8 AVALIAÇÃO DOS INDICADORES DE pH.....	81
2.8.1 Propriedades da cor	81
2.8.2 Estabilidade da cor em função do tempo e temperatura.....	82
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
3.1 INTERAÇÃO DOS EXTRATOS DE MICROALGAS E FICOCIANINA EM DIFERENTES SOLUÇÕES DE pH.....	83
3.2 DIFERENÇA TOTAL DE COR DOS INDICADORES EM RELAÇÃO AO PH.....	85
3.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS NANOFIBRAS	88
3.4 CROMATICIDADE DOS INDICADORES DE pH.....	90
3.5 ESTABILIDADE DA COR DOS INDICADORES DE pH	92
4 CONCLUSÃO	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
ARTIGO III MONITORAMENTO DA QUALIDADE DA CARNE DE FRANGO E PESCADO UTILIZANDO INDICADORES COLORIMÉTRICOS DE pH.....	101
RESUMO	103
1 INTRODUÇÃO.....	103
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	105
2.1 POLÍMEROS E MICROALGAS	105
2.2 PREPARO DOS INDICADORES DE pH	105
2.2.1 Soluções poliméricas	105

2.2.2 Processo de <i>electrospinning</i>	105
2.3 Caracterização estrutural dos indicadores de pH	105
2.4 PROPIEDADES FÍSICAS DOS INDICADORES DE pH	106
2.4.1 Espessura.....	106
2.4.2 Capacidade de intumescimento.....	106
2.4.3 Solubilidade em água	106
2.4.4 Permeabilidade ao vapor d'água	107
2.4.5 Absorção de umidade.....	107
2.5 APLICAÇÃO DO INDICADOR DE PH PARA MONITORAMENTO DO FRESCOR DA CARNE DE FRANGO E PESCADO	107
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	108
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	108
3.1 NANOESTRUTURAS DOS INDICADORES.....	108
3.2 INTERAÇÕES MOLECULARES E CRISTALINIDADE.....	109
3.3 EFEITO DOS COMPOSTOS MICROALGAIS NAS PROPRIEDADES FÍSICAS DOS INDICADORES DE pH.....	112
3.4 APLICAÇÃO DOS INDICADORES DE pH.....	114
4 CONCLUSÃO.....	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
 CAPÍTULO IV.....	 124
 5 CONCLUSÃO GERAL	 125
 CAPÍTULO V	 126
 RESÍDUOS GERADOS E DESTINO	 127
SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	127
 CAPÍTULO V	 128
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 129
ANEXOS	150

CAPÍTULO I

RESUMO

A proliferação microbiana e as modificações bioquímicas em produtos perecíveis resultam na produção de substâncias que alteram as propriedades físico-químicas dos alimentos, incluindo o pH. Assim, a integração de indicadores colorimétricos em embalagens de alimentos é alternativa para monitorar a qualidade dos produtos, emitindo sinal visual em resposta a deterioração em tempo real. As microalgas *Spirulina* e *Chlorella* são importantes fontes de pigmentos naturais suscetíveis as alterações de cor em soluções ácidas/alcalinas. As nanofibras poliméricas produzidas por *electrospinning* são materiais promissores para o encapsulamento das biomassas microalgais. Essas nanoestruturas apresentam alta área superficial e elevada porosidade que permite a aplicação como indicadores inteligentes. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi desenvolver indicador de pH utilizando biomassa e compostos de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 incorporados em nanofibras poliméricas, para o monitoramento da qualidade de carnes. A biomassa de *Spirulina* LEB 18, *Chlorella fusca* LEB 111 e ficocianina foram avaliadas quanto a mudança de cor em soluções com variação de pH de 1 a 10. As concentrações dos polímeros poli(ácido láctico) (PLA) e óxido de polietileno (PEO) e as condições do processo de *electrospinning* foram estudadas para o desenvolvimento de nanofibras uniformes. As análises de morfologia, interações moleculares e estruturais, e caracterizações termogravimétricas foram realizadas nas nanofibras com e sem os compostos microalgais. A estabilidade da cor em função do pH (1-10) durante o armazenamento foi avaliada nas nanofibras contendo os compostos microalgais. Além disso, as propriedades físicas dos indicadores e o monitoramento do frescor da carne de frango e pescado foram realizados neste estudo. As nanofibras foram produzidas com 8% de PLA e 4% (m v^{-1}) de PEO sob condições de processo de 15 kV de potencial elétrico, 120 mm de distância do capilar ao coletor e $600 \mu\text{L h}^{-1}$ de taxa de alimentação. O diâmetro médio das nanofibras de PLA/PEO foi $728 \pm 121 \text{ nm}$, com características hidrofílicas e temperatura máxima de degradação de $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Os indicadores com espessura de $36,5 \pm 1,0 \mu\text{m}$ contendo 2% (m v^{-1}) de biomassa de *Spirulina* LEB 18 quando submetidos as variações de pH, resultaram em valores $\Delta E > 12$ indicando diferença absoluta na cor. Além disso, na análise de estabilidade da cor observou-se o aumento da capacidade colorimétrica dos indicadores durante 4 h. O indicador contendo 3% (m v^{-1}) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 e 1% (m v^{-1}) de ficocianina não apresentou perda da capacidade colorimétrica após 9 meses de armazenamento e mostrou estabilidade da cor em temperaturas de -16 e $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A espectroscopia do infravermelho confirmou a encapsulação dos compostos microalgais nas nanofibras e a difração de raios-X verificou a estrutura amorfa dos materiais. Além disso, os indicadores contendo os compostos microalgais apresentaram baixa permeabilidade ao vapor de água que variou de $2,55 \pm 0,17$ a $3,37 \pm 0,04 \times 10^{-11} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$. O indicador contendo extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 com ficocianina alterou a cor verde para azul em pH $6,0 \pm 0,1$ para $6,5 \pm 0,3$ nos filés de frango e $5,9 \pm 0,1$ para $6,8 \pm 0,2$ nos filés de pescado durante 24 h a temperatura ambiente. Portanto, esse estudo apresenta alternativa inovadora na utilização de compostos microalgais encapsulados em nanofibras poliméricas para desenvolvimento de embalagem inteligente. O indicador de pH mostrou capacidade de monitorar e informar ao consumidor a qualidade dos alimentos frescos.

Palavras-chave: Clorofila. *Electrospinning*. Ficocianina. Indicador de pH. Nanotecnologia. Segurança alimentar.

ABSTRACT

NANOFIBERS CONTAINING MICROALGAE COMPOUNDS FOR FOOD

QUALITY MONITORING

Microbial proliferation and biochemical modifications in perishable products result in the production of substances that alter the physicochemical properties of foods, including pH. Thus, the integration of colorimetric indicators in food packaging is an alternative to monitor the quality of products by emitting a visual signal in response to deterioration in real-time. *Spirulina* and *Chlorella* microalgae are important sources of natural pigments susceptible to color changes in acid/alkaline solutions. Polymeric nanofibers produced by electrospinning are promising materials for the encapsulation of microalgal biomasses. These nanostructures present high surface area and high porosity that allow the application as smart indicators. In this context, the objective of the work was to develop a pH indicator using *Spirulina* sp. LEB 18 and *Chlorella fusca* LEB 111 biomass and compounds incorporated in polymeric nanofibers, for meat quality monitoring. The biomass of *Spirulina* sp. LEB 18, *Chlorella fusca* LEB 111, and phycocyanin were evaluated for color change in solutions with pH ranges 1 to 10. The concentrations of the polymers poly(lactic acid) (PLA) and polyethylene oxide (PEO) and the conditions of the electrospinning process were studied for the development of uniform nanofibers. The analyses of morphology, molecular and structural interactions, thermogravimetric characterizations were performed on the nanofibers with and without the microalgal compounds. Color stability as a function of pH (1-10) during the storage were evaluated on the nanofibers containing the microalgal compounds. In addition, the physical properties of the indicators and freshness monitoring of chicken and fish meat were performed in this study. The nanofibers were produced with 8% PLA and 4% (m v⁻¹) PEO process conditions of 15 kV voltage, 120 mm the distance between spinneret tip and collector, and 600 $\mu\text{L h}^{-1}$ flow rate. The average diameter of PLA/PEO nanofibers was 728 ± 121 nm, with hydrophilic characteristics and a maximum degradation temperature of 300 °C. The indicators with a thickness of 36.5 ± 1.0 μm containing 2% (m v⁻¹) *Spirulina* LEB 18 biomass when subjected to the pH variations, resulted in $\Delta E > 12$ values indicating an absolute difference in color. Furthermore, the color stability analysis was observed increase in color perception of the indicators for 4 h. The indicator containing 3% (m v⁻¹) *Chlorella fusca* LEB 111 extract and 1% (m v⁻¹) phycocyanin showed no loss of colorimetric capacity after 9 months of storage and showed color stability at temperatures of -16 and 4 °C. Infrared spectroscopy confirmed the encapsulation of the microalgal compounds in the nanofibers and X-ray diffraction verified the amorphous structure of the materials. Furthermore, the indicators containing the microalgal compounds showed low water vapor permeability that ranged from 2.55 ± 0.17 to $3.37 \pm 0.04 \times 10^{-11}$ $\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$. The indicator containing *Chlorella fusca* LEB 111 extract with phycocyanin reported a change color from green to blue at pH 6.0 ± 0.1 to 6.5 ± 0.3 of chicken fillets, and 5.9 ± 0.1 to 6.8 ± 0.2 of fish fillets during 24 h at room temperature. Therefore, this study presents an innovative alternative in using microalgal compounds encapsulated in polymeric nanofibers for smart packaging development. The pH indicator showed the ability to monitor and inform the consumer about the quality of fresh food.

Keywords: Chlorophyll. Electrospinning. Phycocyanin. pH indicator. Nanotechnology. Food Safety.

1 INTRODUÇÃO

As principais funções das embalagens tradicionais são conter e proteger os produtos das contaminações, sendo que, na maioria dos casos, o frescor dos alimentos não pode ser rastreado durante e após a entrega ao mercado (SINGH et al., 2021). As condições inadequadas de acondicionamento dos produtos perecíveis tornam estes suscetíveis a proliferação microbiana, que afeta as características sensoriais dos alimentos e a saúde dos consumidores (BEKHIT et al., 2021). Sistemas de embalagens inteligentes monitoram e informam a qualidade dos alimentos durante toda a cadeia de abastecimento alimentar (FANG et al., 2017; KUSWANDI, 2017; MÜLLER; SCHMID, 2019; POYATOS-RACIONERO et al., 2018). Esses sistemas são baseados em indicadores colorimétricos utilizados como parte integrante da embalagem ou rótulos e interagem de forma rápida com o alimento e o ambiente circundante (MOREIRA et al., 2020; WELLS; YUSUFU; MILLS, 2019; YUSUFU; WANG; MILLS, 2018).

Os indicadores colorimétricos de pH são compostos de suporte sólido e corantes que detectam as alterações no alimento devido ao crescimento de micro-organismos e as modificações bioquímicas (FANG et al., 2017). Os corantes naturais não apresentam efeitos tóxicos à saúde humana e não prejudicam o meio ambiente (WELLS; YUSUFU; MILLS, 2019). As microalgas *Spirulina* e *Chlorella* são fontes naturais de diversos compostos como carotenoides, ficocianina, clorofila e ácidos fenólicos com potencial aplicação na indústria alimentícia (VAZ et al., 2016). Além disso, esses micro-organismos apresentam certificação *Generally Recognized as Safe* (GRAS) emitido pelo *Food and Drug Administration* (FDA), que permite a aplicação na produção de alimentos funcionais, nutracêuticos e rações animais (MORAIS et al., 2015).

A ficocianina é um pigmento de cor azul encontrada na microalga *Spirulina*, considerada como complexo proteína-pigmento, é instável a temperaturas superiores a ambiente e soluções ácidas/alcalinas (ZHANG et al., 2021). A clorofila é responsável pela coloração verde brilhante nas microalgas que em condições ácidas transforma-se em feofitina, pela ocorrência da perda de íons de magnésio da estrutura da clorofila, resultando na alteração da cor para verde intenso ou castanho (GUNAWAN; BARRINGER, 2000; KOCA; KARADENIZ; BURDURLU, 2007; QU et al., 2020). Os carotenoides são suscetíveis a degradação em pH ácidos, o que resulta na modificação da intensidade da cor amarela (BOON et al., 2010). Desta forma, considerando a preferência do consumidor por produtos

naturais, as biomassas de microalgas *Spirulina* e *Chlorella* apresentam potencial para aplicação como indicadores colorimétricos de pH.

A incorporação dos compostos microalgais em nanofibras poliméricas é alternativa promissora no desenvolvimento de indicadores inteligentes. Essas nanoestruturas são produzidas por *electrospinning* e apresentam diâmetro em nanoescala, que proporciona maior área superficial em relação ao volume e elevada porosidade (MOHAMMADI; HOSSEINI; YOUSEFI, 2020). Essas propriedades aumentam a reatividade do material e o número de sítios ativos para interação ou ligação de substâncias reativas, o que contribui para maior sensibilidade e resposta rápida dos indicadores (SCAMPICCHIO et al., 2012). O *electrospinning* é uma tecnologia eficaz para a produção de nanofibras, sob a atuação do campo eletrostático, que a partir de soluções poliméricas produz jatos contínuos, os quais são depositados em coletor metálico (SUNDARAY et al., 2004). O processo apresenta vantagem de ser utilizado desde a escala laboratorial até a industrial, é operado em temperatura ambiente o que permite a encapsulação de compostos bioativos sem ocorrer a degradação antecipada, além da ausência de solvente remanescente no produto (LEIDY; XIMENA, 2019; TOPUZ; UYAR, 2020). Portanto, as nanofibras aliadas a capacidade de alteração de cor em função do pH dos compostos microalgais apresentam potencial no desenvolvimento de indicadores colorimétricos de pH.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver indicador de pH utilizando biomassa e compostos de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 incorporados em nanofibras poliméricas, para monitoramento da qualidade de carnes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulada em nanofibras poliméricas no desenvolvimento de indicador colorimétrico de pH;
- Avaliar a estabilidade da cor de nanofibras indicadoras de pH desenvolvidas a partir de extrato de microalga *Chlorella fusca* LEB 111 e ficocianina durante armazenamento;
- Monitorar a qualidade dos filés de frango e pescado com indicadores de pH baseados em nanofibras e incorporados de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 e ficocianina.

CAPÍTULO II

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 SISTEMAS INTELIGENTES EM EMBALAGENS DE ALIMENTOS

3.1.1 Indicador de pH

Indicadores tem a capacidade de monitorar e registrar os parâmetros críticos da qualidade dos alimentos. Estes fatores são a presença de metabólitos oriundos da deterioração microbológica e as modificações das condições ideais de armazenamento como a temperatura e permeação de gases (HOGAN; KERRY, 2008; MOHEBI; MARQUEZ, 2015; VANDERROOST et al., 2014). Os dispositivos de pH oferecem potencial utilização como indicadores de crescimento microbiano (KERRY; O'GRADY; HOGAN, 2006), uma vez que a atividade destes pode induzir mudanças de pH (SMOLANDER, 2003). Ma e Wang (2016) desenvolveram indicador de pH de filme polimérico e extrato da casca de uva, rica em antocianinas, como agente colorimétrico e avaliaram a aplicação do indicador no leite. Esse alimento em temperatura ambiente é suscetível a deterioração microbológica que, conseqüentemente, provoca alteração do pH de aproximadamente 6,5 para 3. Os autores verificaram que o indicador com extrato alterou a coloração vermelho brilhante para verde escuro, com o valor de pH aumentando de 1 para 10. Dessa forma, o indicador foi testado em leite e observou-se que no leite fresco o filme polimérico contendo extrato de uva apresentou cor amarela. Após 48 h, o filme ficou com aspecto avermelhado, indicando que o leite havia deteriorado apresentando pH 2,94.

Chen et al. (2020) produziram indicador de pH com atividade antimicrobiana a partir de nanofibras de celulose como matriz de filme, antocianinas da batata-doce roxa como pigmento e óleo essencial de orégano. O filme desenvolvido respondeu sensivelmente a alteração de pH (1-12) que apresentou cor vermelha em pH 2, em seguida alterou de rosa para marrom, com o pH aumentando de 4 para 6. Quando o indicador foi imerso em solução de pH mais alto (pH 8) a cor correspondente foi lilás, em pH 10 foi verde e em pH 12 amarela. A ação antimicrobiana foi testada com os micro-organismos *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* que resultou na taxa de inibição de 99,99%. Assim, o indicador proposto pode ser utilizado para monitorar a qualidade dos alimentos durante o armazenamento, bem como, para prolongar a vida útil devido a atividade antibacteriana.

3.1.2 Indicador de tempo-temperatura

Indicadores de tempo e temperatura (ITT) são dispositivos simples, econômicos e facilmente utilizáveis para monitorar, registrar e indicar cumulativamente a influência da

temperatura sobre a qualidade do produto alimentar desde a fabricação até o consumidor (GIANNAKOURETOS et al., 2005; TAOUKIS, 2008). A alteração de temperatura durante a distribuição tem efeito acumulável e reduz a vida útil do alimento. Para produtos frescos a elevação da temperatura aumenta a taxa de reação de degradação, mudança de fase e alteração da atividade de água. Em outros produtos, a diminuição da temperatura abaixo do nível crítico pode ocasionar mudança de fase que causa danos estruturais nos alimentos (ABREU; CRUZ; LOSADA, 2012).

Os ITTs além de rastrear o histórico térmico durante o armazenamento, manuseio e distribuição de alimentos, avaliam o processo de pasteurização e esterilização (MEHAUDEN et al., 2007; TUCKER et al., 2007; TUCKER; HANBY; BROWN, 2009). Esses dispositivos podem ser inseridos em recipientes de transporte ou embalagens individuais como pequeno adesivo. A resposta irreversível do indicador, como a alteração de cor, será visível quando este for submetido à modificações das condições ideais dos produtos (FANG et al., 2017).

Diversos grupos de pesquisa estudaram a aplicação de ITT comercial em produtos alimentícios refrigerados e congelados de origem marinha (BRIZIO et al., 2015; MAI et al., 2011; NUIN et al., 2008; TSIRONI et al., 2011), carne bovina e aves (BRIZIO; PRENTICE, 2014; ELLOUZE; AUGUSTIN, 2010; VAIKOUSI; BILIADERIS; KOUTSOUMANIS, 2009) com resultados promissores. Pereira et al. (2015) desenvolveram indicador de tempo e temperatura com blenda polimérica de álcool polivinílico e quitosana com incorporação de antocianinas extraídas do repolho roxo (*Brassica oleraceae*). Os autores observaram que no teste com leite pasteurizado o indicador alterou significativamente a cor em 25 °C durante diferentes intervalos de tempo, informando a sua deterioração. Portanto, o indicador proposto apresentou propriedades satisfatórias para aplicação em embalagens inteligentes de alimentos.

3.1.3 Indicador de frescor

Os indicadores de frescor fornecem informações diretas de determinados marcadores ou compostos que indicam o nível de frescor dos alimentos, para mostrar a qualidade e assegurar a segurança alimentar (KUSWANDI, 2017). Esse sistema de embalagem inteligente também monitora o pH e alguns outros metabólitos que surgem na deterioração dos alimentos frescos como ácidos orgânicos, etanol, nitrogênio volátil, aminas biogênicas, dióxido de carbono e compostos sulfúricos (KERRY; O'GRADY; HOGAN, 2006). Assim, os indicadores são como dispositivos ativos que atuam em conjunto com a data

de validade do alimento, otimizando o controle de distribuição e o sistema de gerenciamento de estoque (GHAANI et al., 2016).

A resposta dos indicadores de frescor é a alteração na cor do material, devido às reações químicas com os metabólitos gerados durante a deterioração. Esses dispositivos quando produzidos de filmes poliméricos são compostos de três camadas estruturais, sendo a interna hidrofílica para difusão dos metabólitos, outra relativa a mudança de cor e a última de proteção externa (KIM et al., 2017; LEE et al., 2017). A estrutura interna é a mais importante para o desempenho ideal do indicador de frescor, pois esta tem função de proteção do produto alimentício, permeação dos metabólitos induzidos pela deterioração e prevenção da migração desses compostos na camada de mudança de cor (CHUN et al., 2014; KIM et al., 2017; RUKCHON et al., 2014, LEE et al., 2019a).

Esses indicadores podem ser aplicados em vários produtos, incluindo alimentos frescos, frutas e produtos marinhos. Lee et al. (2019b) desenvolveram dispositivo colorimétrico de frescor para a qualidade do peito de frango, produzido com poli (éter-bloco-amida). Os corantes alizarina, verde de bromocresol, azul de bromofenol, azul de bromotimol, m-roxo de cresol, vermelho cresol, curcumina e azul de timol foram utilizados para avaliação da qualidade do alimento. No processo de aplicação desse indicador na carne de frango foi avaliado o nível de nitrogênio base volátil total, pois este reage com os corantes que, consequentemente, alteram a cor. Sendo assim, a aplicação desse indicador informou que o frescor do peito de frango é até o 5º dia a 4 °C ou até o 2º dia a 10 °C. Dessa forma, os autores verificaram que o dispositivo desenvolvido interagiu com o nível de nitrogênio alterando as cores, permitindo a comunicação com o consumidor.

3.1.4 Sensor de gases

A permeabilidade de gases, como o oxigênio (O₂), nas embalagens pode causar efeitos deletérios na qualidade de alguns alimentos devido ao ranço oxidativo, mudança das características sensoriais e deterioração microbiana (DEY; NEOGI, 2019; FANG et al., 2017). Por outro lado, a presença de dióxido de carbono (CO₂) pode indicar a preservação do frescor como produto no processo de respiração de alimentos como frutas e vegetais (TOPUZ; UYAR, 2019; YAM et al., 2005). Os sensores de gases são dispositivos reversíveis destinados a monitorar, detectar e indicar a presença de compostos gasosos ou voláteis nas embalagens, como o dióxido de carbono, o oxigênio e aminas voláteis (KALPANA et al., 2019; KERRY; O'GRADY; HOGAN, 2006).

Os sensores de gás são anexados como etiquetas nas embalagens e respondem às alterações químicas ou enzimáticas da matriz do alimento, contribuindo para a qualidade, segurança e integridade dos produtos embalados. Esses sensores informam a presença dos compostos gasosos aos consumidores através da alteração de cor (FANG et al., 2017). Por esse motivo, pesquisadores procuram produzir sensores sensíveis, robustos, rápidos, baratos e flexíveis para detectar os principais gases de deterioração que são o oxigênio e o dióxido de carbono (VANDERROOST et al., 2014).

Os sensores de oxigênio podem ser aplicados para detectar a vedação inadequada de alimentos embalados à vácuo, por exemplo, carne fresca. Kelly et al. (2020) testaram sensor comercial para detectar O₂ residual em embalagens à vácuo de carne bovina. Os autores aplicaram o sensor em carnes embaladas à vácuo com três equipamentos diferentes, as quais foram armazenadas por 90 dias. Dessa forma, os resultados do sensor mostraram que em 30 dias os níveis de O₂ residual diminuíram nas três embalagens testadas, e após 60 dias os níveis foram constantes indicando que não houve fuga ou entrada de O₂ nas embalagens.

O CO₂ é outro parâmetro fundamental para monitoramento da qualidade dos alimentos, pois com o crescimento microbiano esse gás se acumula na embalagem (PULIGUNDLA; JUNG; KO, 2012). Lyu et al. (2019) desenvolveram filme multicamada como sensor de CO₂, a partir de corante de sais orgânicos, para monitorar a fermentação de repolho (*kimchi*). O sensor adsorvente de CO₂ acompanhou os estágios de maturação do *kimchi*, alterando a cor de azul para amarelo em 72 h. Além disso, os autores verificaram que o sensor pode ser impresso nas embalagens sem o risco da migração dos sais para os alimentos em ambientes úmidos.

3.2 POTENCIAL APLICAÇÃO DE MICROALGAS COMO CORANTES NATURAIS

Os corantes naturais não prejudicam o meio ambiente, são atóxicos e biocompatíveis com células e tecidos (MAHDAVI et al., 2014). Além disso, podem ser obtidos por diferentes fontes e são alternativa aos corantes sintéticos que podem potencialmente causar riscos à saúde (ZHANG; CHEN, 2014). As microalgas são organismos fotossintéticos fundamentais nos ecossistemas aquáticos, sendo que aproximadamente 40% da fotossíntese global é devido a estes micro-organismos (MORENO-GARRIDO, 2008). Além disso, são fonte natural de compostos biologicamente ativos de interesse comercial (VOLK, 2008; VOLK; FURKERT, 2006). *Spirulina* e *Chlorella* são as microalgas mais estudadas e apresentam em sua composição proteínas, lipídios, carboidratos, minerais e pigmentos (β -

caroteno, clorofila, ficocianina) que podem ser utilizados em diversas áreas (MORAIS et al., 2015).

3.2.1 *Chlorella*

A microalga *Chlorella* pertence ao filo das clorófitas, a classe *Chlorophyceae* e foi descoberta pelo pesquisador Martinus Willem Beijerinck, em 1890, sendo classificada como a primeira microalga com núcleo bem definido (BEIJERINCK, 1890). Este micro-organismo tem formato esférico, globular ou elipsoidal, caracterizado por ser eucariótico, unicelular com diâmetro que varia de 2,0 a 10,0 µm (YAMAMOTO et al., 2004; YAMAMOTO; KURIHARA; KAWANO, 2005). As células não apresentam flagelos, estimas e vacúolos, porém possuem elementos estruturais semelhantes às plantas como os cloroplastos (PHUKAN et al., 2011). Esta microalga se reproduz assexuadamente por bipartição celular e pode ser encontrada em ambientes salobros, marinhos e em água doce (LEE, 2008).

Chlorella é uma das microalgas mais estudadas por sua importância biotecnológica como fonte de nutrição humana e matéria-prima para biocombustíveis (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012; SAFI et al., 2014). Este micro-organismo tem certificado GRAS emitido pelo FDA e pode ser utilizada como alimento sem risco para a saúde humana quando cultivada em ambiente com higiene adequada e empregando as boas práticas de fabricação (COSTA et al., 2006; COSTA; MORAIS, 2013; NABAVI; SILVA, 2019). *Chlorella* também apresenta relevância comercial, sendo seu principal mercado a nutrição humana, além de ser disponibilizada como biomassa processada em pó, cápsulas ou comprimidos (GÖRS et al., 2010). As células cultivadas em condições ideais são ricas em proteínas (40-60%) compostas por aminoácidos essenciais, além disso, contêm pigmentos, vitaminas e minerais em sua biomassa (SAFI et al., 2014). Os pigmentos fotossintéticos como clorofila e carotenoides são utilizados principalmente para aplicações alimentares, farmacêuticas ou cosméticas como corantes naturais, suplementos alimentares ou como fonte de moléculas bioativas (GARCÍA; VICENTE; GALÁN, 2017).

As clorofilas são pigmentos verdes, essenciais para a fotossíntese, presentes nas plantas, microalgas e cianobactérias. Microalgas verdes, como a *Chlorella* sp., são fontes primárias de produção de clorofila, podendo apresentar cerca de 7% em sua biomassa (BEWICKE; POTTER, 2009; KHANRA et al., 2018). Devido à alta pigmentação verde e à crescente demanda do consumidor por produtos naturais, as clorofilas são importantes corantes nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas, possibilitando também atuar

como biocompostos em indicadores nas embalagens de alimentos (ODJADJARE; MUTANDA; OLANIRAN, 2017; YAAKOB et al., 2014).

As principais fontes de carotenoides são as microalgas pertencentes à classe *Chlorophyceae*. Essas moléculas variam a cor do amarelo ao vermelho, apresentam propriedade antioxidante e capacidade de utilização como corantes (BERTHON et al., 2017; ODJADJARE; MUTANDA; OLANIRAN, 2017; YAAKOB et al., 2014). Em condições de estresse, esses pigmentos podem ser expressos em até 12% no filo *Chlorophyta* (LEE, 2018). Alguns dos carotenoides explorados nas indústrias de alimentos, rações, cosméticos e farmacêuticas são a astaxantina e luteína, ambos produzidos por espécies do gênero *Chlorella* (BHALAMUR; VALERIE; MARK, et al., 2018; MOLINO et al., 2018; ODJADJARE; MUTANDA; OLANIRAN, 2017; YAAKOB et al., 2014).

3.2.2 *Spirulina*

Spirulina (*Arthrospira*) é uma microalga que apresenta arranjo diferenciado de tricomas cilíndricos multicelulares em espiral aberta em toda sua extensão. A forma helicoidal dos tricomas é característica do gênero, porém o comprimento e tamanho da hélice variam com a espécie (ROMANO et al., 2000). Em 1981, o FDA emitiu certificado GRAS, legalizando a comercialização como suplemento alimentar ou alimento sem oferecer risco para a saúde humana (COSTA; MORAIS, 2013). Esta microalga tem alto valor nutricional, presença de biocompostos ativos, alto teor de pigmentos, minerais e oligoelementos (BORGES et al., 2013; COSTA; MORAIS, 2013). O pigmento β -caroteno representa aproximadamente 80% dos carotenoides presentes na *Spirulina* e outros componentes, como tocoferóis, ficocianina e ficoeritrina, também fazem parte de sua composição (PRIYADARSHANI; RATH, 2012).

Os carotenoides são essenciais para a sobrevivência das microalgas, para proteger as células das espécies reativas de oxigênio geradas durante a fotossíntese e da alta intensidade luminosa (PÉREZ-PÉREZ et al., 2012). O principal carotenoide de interesse comercial das microalgas é o β -caroteno, a luteína e a astaxantina (SPOLAORE et al., 2006). Este biocomposto está associado ao complexo de fotossíntese (cloroplasto), funcionando como pigmento acessório por seu efeito fotoprotetor de fotossistemas de dano oxidativo (VARELA et al., 2015). Os carotenoides são suscetíveis a degradação em pH ácidos (pH = 3-3,5), que resulta na modificação da intensidade da cor (BOON et al., 2010). O mecanismo da instabilidade deste composto em condições ácidas é atribuído à protonação, tempo de

exposição, concentração de ácido, isomerização cis-trans e reações de degradação adicionais (ALIZADEH-SANI et al., 2020; MORTENSEN; SKIBSTED, 2000).

A C-ficocianina é o pigmento azul extraído de microalgas, como a *Spirulina platensis*. Este biocomposto pertence ao grupo de proteínas denominadas ficobiliproteínas que são cadeias múltiplas de holo-proteínas compostas de apo-proteínas com ficobilinas ligadas covalentemente. As ficobilinas são cromóforos de tetrapirrole de cadeia aberta (ERIKSEN, 2008). As aplicações de ficocianina em alimentos e outras indústrias e/ou processos são limitadas devido à sua sensibilidade ao tratamento térmico, o que resulta na perda de cor azul (CHAIKLAHAN; CHIRASUWAN; BUNNAG, 2012; ERIKSEN 2008).

As clorofilas são pigmentos presentes na fotossíntese das microalgas, como a *Spirulina platensis*, que apresenta alto teor deste pigmento (JENSEN; KNUTSEN, 1993). A coloração verde das clorofilas, em condições ácidas, transforma-se em verde-azeitona referente a feofitina, devido a perda de íons de magnésio da estrutura (GUNAWAN; BARRINGER, 2000). A taxa de degradação da clorofila acelera à medida que o pH diminui, e a maior parte da decomposição ocorre em pH extremamente ácidos. No entanto, a perda da cor verde e a taxa de degradação da clorofila diminuiu a níveis de pH mais alcalinos (ANDRÉS-BELLO et al., 2013; KOCA; KARADENIZ; BURDURLU, 2007). Portanto, este pigmento natural tem potencial para aplicação em indicadores inteligentes, uma vez que pode monitorar o pH dos alimentos. Medina-Jaramillo et al. (2017) observaram que a clorofila e os carotenoides presentes em extratos de manjerição e chá verde alteraram de cor sob a influência de diferentes pH ácido e alcalino. O filme contendo extrato de manjerição em pH ácido alterou de amarelo esverdeado para branco, em meio básico de pH, a cor alterou para amarelo brilhante. O filme com extrato de chá verde em pH básico apresentou o escurecimento da coloração.

3.3 INDICADORES INTELIGENTES BASEADOS NANOFIBRAS POLIMÉRICAS

As nanofibras formam membranas compostas por redes ultrafinas de fibras poliméricas com diâmetros abaixo da medida micrométrica atingindo a escala dos nanômetros (PERSANO et al., 2013; VEGA-LUGO; LIM, 2009). Diversos biopolímeros e polímeros sintéticos e naturais de forma individual ou em blends são explorados para a produção de nanofibras por *electrospinning* para o setor de embalagens na indústria de alimentos (Tabela 1). Estes polímeros devem apresentar características intrínsecas, incluindo a biodegradabilidade, biocompatibilidade e propriedades mecânicas que são essenciais para utilização na produção de embalagem inteligente (TOPUZ; UYAR, 2020).

Tabela 1 – Polímeros e parâmetros do processo para produção de nanofibras em embalagens de alimentos.

Polímero	Parâmetros do processo (PE; TA; Dcc)	Aplicação em embalagens de alimentos	Referência
Poli(hidroxitirato)	15 kV; 150 $\mu\text{L h}^{-1}$; 150 mm	Embalagem antibacteriana	KUNTZLER et al. (2018)
Zeína	10–13 kV; 0,005 mL min^{-1} ; 130 mm	Embalagem para prolongar a vida útil de cogumelos (<i>Agaricus bisporus</i>)	NIU et al. (2020)
Gelatina	23 kV, 0,2 mL h^{-1} ; 150 mm	Embalagem antibacteriana para preservação de queijos	LIN, GU, CUI (2019)
Proteína microalgal	50 kV; 100 mm s^{-1} ; 300 mm	Embalagem antioxidante	MOREIRA et al. (2019)
Amido	+25 kV e –3 kV; 0,60 mL h^{-1} ; 200 mm	Embalagem antioxidante e antibacteriana	FONSECA et al. (2019)
Hidroxipropilmetil celulose	12 kV; 0,6 mL h^{-1} ; 300 mm	Embalagem antioxidante para preservação de nozes	AYDOGDU, SUMNU, SAHIN (2019)
Quitosana	20 kV; 0,5 mL h^{-1} ; 150 mm	Embalagem antibacteriana para preservação de carne bovina	SURENDHIRAN et al. (2020)
Álcool polivinílico	10 kV; 1 mL h^{-1} ; 120 mm	Embalagem antibacteriana	ZHANG et al. (2020)
Quitosana e óxido de polietileno (PEO)	20 kV; 300 $\mu\text{L h}^{-1}$; 100 mm	Embalagem antibacteriana	KUNTZLER, COSTA, MORAIS (2018)

TA: taxa de alimentação; PE: potencial elétrico; Dcc: Distância do capilar ao coletor.

O poli(ácido láctico) (PLA) é um polímero biodegradável com elevada propriedade mecânica, transparência, facilidade de processamento e disponibilidade no mercado (MARTINO et al., 2011). Essas características tornam este polímero promissor para aplicação em embalagem de alimentos (ARRIETA et al., 2013; AVEROUS, 2004; FORTUNATI et al., 2010; SIRACUSA et al., 2008). Nesse sentido, o PLA é um dos polímeros com muitas aplicações a curto prazo como utensílios descartáveis e embalagens de filme (ARRIETA et al., 2012; CHIEN; LIANG; YANG, 2011). Além disso, é utilizado em aplicações de embalagens de alimentos rígidas e flexíveis, uma vez que foi aprovado pela FDA como substância que pode entrar em contato com alimentos (BOONYAWAN et al., 2011; HWANG et al., 2012).

As nanofibras apresentam alta área superficial em relação ao volume o que melhora a sensibilidade e o tempo de resposta das embalagens inteligentes. Essa propriedade aumenta a reatividade do material, acelera os mecanismos de adsorção ou liberação, e aumenta o número de sítios ativos para interação ou ligação de materiais reativos dos indicadores (SCAMPICCHIO et al., 2012). A incorporação de compostos bioativos em nanofibras contribui para a preservação das características físicas e biológicas dos compostos sensíveis a luz, temperatura e umidade. Isso proporciona melhora na estabilidade, biodisponibilidade e propriedades de liberação controlada da biomolécula (BHUSHANI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014; VOS et al., 2010).

Outra propriedade importante para embalagens inteligentes é a estrutura porosa das nanofibras composta por dois tipos de poros. Os poros intersticiais são derivados do entrelaçamento e sobreposição das fibras durante o processo de *electrospinning* (LI; XIA, 2004). Os poros intrafibras considerados como característica intrínseca estão presentes nas nanofibras individuais, em que tamanho e forma podem ser controlados pelos parâmetros do *electrospinning* (LU; XIA, 2013). A elevada porosidade reduz, proporcionalmente, a resistência ao transporte de massa do fluido que passa pelos poros da membrana e aumenta a área superficial da nanofibras o que melhora o desempenho de detecção e o tempo de resposta das embalagens inteligentes (SCAMPICCHIO et al., 2012; YANG; ZHAN; HUANG, 2020).

3.3.1 Processo do *electrospinning*

O *electrospinning* é uma técnica promissora da nanotecnologia para o projeto e desenvolvimento de sistemas de detecção inteligente e ultrasensível (MACAGNANO; ZAMPETTI; KNY, 2015). Este método de produção de nanofibras é baseado na aplicação de forças eletrostáticas sobre a gota de solução polimérica, que então é alongada até produzir

fibras com diâmetros em nanoescala (AGARWAL; GREINER, 2013). O equipamento *electrospinning* é composto por bomba de deslocamento positivo em que é inserida a solução de polímero, dois eletrodos e fonte de alto potencial elétrico (Figura 1). O processo utiliza forças eletrostáticas para transformar a gota pendente de solução polimérica em fibra, seguida por deposição sobre o coletor (FRENOT; CHRONAKIS, 2003). O polímero em fase líquida é expelido a partir do capilar em taxa constante pela bomba de deslocamento positivo, a qual forma a gota na ponta do capilar. Quando o pequeno volume de líquido de polímero é exposto ao campo elétrico, a gota se estende em direção ao ponto potencial inferior mais próximo, formando o cone de Taylor (YARIN; KOOMBHONGSE; RENEKER, 2001). Então, esse jato em forma de cone é direcionado ao coletor metálico aterrado formando a membrana de nanofibras (DOSHI; RENEKER, 1995).

Diversos métodos, incluindo *drawing*, *template synthesis*, separação por fases, *self-assembly* e *electrospinning* foram desenvolvidos para produzir nanofibras. Entre estes, a técnica do *electrospinning* é a mais estudada, pois utiliza temperatura ambiente durante o processo e não permanece solvente remanescente no produto, possibilitando a incorporação de compostos bioativos e termossensíveis nas nanofibras (MACAGNANO; ZAMPETTI; KNY, 2015). Além disso, as principais vantagens do *electrospinning* em relação as outras técnicas é o aumento de escala e a repetibilidade do processo (SCAMPICCHIO et al., 2012).

A morfologia das nanofibras é um aspecto importante para direcionar a aplicação destas em vários campos tecnológicos. Para melhorar ou obter diferentes morfologias, vários parâmetros experimentais relacionados à solução polimérica (peso molecular do polímero, concentração, viscosidade e condutividade), ao processo de produção (potencial elétrico, distância do capilar ao coletor, taxa de alimentação da solução) e ao ambiente (temperatura e umidade) precisam ser otimizados (XUE et al. 2019).

3.3.1.1 Propriedades da solução polimérica

A massa molecular e a concentração do polímero são parâmetros que apresentam influência nas propriedades viscosimétricas das soluções. Os polímeros de alta massa molecular têm maior área de superfície, o que facilita o emaranhamento da cadeia polimérica, resultando em maior viscosidade da solução. Este aumento de viscosidade tem sido associado à produção de nanofibras de maior diâmetro (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Da mesma forma, quanto maior a concentração da solução, maior o número de cadeias do polímero. Observa-se que a solução de baixa concentração tende a produzir nanofibras poliméricas com gotas. No entanto, as soluções extremamente concentradas podem gerar nanofibras na forma

de fitas ou pode ocorrer a obstrução do capilar durante o processo de *electrospinning*. Para obter nanofibras contínuas e sem defeitos é necessário determinar a concentração ideal, que dependerá dos outros parâmetros do processo e do polímero utilizado (DEITZEL et al., 2001).

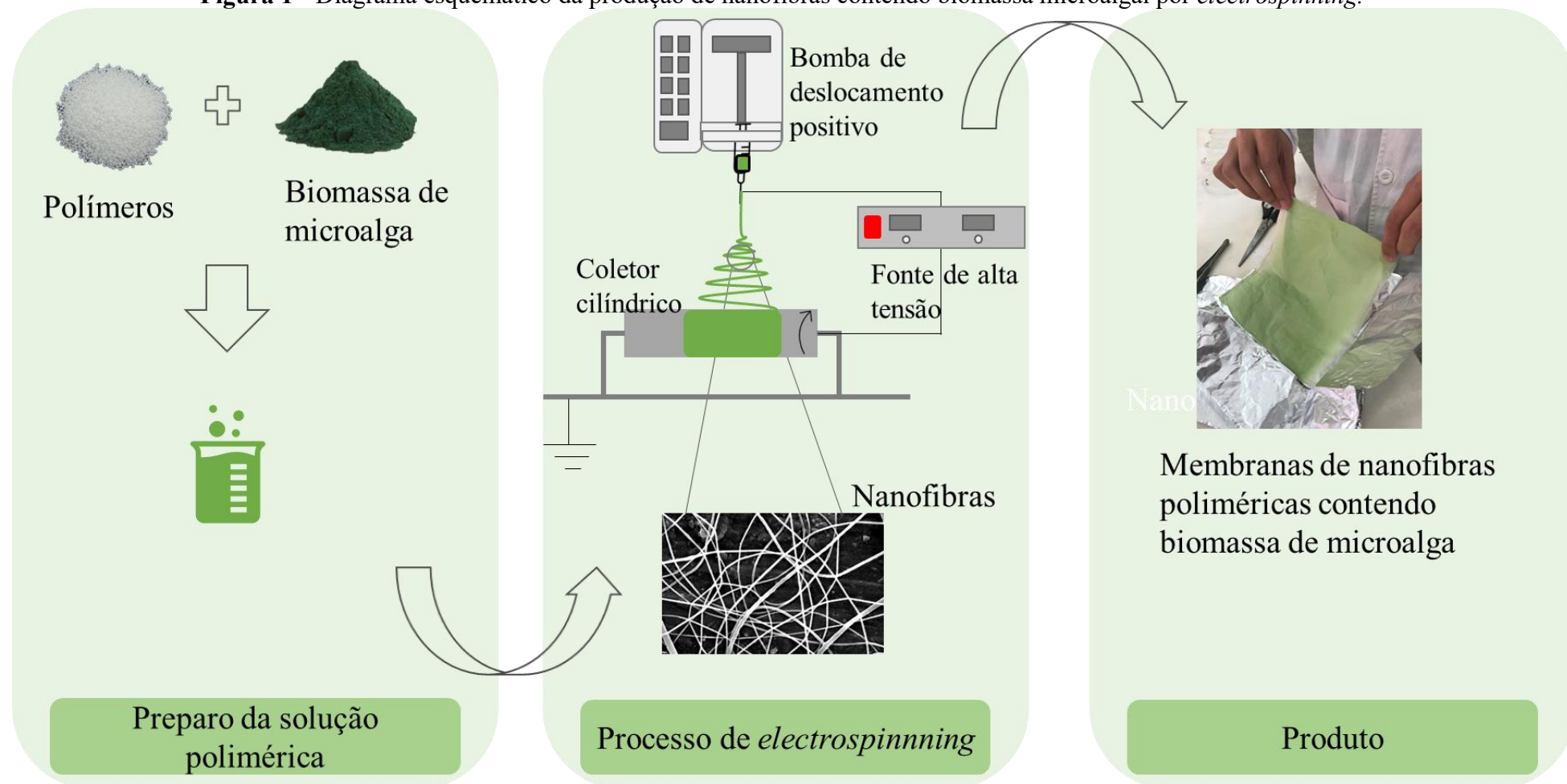
A condutividade elétrica da solução é outro parâmetro que influencia a morfologia das nanofibras, facilitando o alongamento da gota e a formação de um ou mais jatos. A adição de sais, íons ou polímeros condutores à solução pode aumentar a condutividade, resultando em nanofibras com menos defeitos e com diâmetros menores (COSTA et al., 2012). Schmatz et al. (2016) adicionaram cloreto de sódio nas soluções contendo policaprolactona e compostos bioativos. Os autores verificaram que a adição do sal nas soluções reduziu o diâmetro das nanofibras, e melhorou a homogeneidade na morfologia, havendo ausência de defeitos ou gotas.

3.3.1.2 Parâmetros do processo

Durante o *electrospinning*, as nanofibras são formadas devido ao estiramento da gota de polímero por meio de forças eletrostáticas. O alongamento ocorre sob atuação do potencial elétrico, em que as forças eletrostáticas presentes na gota são maiores do que as forças originadas pela tensão superficial (AGARWAL; GREINER, 2013; COSTA et al., 2012). Portanto, o adequado potencial elétrico é um parâmetro essencial para o desenvolvimento das nanofibras contínuas, pois influencia na deformação da gota de solução e formação do jato. Se um potencial elétrico muito baixo for aplicado, o jato de solução não se estabiliza, levando a formação de gotas ou nanofibras com morfologia não uniforme e com defeitos na superfície. Por outro lado, se for utilizado potencial elétrico excessivamente elevado, pode ocorrer a formação de nanofibras de maior diâmetro e não uniformes, o que pode ser prejudicial para as propriedades do material (COSTA et al., 2012; DEITZEL et al., 2001;).

A taxa de alimentação da solução influencia no tamanho das gotas e a morfologia das nanofibras. As altas taxas, podem formar gotas grandes, nanofibras com maiores diâmetros. Enquanto baixas taxas, tendem a formar nanofibras de diâmetros menores (COSTA et al., 2012). A distância adequada entre o capilar e o coletor, é fundamental para a formação de nanofibras, pois durante essa trajetória ocorre a evaporação do solvente. Se a distância de trabalho for pequena (<10 cm), nanofibras na forma de fitas são formadas. Os solventes voláteis exigem menores distâncias de trabalho, que variam em torno de 10 cm, em comparação com solventes não voláteis (COSTA et al., 2012; LUO et al., 2012).

Figura 1 - Diagrama esquemático da produção de nanofibras contendo biomassa microalgal por *electrospinning*.



Existem diversos tipos de coletores que podem ser utilizados no *electrospinning* para deposição das nanofibras. O coletor estático é frequentemente adotado para o processo, o qual apresenta a deposição aleatória das nanofibras (THENMOZHI et al., 2017). Estudos mostram que a utilização de coletor cilíndrico rotativo é eficaz para obtenção de nanofibras alinhadas (BHARDWAJ; KUNDU, 2010; CHENG et al., 2017; HE; NIE; FENG, 2014). Quando os jatos de nanofibras são depositados no coletor rotativo, a força centrífuga gerada pode induzir a deposição ordenada das nanofibras. Outras variações baseadas neste método foram desenvolvidas, incluindo tambor rotativo ou tiras condutoras (HE; NIE; FENG, 2014). Para produzir nanofibras com geometrias complexas foi proposto o coletor contínuo para a produção de nanofibras tridimensionais (COOK et al., 2016).

3.3.1.3 Condições ambientais

Parâmetros ambientais, especificamente umidade relativa e temperatura, influenciam na morfologia das nanofibras e na eficiência do processo de *electrospinning*. Existe uma relação direta entre a evaporação do solvente e a temperatura, bem como, entre a condutividade do solvente e a temperatura. Ambos podem influenciar na capacidade do processo de formação das nanofibras, na viscosidade e na tensão superficial da solução (BHARDWAJ; KUNDU, 2010; CHEN; YU, 2010).

A temperatura ambiente durante o processo tem a função de aumentar o efeito da taxa de evaporação e reduzir a viscosidade da solução. Soluções de baixa viscosidade proporcionam nanofibras com presença de imperfeições (KUNTZLER et al., 2018; PHAM; SHARMA; MIKOS, 2006). Vrieze et al. (2009) verificaram que o aumento da temperatura possibilitou que a taxa de evaporação do solvente ocorresse de forma mais rápida. Em temperaturas mais altas ($> 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) também ocorreu a redução da viscosidade das soluções poliméricas e a formação de gotas.

A umidade relativa do ambiente tem efeito sobre a evaporação do solvente e sobre a formação de poros na superfície das nanofibras. Casper et al. (2004) estudaram o efeito da umidade durante o *electrospinning* de fibras de poliestireno, e obtiveram como resultado fibras lisas e sem poros na superfície em baixa umidade relativa (25%). Por outro lado, acima de 30% de umidade relativa surgiram poros na superfície das fibras. Tripatanasuwan, Zhong e Reneker (2007) relataram que o diâmetro das nanofibras de óxido de polietileno diminuiu de 253 nm para 144 nm quando a umidade relativa aumentou de 4% para 48%.

3.4 APLICAÇÃO DAS NANOFIBRAS COMO INDICADORES INTELIGENTES

A engenharia de nanofibras surgiu para aprimorar e substituir os atuais materiais de embalagem de alimentos. A aplicação de nanofibras por *electrospinning* no segmento das embalagens inteligentes vem sendo nova alternativa para o monitoramento dos alimentos. Alguns estudos foram desenvolvidos com compostos colorimétricos encapsulados em nanofibras com potencial para avaliar a deterioração de alimentos perecíveis (Tabela 2). Kuntzler et al. (2020) desenvolveram indicador de pH baseado em nanofibras de PLA/PEO com biomassa microalgal. Neste estudo, foi observado que a biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 altera a cor conforme os valores de pH testados (1-10). O indicador desenvolvido com 2% de biomassa e espessura de $99,0 \pm 7,7$ μm mostrou a variação da cor marrom para verde entre o pH 5 e 7 com valores de ΔE superior a 21, e estatisticamente diferentes. Nessa faixa de pH concentram-se diversos alimentos como carnes bovina, suína e de peixe. Portanto, o indicador colorimétrico de pH desenvolvido com biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 pode ser um método conveniente e visual para estimar alterações de qualidade em produtos cárneos, uma vez que mudanças nos valores de pH são indicativos de deterioração da carne.

Luo e Lim (2020) produziram nanofibras com curcumina como indicador colorimétrico para a detecção de aminas voláteis. Os autores observaram que quando a curcumina é exposta a trimetilamina, a coloração amarela mudou para laranja-avermelhada. As nanofibras de polivinilpirrolidona (PVP) e etilcelulose (EC)/PEO apresentaram desempenho diferentes em relação a cor. O indicador a base de EC/PEO mostrou maior extensão de mudança de cor ao se expor a baixos níveis de amina, sugerindo que esse indicador forneceu sensibilidade mais alta para detecção de amina do que o produzido com PVP. Dessa forma, os resultados dos indicadores desenvolvidos mostraram que são promissores para aplicações em embalagens inteligentes, sendo alternativa para informar a deterioração dos peixes.

3.5 HISTÓRIO DA LINHA DE PESQUISA EM ENGENHARIA DE NANOFIBRAS

Em 2008, o projeto “Matrizes de nanofibras biodegradáveis para células-tronco no tratamento da lesão da medula espinhal” foi desenvolvido em cooperação binacional (Alemanha-Brasil). Nesse projeto foi estudado o desenvolvimento de nanofibras por *electrospinning* utilizando poli(hidroxibutirato) de origem microalgal. No mesmo ano, a linha de pesquisa “Engenharia de Nanofibras” foi iniciada no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB).

Tabela 2 – Indicadores colorimétricos a base de nanofibras para monitoramento do frescor de alimentos.

Composto	Polímeros	Deteção	Aplicação	Referência
Alizarina	Acetato de celulose	pH	Peixe	AGHAEI et al. (2018)
Alizarina	Zeína	Aminas voláteis	Peixe	AGHAEI et al. (2020)
Extrato de batata-doce, carvacrol	Pulolano, zeína	pH e nitrogênio básico volátil total	Carne suína	GUO et al. (2020)
Extrato de couve roxa (<i>Brassica oleracea L.</i>)	Álcool polivinílico	pH	Frutas	MAFTOONAZAD, RAMASWAMY (2019)
Extrato de couve roxa (<i>Brassica oleracea L.</i>)	Zeína	pH	-	PRIETTO et al. (2018)
Lacase	Zeína	Tempo-temperatura	-	JHUANG et al. (2020)
Curcumina	Quitosana e PEO	pH e nitrogênio básico volátil total	Frango	YILDIZ, SUMNU, KAHYAOGLU, (2021)
Ficocianina	Poli(ácido láctico) e PEO	pH	-	MOREIRA et al. (2018)
Extrato de açaí	Poli(caprolactona) e PEO	pH	-	SILVA et al. (2019)
Ficocianina e curcumina	Poli(caprolactona) e PEO	pH	-	TERRA et al. (2021)

No período de 2009-2011, o projeto “Desenvolvimento de nanofibras para produtos aplicados na Engenharia de Alimentos” teve como objetivo estudar as condições de *electrospinning* para desenvolvimento de nanofibras utilizando biopolímeros para aplicação em produtos relacionados a engenharia de alimentos. Neste mesmo período, outro projeto intitulado “Uso de nanotecnologia na bioengenharia” foi aprovado com o objetivo de utilizar a nanotecnologia para produzir pele, através do cultivo de células-tronco em matrizes produzidas por *electrospinning* e desenvolvimento de novas fontes de polímeros para produção de *scaffolds* de nanofibras a partir de alga brasileira.

Em 2011-2014, o projeto “Bionanotecnologia microalgal: Desenvolvimento de nanomateriais a partir de biopolímeros e compostos bioativos sintetizados por microalgas” teve como objetivo o desenvolvimento de nanofibras e nanocápsulas com biopolímeros e compostos ativos extraídos da microalga *Spirulina*. Em 2014, foi criado o Laboratório de Microbiologia e Bioquímica (MiBi) para a continuidade dos estudos da linha de pesquisa Engenharia de Nanofibras. Nesse mesmo ano, iniciou a linha de pesquisa em nanopartículas/nanoesferas pelo mesmo equipamento de *electrospinning* para a encapsulação e liberação controlada de compostos bioativos em alimentos.

No período de 2015-2017, o projeto “Desenvolvimento de embalagens biodegradáveis produzidas a partir de nanofibras” teve como objetivo o desenvolvimento de embalagens biodegradáveis a partir de nanofibras por *electrospinning*. Em 2017, iniciou novo segmento da linha de pesquisa com o projeto “Adsorção de CO₂ em pellets de cinzas e nanofibras poliméricas para aumento da biofixação do gás em cultivo microalgal”. Este projeto ainda em vigência, tem o objetivo de minimizar os impactos ambientais causados pelo CO₂ de origem termelétrica. Atualmente, também está em andamento o projeto “Incorporação de biocompostos sintetizados por *Spirulina* em nanofibras poliméricas para uso em embalagens ativas e inteligentes”.

Desde 2010 foram depositadas 8 patentes, 28 artigos publicados em periódicos internacionais e 3 capítulos de livros na área de engenharia de nanofibras. No total, foram defendidas 3 teses, 5 dissertações de mestrado e 4 Trabalhos de Conclusão de Curso. Atualmente, no MIBI são realizados estudos sobre nanofibras para aplicação em membranas filtrantes, embalagens ativas e inteligentes, adsorção de gases, conservação de células e nanoesferas para preservação de compostos bioativos.

CAPÍTULO III

4 DESENVOLVIMENTO DA TESE

A tese foi dividida em três artigos de pesquisa e uma patente. O primeiro artigo intitulado “Indicador colorimétrico de pH desenvolvido a partir de nanofibras contendo biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18” foi publicado no periódico Food Chemistry em 2020, e encontra-se disponível pelo doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126768.

O segundo artigo tem como título “Extratos de microalgas e ficocianina adicionados as nanofibras: avaliação da estabilidade da cor para potencial aplicação em embalagens inteligentes”. Neste estudo, foram obtidos extratos de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 e avaliada a adição de ficocianina tanto com biomassa de microalga *Spirulina* sp. LEB 18 quanto com os extratos de microalgas nos indicadores. A partir desses resultados, foi selecionado indicador de pH contendo extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 com ficocianina para avaliação da estabilidade térmica e o armazenamento.

O terceiro artigo é intitulado como “Monitoramento do frescor da qualidade de carne de frango e pescado utilizando indicadores colorimétricos de pH”. Neste estudo, os melhores indicadores produzidos nos artigos um e dois foram aplicados em filés de frango e pescado por 36 h a temperatura ambiente. O acompanhamento do pH e alteração de cor foram realizados no período de deterioração dos alimentos.

Essa tese gerou uma patente relacionada aos indicadores de nanofibras contendo extratos de *Chlorella fusca* LEB 111 e ficocianina e tem como título “Indicador e/ou sensor de pH com microalga(s) e biocomposto(s) para monitorar a qualidade de alimentos frescos” (Anexo 1). Esse pedido de propriedade intelectual foi depositado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI na data 12/11/2020. O número do processo é n.º BR 10 2020 023135 9.

ARTIGO I

INDICADOR COLORIMÉTRICO DE pH DESENVOLVIDO A PARTIR DE NANOFIBRAS
CONTENDO BIOMASSA DE *Spirulina* sp. LEB 18

RESUMO

INDICADOR COLORIMÉTRICO DE pH DESENVOLVIDO A PARTIR DE NANOFIBRAS CONTENDO BIOMASSA DE *Spirulina* sp. LEB 18

Indicador colorimétrico de pH foi desenvolvido utilizando nanofibras de poli(ácido láctico) (PLA) e óxido de polietileno (PEO) adicionadas de biomassa de microalga *Spirulina* sp. LEB 18. Este estudo é pioneiro na avaliação de biomassa microalgal em nanofibras como indicador de pH, o que torna este material único e promissor para aplicação em embalagens inteligentes. Nanofibras contendo biomassa foram submetidas em diferentes pH (pH 1-10) e as variações na cor foram medidas por colorímetro. A análise da molhabilidade das nanofibras apresentou característica de hidrofiliabilidade (ângulo nulo com a água), o que permite a interação dos íons com a biomassa, indicando resposta de cor rápida em função do pH. Os indicadores contendo 1, 2 e 3% (m v⁻¹) de biomassa quando submetidos as variações de pH, resultaram em valores $\Delta E > 12$ indicando diferença absoluta na cor. Quanto a estabilidade em relação ao efeito do pH as nanofibras com a biomassa mostraram que não perdem seu potencial colorimétrico ao longo do tempo, além disso, aumentam a percepção de cor o que facilita a visualização para o consumidor. Portanto, esse novo material apresenta potencial para ser aplicado como indicador inteligente para verificar a qualidade dos alimentos através de um sinal visual da condição do produto e proporcionar segurança ao consumidor.

Palavras-chave: *electrospinning*, embalagens de alimentos, microalga, pigmentos naturais, propriedades ópticas.

1 INTRODUÇÃO

A embalagem tradicional de alimentos destina-se a proteger o produto do ambiente circundante, promover o retardamento da deterioração, estender o prazo de validade e realizar a manutenção da qualidade dos alimentos embalados (RESTUCCIA et al., 2010; ROBERTSON, 2006). No entanto, estas funções não são suficientes para as exigências de padrões de qualidade da sociedade, uma vez que há aumento da demanda por alimentos seguros e frescos (MAFTOONAZAD; RAMASWAMY, 2019). Dessa forma, surgiram as embalagens inteligentes com funções aprimoradas em resposta às preocupações crescentes dos consumidores envolvendo segurança e qualidade dos produtos alimentícios. Embalagens de alimentos inteligentes permitem monitorar as condições dos produtos embalados, registrar os parâmetros críticos e comunicar ao consumidor a qualidade do produto para consumo (EU, 2009, VANDERROOST et al., 2014).

Os indicadores inteligentes podem ser incorporados interna ou externamente às embalagens e monitoram as mudanças da qualidade em tempo real, como indicadores de tempo-temperatura (BRIZIO; PRENTICE, 2015), sensores de gás (HUSSAIN et al., 2018), pH (POURJAVAHER et al., 2017) e biossensores (KERRY; O'GRADY; HOGAN, 2006). Os sistemas indicadores fornecem informações sobre a qualidade do alimento por meio de

alterações colorimétricas visuais (ZAJKO; KLIMANT, 2013). Especificamente, na deterioração de alimentos causada pela contaminação microbiana ocorrem alterações no pH e o monitoramento em tempo real pode informar ao consumidor as condições do alimento para consumo (GADEA et al., 2016).

Os indicadores visuais consistem em um pigmento sensível ao pH e uma matriz sólida para imobilizar o pigmento (ZHANG; LU; CHEN, 2014). Existem estudos que relataram o potencial de pigmentos extraídos de fontes naturais sensíveis à pH aplicados em embalagens inteligentes (PEREIRA; ARRUDA; STEFANI, 2015; SALIU; DELLA-PERGOLA, 2018; ZHAI et al., 2017; ZHANG; LU; CHEN, 2014). No presente estudo foi utilizada a microalga *Spirulina* que é reconhecida pelo *Food and Drug Administration* (FDA) o qual emitiu certificado *Generally Recognized as Safe* (GRAS) que permite a comercialização da microalga como suplemento alimentar ou alimento sem risco para a saúde humana (COSTA; MORAIS, 2013). Esta microalga apresenta cor verde-azulada, alto teor de pigmentos como β -caroteno, tocoferóis, ficocianina, ficoeritrina e clorofilas (PRIYADARSHANI; RATH, 2012). Dessa forma, devido a certificação e a presença de diversos pigmentos em sua composição com potencial sensibilidade ao pH, a biomassa microalgal encapsulada em nanofibras poliméricas, mostra-se promissora para constituir o indicador colorimétrico de pH.

A matriz sólida é outra parte do indicador que suporta o pigmento e pode influenciar na sensibilidade e tempo de resposta (MAFTOONAZAD; RAMASWAMY, 2019). Existem diversos estudos com filmes poliméricos (BAI et al., 2019; CHEN et al., 2019, KUSWANDI; NURFAWAIDI, 2017; MACIEL et al., 2012; PRIETTO et al., 2017), no entanto, nanofibras produzidas por *electrospinning* apresentam vantagens em relação aos filmes. Devido ao diâmetro na escala nanométrica, que permite maior número de poros intersticiais, elevada área de superfície em relação ao volume e estabilidade dos pigmentos funcionais. Especificamente, a alta área de superfície das nanofibras aumenta a reatividade do material, acelera os mecanismos de adsorção ou liberação e aumenta o número de locais para interação com os compostos reativos no desenvolvimento de sensores. Além disso, a medida que a porosidade das nanofibras aumenta, a resistência de transporte de massa é reduzida facilitando a difusão dos fluidos (MACAGNANO et al., 2015; AGARWAL; GREINER; WENDORFF, 2013; MERCANTE et al., 2017).

Portanto, este estudo é pioneiro na utilização de biomassa microalgal diretamente nas nanofibras sendo uma complexa fonte colorimétrica que contém em sua composição diversos pigmentos com variabilidade de cores, o que torna o padrão de cores deste indicador

único e promissor para aplicação em embalagens inteligentes. O objetivo do estudo foi avaliar o potencial da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulada em nanofibras poliméricas no desenvolvimento de indicador colorimétrico de pH.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 POLÍMEROS E BIOMASSA MICROALGAL

O poli(ácido láctico) (PLA) (6201D) (3,1 densidade relativa) da Nature Works LLC (Minnetonka, USA) foi utilizado no desenvolvimento das nanofibras. O óxido de polietileno (PEO) de massa molecular 600 kDa foi adquirido da Sigma Aldrich (Oakville, Canadá). A biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi cultivada na planta piloto do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) localizada às margens da Lagoa Mangueira (33° 30' 13" S; 53° 08' 59" W) em biorreatores tipo *raceway* de 10000 L (MORAIS et al., 2009).

2.2 PREPARO DA BIOMASSA E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE MUDANÇA DE COR

Ao final do cultivo a biomassa microalgal foi recuperada, utilizando filtro de 200 μ m, concentrada em prensa hidráulica e extrusada. Após a extrusão, a biomassa foi seca a 50 °C durante 4 h em secador de bandejas (MORAIS et al., 2009), moída em moinho de bolas por 2 h e peneirada em peneira de aço inox (Granutest, Brasil) com abertura de 400 mesh para a padronização do tamanho das partículas. Posteriormente, a biomassa foi armazenada sob refrigeração.

A capacidade de mudança de cor da biomassa microalgal foi avaliada em diferentes soluções de pH (pH 1-10). Para este processo, 2% (m v⁻¹) de biomassa foi adicionada em 4 mL de cada tampão com posterior agitação com vórtex (Phoenix Lufenco, Brasil) para homogeneização. Após 5 min, a coloração cada solução foi verificada visualmente. As soluções de tampão foram compostas de hidro ácido potássio clorídrico para pH 1-2, glicina ácido clorídrico para pH 3, citrato para pH 4, 5, 6 e 7 e fosfato para pH 8,9 e 10, sendo que todas as soluções foram armazenadas sob refrigeração.

2.3 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS

2.3.1 Soluções poliméricas e processo de *electrospinning*

As soluções poliméricas foram preparadas com blenda de 9% m v⁻¹ PLA e 3% m v⁻¹ PEO em proporções de 9:1 (MOREIRA et al., 2018); 8:2; 7:3; 6:4 e 5:5, respectivamente. Também foram preparadas soluções contendo 8% m v⁻¹ PLA e 4% m v⁻¹ PEO na proporção 6:4. A biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi adicionada nas soluções em concentrações de 1, 2 e 3% (m v⁻¹). Todas as soluções foram solubilizadas em solução clorofórmio:metanol (8:2) por 16 h em agitador magnético a 1800 rpm (Fisatom, Brasil) a temperatura ambiente (22 ± 4 °C).

As soluções poliméricas foram injetadas através de diferentes capilares (Ø 0,45; 0,55; 0,70 e 0,80 mm) e depositadas em coletor metálico. Os potenciais elétricos testados foram 10, 15 e 20 kV, a distância do capilar ao coletor foi 120 mm e as taxas de alimentação foram 600, 1000 e 1500 µL h⁻¹. Todos os testes foram conduzidos à 21 °C e umidade relativa do ar de 45 ± 5%.

2.3.2 Morfologia das nanofibras

A forma e o diâmetro das nanofibras poliméricas com e sem a biomassa foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Jeol JSM-6610 LV, Japão). Antes das análises, as amostras foram fixadas em suporte metálico e recobertas com ouro, utilizando o metalizador *diode sputtering* (Denton Vacuum CAR001-0038, Estados Unidos) (ASTM E986-04, 2010). Após, o diâmetro das nanofibras foi determinado a partir da média de 50 medidas obtidas através do software ImageJ 1.49 em diferentes áreas das imagens.

2.3.3 Viscosidade das soluções poliméricas

A viscosidade foi determinada através de reômetro (Brookfield DV-III Ultra Programmable Rheometer, Estados Unidos) utilizando as soluções poliméricas que produziram nanofibras com diâmetros uniformes e contínuos. A análise foi conduzida com 0,5 mL de solução e em temperatura ambiente.

2.3.4 Análises térmicas da nanofibras

A medida da estabilidade térmica das nanofibras, biomassa e os polímeros foram realizadas através de análise termogravimétrica (TGA) (Shimadzu DTG-60, Japão) de acordo

com a metodologia ASTM D3850-12 (2013). As análises foram conduzidas a temperatura ambiente até alcançar 500 °C, em atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 30 mL min⁻¹ e taxa de aquecimento constante de 10 °C min⁻¹, utilizando 2 a 6 mg de amostra.

Para determinação da temperatura de fusão das nanofibras, biomassa e os polímeros foi utilizado calorímetro diferencial de varredura (DSC) (Shimadzu DSC-60, Japão). A análise foi conduzida em temperatura ambiente até alcançarem 400 °C, com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e fluxo de nitrogênio de 50 mL min⁻¹. A temperatura de fusão foi determinada a partir do pico máximo de fusão apresentado na curva de DSC de acordo com ASTM D7426-08 (2013).

2.3.5 Caracterização estrutural das nanofibras

As nanofibras foram avaliadas em espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (IR Prestige-21, Shimadzu Corp., Japan). Os espectros foram registrados entre 0 e 4000 cm⁻¹ com resolução espectral de 4 cm⁻¹. As amostras foram analisadas em forma sólida utilizando cápsulas de brometo de potássio (KBr).

2.3.6 Molhabilidade das nanofibras

A análise da molhabilidade foi realizada para verificar a capacidade do tampão de pH de interagir com o indicador e ocasionar a mudança de cor. Para esta análise foram utilizadas nanofibras contendo 1, 2 e 3% (m v⁻¹) de biomassa e microscópio digital Blue (x60), em que uma gota de água foi inserida sobre a superfície das nanofibras e, em seguida, a imagem foi obtida. A partir do software Surftens 3.0, cinco medições de cada imagem foram realizadas utilizando cinco pontos de medição dispostos ao redor da gota.

2.4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE COR DOS INDICADORES DE PH

2.4.1 Medidas de resposta colorimétrica

Para avaliar a sensibilidade dos indicadores às variações de pH foram preparadas soluções com valores de pH de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0. Os indicadores com 1, 2 e 3% (m v⁻¹) de biomassa foram seccionadas em seções de 20 x 20 mm e submersas em cada tampão por 5 min. Os parâmetros de cor dos indicadores de pH foram determinados utilizando colorímetro (Modelo Chroma Meter CR-400/410, Konica Minolta, Japão) e sistema CIELab. Três medidas foram realizadas para cada indicador, e os valores de L* (luminosidade), a* (vermelho/verde) e b* (amarelo/azul) foram medidos. A média dos valores

de L^* , a^* e b^* foi utilizada no cálculo da diferença total de cores (ΔE), de acordo com a Equação 1.

$$\Delta E = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2} \quad (1)$$

Em que: $\Delta L^* = L - L0^*$; $\Delta a^* = a - a0^*$ e $\Delta b^* = b - b0^*$. $L0^*$, $a0^*$ e $b0^*$ são os valores de referência do indicador sem o tratamento com solução tampão para cada concentração de biomassa.

2.4.2 Espessura

Os indicadores de pH contendo 1, 2 e 3% ($m v^{-1}$) de biomassa foram produzidos com 1, 3 e 5 mL de solução polimérica para formar diferentes espessuras dos indicadores, as quais foram determinadas utilizando micrômetro (Insize, 3109-25, Brasil), para avaliar a resposta da cor e a resistência à água. Após, os indicadores foram seccionados em seções de 20 x 20 mm e submersos em cada tampão (pH 1-10) por 5 min. A medida de resposta da cor também foi determinada com colorímetro (Modelo Chroma Meter CR-400/410, Konica Minolta, Japão), sistema CIELab e calculada a diferença total de cores conforme Equação 1, em que $L0^*$, $a0^*$ e $b0^*$ são os valores de referência do indicador sem o tratamento com solução tampão para cada espessura e concentração de biomassa.

2.4.3 Estabilidade da cor no tempo

O indicador contendo 1, 2 e 3% ($m v^{-1}$) de biomassa e espessura com maior sensibilidade a alteração de cor foi avaliado quanto ao efeito do tempo de contato com as soluções de pH (1-10). Os indicadores foram seccionados (20 x 20 mm) e submersos em cada solução tampão. A resposta da cor foi avaliada a cada hora até verificar-se a estabilidade da cor com colorímetro (Modelo Chroma Meter CR-400/410, Konica Minolta, Japão), sistema CIELab e calculada a diferença total de cores conforme Equação 1. Os parâmetros $L0^*$, $a0^*$ e $b0^*$ são os valores de referência do indicador com espessura mais sensível a alteração da cor sem o tratamento com solução tampão para cada concentração de biomassa.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada nos diâmetros médios das nanofibras e, para determinar diferenças nos valores de ΔE dos indicadores nas faixas de pH com maior

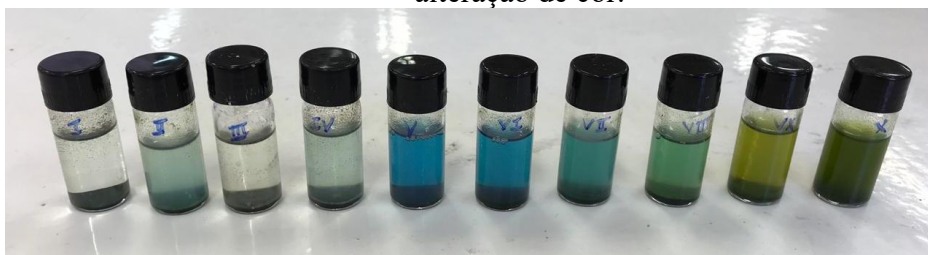
sensibilidade a alteração de cor. As diferenças das médias foram determinadas por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Tukey com nível de confiança de 95%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÃO DA MUDANÇA DE COR DA BIOMASSA MICROALGAL

No desenvolvimento do indicador colorimétrico para aplicação em embalagens de alimentos, primeiramente, foi necessário avaliar o comportamento da alteração de cor da biomassa de microalga *Spirulina* sp. LEB 18 em diferentes valores de pH (Figura 1). A microalga *Spirulina* apresenta diversos compostos responsáveis pela sua coloração, incluindo ficocianina, ficoeritrina, aloficocianina, carotenoides, compostos fenólicos e clorofila (PRIYADARSHANI; RATH, 2012; MORAIS et al., 2015).

Figura 1 – Solução tampão (pH 1-10) com biomassa microalgal para observar a alteração de cor.



Os principais pigmentos que podem causar a variação da cor da biomassa são ficocianina e clorofila, isto porque a *Spirulina* sp. contém aproximadamente 17,5% (m m^{-1}) de ficocianina (MARKOU; NERANTZIS, 2013) e 11,5% (m m^{-1}) de clorofila (DANESI et al, 2002). A intensa cor azul característica da ficocianina foi observada nas soluções de pH 5, 6 e 7 e, conforme diminuiu o pH de 5 para 1, a intensidade da cor reduziu gradativamente. A cor azul presente nas soluções de pH 5, 6 e 7 pode ser atribuída a capacidade de extração de ficocianina com solução tampão nestes valores de pH. Segundo o método de extração e quantificação de ficocianina da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002) é recomendado utilizar tampão fosfato de sódio 0,1 M em pH 6,9. Quando o pH se alterou de 8 para 10, observou-se aumento gradativo da cor verde, sendo indicativo da clorofila presente na biomassa. A partir desses resultados, verificou-se o potencial de alteração da cor da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 e por esse motivo, continuou-se os estudos com nanofibras adicionadas de biomassa para aplicação como indicador de pH.

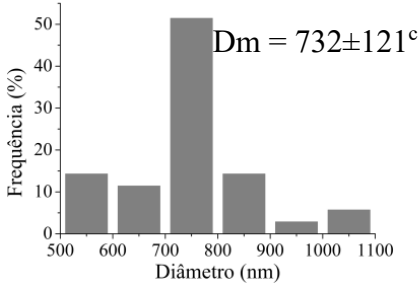
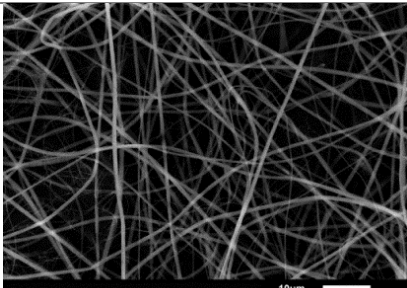
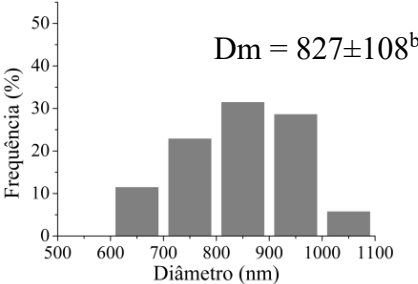
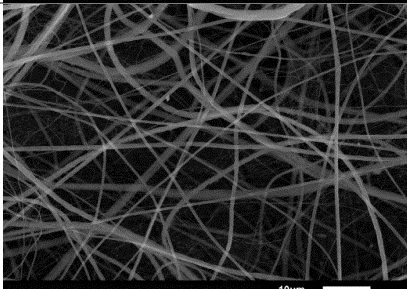
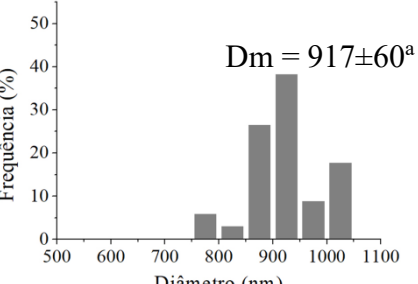
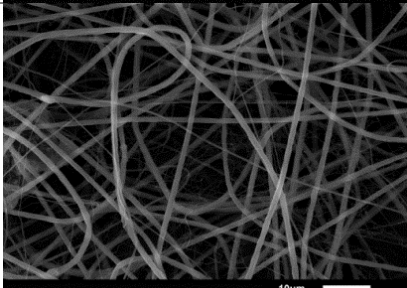
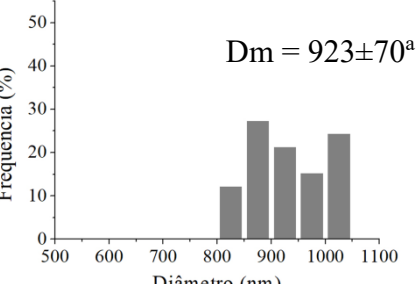
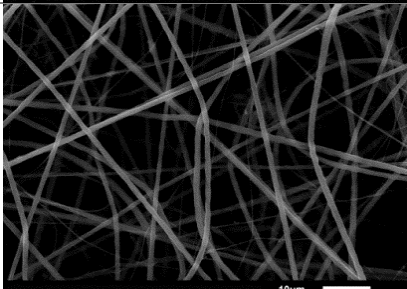
3.2 PRODUÇÃO DAS NANOFIBRAS DE PLA/PEO/BIOMASSA MICROALGAL E VISCOSIDADE DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS

As soluções de 9% (m v^{-1}) de PLA e 3% (m v^{-1}) de PEO foram preparadas individualmente e após, diferentes proporções destas soluções como 9:1; 8:2; 7:3; 6:4 e 5:5 de PLA:PEO adicionadas de 2% (m v^{-1}) biomassa microalgal utilizadas na produção das nanofibras. O estudo com diferentes proporções de polímeros foi devido a presença de PLA, pois a característica de hidrofobicidade pode impedir a interação das nanofibras com a solução tampão. A formação das nanofibras contínuas ocorreu utilizando capilar de 0,80 mm, potencial elétrico de 15 kV e taxa de alimentação de $600 \mu\text{L h}^{-1}$. Moreira et al. (2018) verificaram que introduzindo o PEO na solução polimérica de PLA e ficocianina gerou nanofibras mais hidrofílicas e obteve-se interação do tampão de pH com a ficocianina alterando assim, a cor do indicador de azul até a perda total da cor.

As nanofibras da blenda de 9% de PLA e 3% (m v^{-1}) de PEO nas proporções 9:1; 8:2 e 7:3 não provocaram diferença na cor da biomassa, no entanto na proporção 6:4 verificou-se alteração da cor. Devido a isso, adicionou-se maior concentração de PEO (4% m v^{-1}) e menor de PLA (8% m v^{-1}) na proporção 6:4 (PLA:PEO) (Tabela 1) e assim, aumentou-se a percepção da variação da cor da biomassa. A proporção 5:5 de ambas as condições da blenda promoveram a solubilização parcial das nanofibras quando em contato com o tampão.

Os diâmetros médios das nanofibras de PLA/PEO aumentaram significativamente ($p < 0,05$) à medida que a maior concentração de biomassa foi incorporada nas nanofibras. Esse aumento também foi verificado na viscosidade das soluções poliméricas contendo concentrações de 1, 2 e 3% (m v^{-1}) de biomassa ($0,39 \pm 0,02$; $0,53 \pm 0,08$; $0,61 \pm 0,04$ Pa.s, respectivamente). A morfologia e o diâmetro das nanofibras eletrofuncionais dependem também do tipo de sistema polímero/solvente e concentração polimérica (CASASOLA et al., 2014). O aumento da concentração de compostos na solução pode aumentar a viscosidade (PRIETTO et al., 2018), o que contribui para o emaranhamento entre as cadeias poliméricas (HAIDER et al., 2013). O aumento na viscosidade ou concentração da solução origina diâmetro de nanofibra maior e mais uniforme (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Durante o processo de *electrospinning*, a viscosidade da solução é importante para a estabilidade do jato e determinação do intervalo de concentrações a partir do qual as nanofibras contínuas podem ser obtidas (JAWOREK et al., 2009). Em soluções com baixas viscosidades, a tensão superficial determina se gotas ou nanofibras com gotas são formadas, enquanto acima da concentração crítica é obtida estrutura fibrosa contínua (RAMAKRISHNA et al., 2005).

Tabela 1 – Imagens, distribuição do diâmetro (nm) e diâmetro médio (Dm, nm) das nanofibras produzidas com 8% PLA/4% PEO (m v^{-1}) na proporção 6:4 de PLA:PEO com e sem biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (Sp).

Concentração de biomassa (m v^{-1})	Distribuição do diâmetro	Imagens das nanofibras
Sem Sp	 Dm = 732 ± 121^c	
1% Sp	 Dm = 827 ± 108^b	
2% Sp	 Dm = 917 ± 60^a	
3% Sp	 Dm = 923 ± 70^a	

Letras minúsculas iguais indicam que os resultados não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diâmetros médios.

Portanto, nanofibras produzidas por *electrospinning* representam abordagem promissora baseada na nanotecnologia para a concepção e desenvolvimento de sistemas de indicadores inteligentes e ultrasensíveis (MACAGNANO et al., 2015). As propriedades como alta área superficial em relação ao volume e a porosidade das nanofibras, devido ao diâmetro nanométrico, oferece maior capacidade de interação com o meio e a possibilidade de melhor desempenho de detecção do indicador (LI; YU; DING, 2015; ZHANG et al., 2017).

Além disso, a configuração de poros intersticiais aliada a área de superfície das nanofibras aumentam os mecanismos de sensibilidade dos compostos reativos, o que possibilita a utilização dessas no desenvolvimento de indicadores inteligentes.

3.3 PROPRIEDADES TÉRMICAS E ESPECTROSCOPIA FTIR

A temperatura de fusão das nanofibras refere-se somente ao polímero PLA ($T_f = 169\text{ }^{\circ}\text{C}$), pois não foi possível verificar nas amostras o pico endotérmico do polímero PEO, provavelmente devido à baixa concentração de PEO constituído na matriz polimérica quando comparado ao PLA (Tabela 2). Os termogramas da nanofibras de PLA/PEO contendo biomassa não mostraram mudança perceptível nos picos endotérmicos em comparação com o pico de PLA granular. A temperatura de fusão das nanofibras permaneceu cerca de $170\text{ }^{\circ}\text{C}$, independentemente da concentração de biomassa adicionada. Isto indica que a fase cristalina do PLA não foi afetada pela incorporação do composto. Moreira et al. (2018) produziram nanofibras de PLA/PEO adicionadas de ficocianina e verificaram que a temperatura de fusão não se alterou com a incorporação do composto e a presença de PEO. Os mesmos efeitos foram observados por Schmatz et al. (2019) que adicionaram nanopartículas poliméricas com ficocianina em nanofibras de PLA.

Tabela 2 - Temperatura de fusão (T_f), entalpia (H), temperatura inicial de degradação (T_{id}), temperatura final de degradação (T_{fd}) e temperatura de máxima degradação (T_{md}) da biomassa *Spirulina* sp. LEB 18 (Sp), dos polímeros e nanofibras de 8% PLA/4% PEO na proporção 6:4 com e sem a biomassa.

Amostras	$T_f(^{\circ}\text{C})$	$H(\text{J g}^{-1})$	$T_{id}(^{\circ}\text{C})$	$T_{fd}(^{\circ}\text{C})$	$T_{md}(^{\circ}\text{C})$
Sp	117	-333,5	193	267	217
PEO	69	-157,4	351	410	381
PLA	169	72,1	336	391	368
Nanofibras					
PLA/PEO	167	-27,1	267	317	300
PLA/PEO/1% Sp	167	-25,1	266	301	284
PLA/PEO/2% Sp	167	-19,5	243	291	270
PLA/PEO/3% Sp	167	-26,2	237	282	262

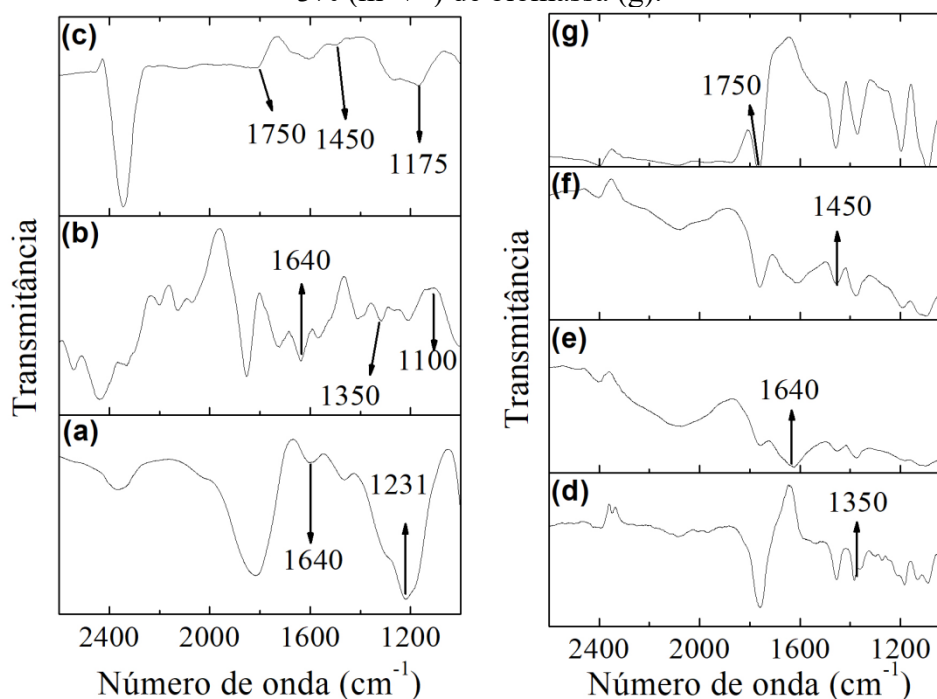
O encapsulamento da biomassa nas nanofibras de PLA/PEO conferiu estabilidade térmica ao composto. As nanofibras contribuíram com aumento de 67, 53 e $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ na temperatura de máxima degradação da biomassa nas concentrações 1, 2 e 3% (m v^{-1}), respectivamente. Isso demonstra que encapsular compostos pelo processo de *electrospinning* possibilita ampliar a aplicação destes e que as propriedades térmicas dos polímeros prevalecem em relação ao do composto, provavelmente devido à transformação das

dimensões em escala nanométrica, o que permite maior área de contato e maior resistência ao aumento da temperatura.

Outro ponto importante para uso das nanofibras em embalagens de alimentos é a total evaporação dos solventes das soluções poliméricas. Nos termogramas da nanofibras não foi observado traços dos solventes nas temperaturas de evaporação como do clorofórmio (61,2 °C) e metanol (64,7 °C). Em virtude destes resultados, pode-se concluir que houve a eliminação completa do solvente durante a produção das nanofibras no *electrospinning*.

Os espectros de FTIR das nanofibras de PLA/PEO com e sem biomassa foram analisados para verificar as interações químicas entre os polímeros e o composto. No espectro do PLA puro (Figura 2c), bandas de absorção IR foram observadas em 1750 cm^{-1} que indica a presença de estiramento de éster C=O; em 1450 cm^{-1} mostra a característica -C-H e forte banda de absorção em 1175 cm^{-1} forneceu a confirmação da presença de estiramento de éster C=O (PAI et al., 2019). A presença de 2 e 3% (m v^{-1}) de biomassa nas nanofibras de PLA/PEO intensificaram as bandas de absorção do PLA o que provavelmente deve-se a interação química entre o polímero e o composto.

Figura 2 - Espectros FTIR da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (a), polímeros PEO (b) e PLA (c), nanofibras de 8% PLA/4% PEO na proporção 6:4 (d) com 1% (e), 2% (f) e 3% (m v^{-1}) de biomassa (g).



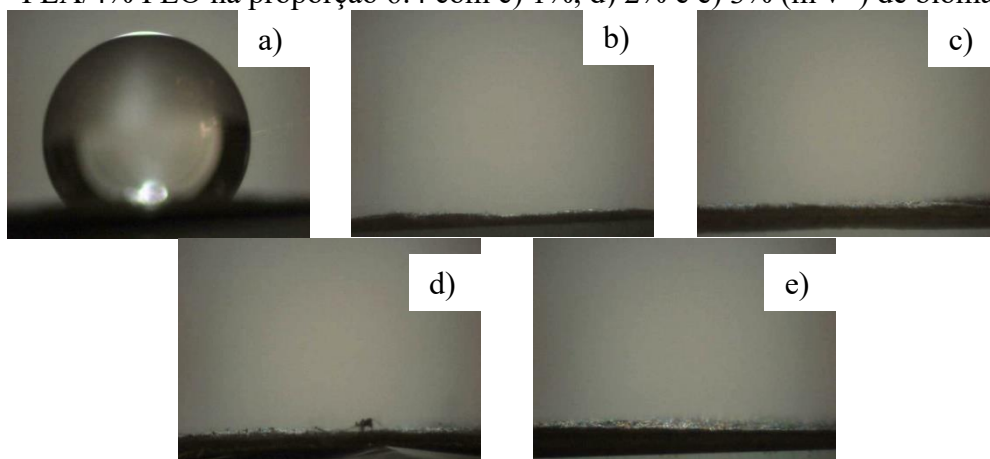
As bandas no espectro de PEO puro pertencem a 1450 cm^{-1} correspondente a flexão assimétrica, a banda de 1350 cm^{-1} a presença de CH_2 e em 1100 cm^{-1} associado ao alongamento com C-O-C (RAO; SUVARNA, 2016). As nanofibras de PLA/PEO (Figura 2)

apresentam bandas características dos polímeros puros juntamente com o fragmento encontrado em 1200 cm^{-1} com maior intensidade nas nanofibras com 3% (m v^{-1}) de biomassa. O espectro *Spirulina* sp. LEB 18 mostrou a banda 1231 cm^{-1} que representa deformações -CH e -OH, em que estas ligações estão presentes em compostos como lipídios (BATALLER; CAPAREDA, 2018). Além disso, o espectro de biomassa mostrou a faixa 1640 cm^{-1} como resultado das vibrações de estiramento C = O das ligações peptídicas, isso também pode ser observado nas nanofibras com biomassa.

3.4 MOLHABILIDADE DAS NANOFIBRAS

O ângulo de contato da água de $132,4 \pm 0,8^\circ$ é devido à natureza hidrofóbica das nanofibras de PLA (Figura 3). Alippilakkotte et al. (2017) produziram nanofibras de PLA e observaram ângulo de 140° a partir do aparecimento de gotículas de água de formato esférico em sua superfície por longo período de tempo. Segundo Yuan e Lee (2013), ângulos de contato superiores a 90° geralmente significam que o umedecimento da superfície é desfavorável, de modo que o fluido minimiza seu contato com a superfície e forma uma gotícula de líquido compacta. Por esse motivo foi adicionado PEO às nanofibras com o intuito de produzir um material hidrofílico em que a água seja absorvida em todo indicador.

Figura 3 – Molhabilidade da superfície das nanofibras produzidas com a) 8% PLA, b) 8% PLA/4% PEO na proporção 6:4 com c) 1%, d) 2% e e) 3% (m v^{-1}) de biomassa.



As nanofibras de PLA/PEO com e sem a biomassa apresentaram ângulo nulo, sendo que ângulo de contato menor que 90° indica que o umedecimento da superfície é favorável, e o fluido se espalhará sobre uma grande área na superfície (YUAN; LEE, 2013). A diferença de hidrofiliidade entre as amostras pode ser atribuída principalmente à adição de PEO para a produção das nanofibras, pois este polímero solubiliza-se facilmente em água a temperatura ambiente. Segundo Prietto et al. (2018), a hidrofiliidade das nanofibras pode ser

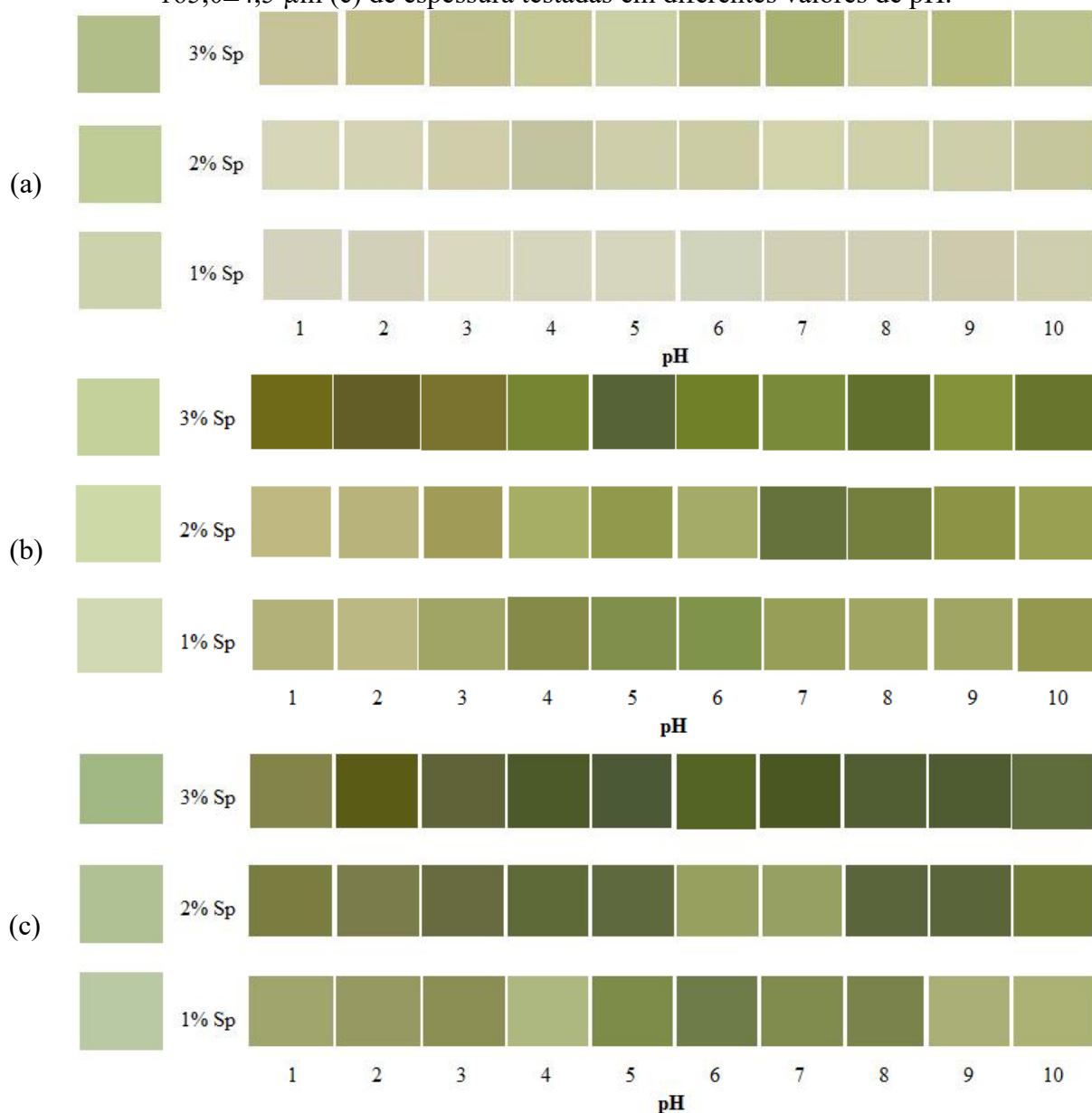
atribuída à morfologia da superfície, à porosidade, ao tamanho das nanofibras e à ação capilar da membrana eletrostática. Além disso, o aumento da molhabilidade pode ser útil para aplicações como indicadores de pH, pois isso facilita a difusão de H^+ ou OH^- nas nanofibras, permitindo que esses íons interajam com a biomassa, dando assim resposta de alteração de cor rápida em função do pH.

3.5 ANÁLISE DE RESPOSTA DAS CORES DOS INDICADORES DE pH

Os indicadores apresentaram coloração verde (Figura 4) característica devido a presença de microalga *Spirulina* sp. LEB 18. Após o contato com o tampão, a coloração observada nos ensaios variou de acordo com a concentração da biomassa e a espessura. Os indicadores com espessura de $36,5 \pm 1,0 \mu m$ contendo 1% ($m v^{-1}$) de biomassa apresentaram coloração cinza em todos os valores de pH. Quando a concentração aumentou para 2 e 3% ($m v^{-1}$), observou-se a coloração marrom claro em pH ácido e verde em pH alcalino (Figura 4(a)). Entretanto, indiferente das concentrações de biomassa, os indicadores apresentaram baixo desempenho na mudança de cor, isso porque a maior parte (94%) dos resultados de ΔE estão abaixo de 12 (Figura 5a). Além disso, a espessura de $36,5 \pm 1,0 \mu m$ produzida com 1 mL de solução polimérica não foi suficiente para os indicadores manterem sua forma quando em contato com as soluções de pH. Segundo Tassanawat et al. (2007), ΔE maior que 5 implica em mudança de cor perceptível pelo olho humano, e ΔE maior que 12 indica diferença absoluta na cor.

O aumento da espessura dos indicadores para $165,0 \pm 4,5 \mu m$ produzidos com 5 mL de solução, incrementou os valores de ΔE em todas as concentrações de biomassa testadas, os quais apresentaram resultados entre 20 e 45. De acordo com a Figura 4(c) os indicadores contendo 3% ($m v^{-1}$) de biomassa apresentaram coloração marrom em pH entre 1 e 3, verde em pH 4 a 7 e verde-azulada nos demais valores de pH. Entretanto, em concentrações de 1 e 2% ($m v^{-1}$) alguns valores de pH mostraram a descoloração do indicador e não apresentaram a mesma sequência de cores do indicador contendo 3% ($m v^{-1}$) de biomassa. Essa desuniformidade nas cores dos indicadores pode estar relacionada com o tipo de coletor utilizado durante a produção das nanofibras, pois estas foram depositadas em coletor estático o qual produz membranas com espalhamento aleatório das nanofibras ocasionando então maior deposição de material em determinado lugar do coletor.

Figura 4 – Variação de cor dos indicadores compostos de nanofibras de 8% PLA/4% PEO na proporção 6:4 e biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (Sp) com $36,5 \pm 1,0$ (a), $99,0 \pm 7,7$ (b) e $165,0 \pm 4,5$ μm (c) de espessura testadas em diferentes valores de pH.



Outro ponto importante na avaliação de um sistema de indicador inteligente de pH é a amplitude do resultado de ΔE entre os valores de pH. A Figura 5(b) mostra esta variabilidade do ΔE entre os valores de pH 5 a 7 do indicador composto com 2% (m v^{-1}) de biomassa e entre o pH 3 a 5 do indicador com 1% (m v^{-1}) de biomassa (Figura 5(c)). Essa amplitude significa que ocorreu brusca alteração da cor do indicador entre esses valores de pH, o que facilita ao consumidor a percepção visual da mudança de cor, conforme elucidado na Figura 3c na faixa de pH 3 a 5 do indicador com 1 % (m v^{-1}) de biomassa. Segundo Taoukis (2008), o sinal da resposta é o parâmetro que determina a legibilidade de um indicador inteligente, o qual deve apresentar mudança compreensível e perceptível pelo

consumidor. Assim, a configuração deve ser visualmente fácil de ler e com a consequente tradução da mensagem segundo Brizio e Prentice (2015).

Dessa forma, como a variabilidade é uma característica essencial para implementação do indicador de pH, observou-se que os indicadores produzidos com 5 mL de solução (Figura 5(c)) contendo 3% (m v^{-1}) de biomassa apresentaram resultados de ΔE constantes. O mesmo comportamento constante na faixa de pH 1-5 e 5-8 foi verificado nos indicadores contendo 2% e 1% (m v^{-1}) de biomassa, respectivamente. Em outros valores de pH ocorreu potencial amplitude de ΔE como no pH 5 ao 6 no indicador contendo 2% (m v^{-1}) de biomassa e em pH 3 ao 5 indicador contendo 1% (m v^{-1}). No entanto, os indicadores produzidos com 3 mL de solução polimérica que formaram espessura de $99,0 \pm 7,7 \mu\text{m}$ foram aqueles que melhor desempenharam a variação de cor em diferentes valores de pH, além de necessitar menos material para fazer a solução e consequentemente menos gasto, em relação aos indicadores produzidos com 5 mL.

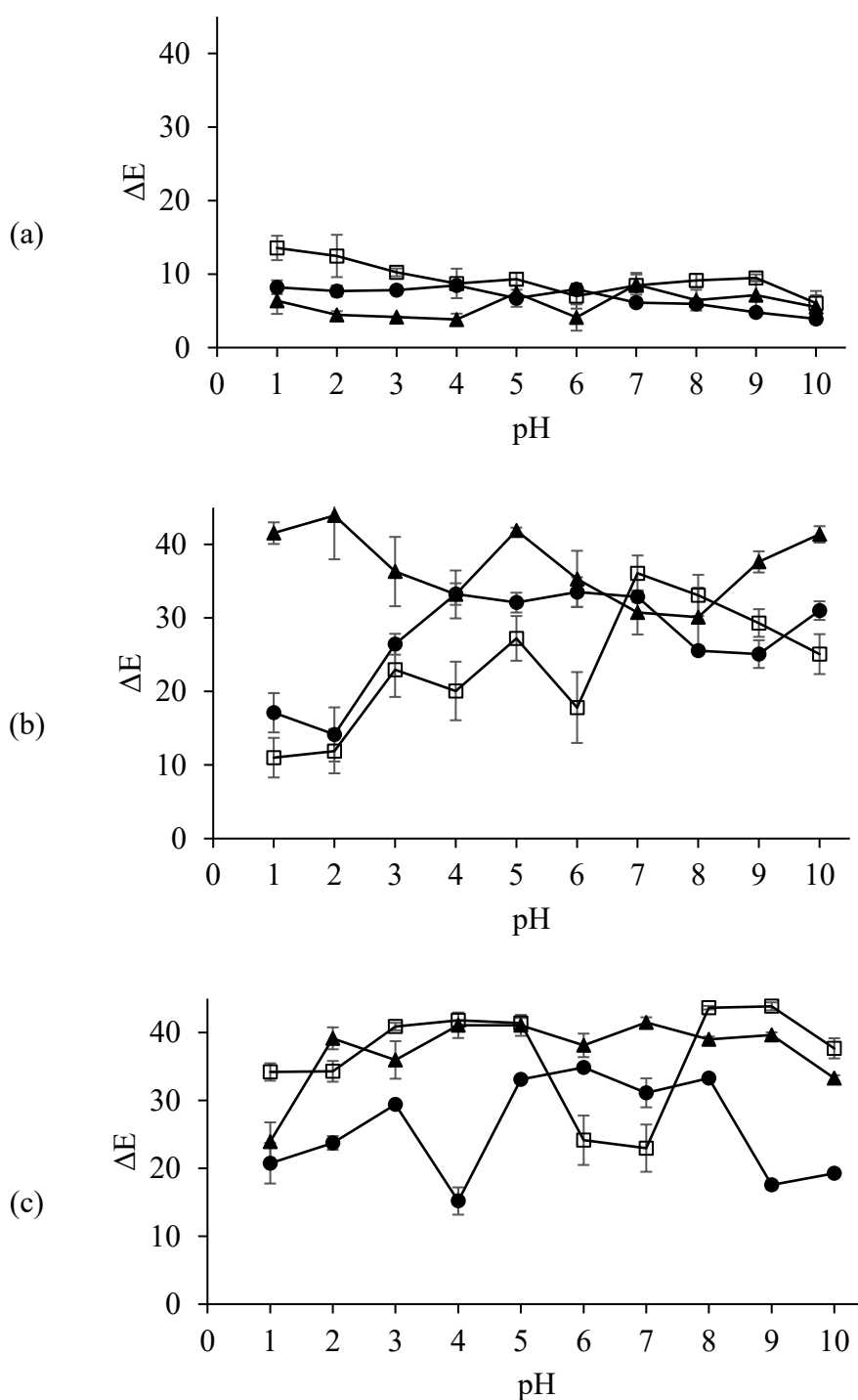
De acordo com a Figura 5(b), a amplitude dos resultados de ΔE indica que estes indicadores tem grande potencial para fácil visualização da alteração de cor. Em pH ácido (1-3) as nanofibras de PLA/PEO em todas as concentrações de biomassa mostraram cor marrom que variaram a intensidade de acordo com a aumento da concentração de biomassa (a^* aproximadamente -6 até -8). A coloração verde apareceu em pH entre 4 e 7 com maior intensidade no indicador com 3% (m v^{-1}) de biomassa (a^* aproximadamente -11 até -16). Após o pH 7, os indicadores apresentaram tendência na descoloração da cor verde (a^* aproximadamente -11 até -15).

Por outro lado, a coloração azul característica do pigmento ficocianina presente na biomassa microalgal não foi identificada nos indicadores, sendo observada somente quando a biomassa foi submetida às soluções de pH. Esse fato pode estar relacionado com a encapsulação da biomassa nas nanofibras, as quais promoveram estabilidade a esse pigmento permitindo proteção de agentes externos. As características morfológicas das nanofibras desempenham papel importante na eficiência de cor do indicador de pH, além de ser um promissor suporte sólido para produção de indicador inteligente. A estrutura porosa das nanofibras em comparação aos filmes poliméricos pode facilitar a resposta de mudança de cor do pH sensível devido à sua maior área de superfície (JEBEL; ALMASI, 2016).

Os indicadores compostos de nanofibras de PLA/PEO adicionados de 1, 2 e 3% (m v^{-1}) de biomassa de microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foram avaliados quanto a estabilidade da cor durante os efeitos do pH. A Figura 6 mostra que durante as 4 h que os indicadores permaneceram em contato com as soluções de pH o perfil colorimétrico manteve-se em todas

as amostras. Este resultado é favorável para aplicação como embalagem inteligente, pois mostrou que a biomassa não perde seu potencial colorimétrico ao longo do tempo, além disso, aumenta a percepção de cor o que facilita a visualização para o consumidor.

Figura 5 - ΔE em relação ao pH das nanofibras compostas de 8% PLA/4% PEO na proporção 6:4 e biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (1 (●), 2 (□) e 3 (▲) % m v⁻¹) com espessuras de 36,5±1,0 (a), 99,0±7,7 (b) e 165,0±4,5 μm (c).



Na Figura 6(a) destaca-se a variação de cor em pH ácido (1-3) em que o valor de ΔE foi superior a 12 para os indicadores contendo 1% (m v^{-1}) de biomassa, mostrando diferença absoluta entre as cores. Outra importante variação na cor foi observada na Figura 6(c) entre o pH 2 e 4 para os indicadores contendo 3% (m v^{-1}) de biomassa, os quais apresentaram valores de ΔE maiores que 26 e estatisticamente diferentes, sendo esta a alteração perceptível a visualização do consumidor. Assim, esse indicador poderia ser aplicado em embalagens de alimentos para monitorar a qualidade do suco cítrico, pois segundo Tribess e Tadini (2006) e Vegara et al. (2014), a faixa de pH característico de frutas cítricas varia de 3,6 a 4, e o aumento da acidez em sucos armazenados devido ao aparecimento de ácido acético ou láctico, é um indicador de contaminação por leveduras e/ou bactérias.

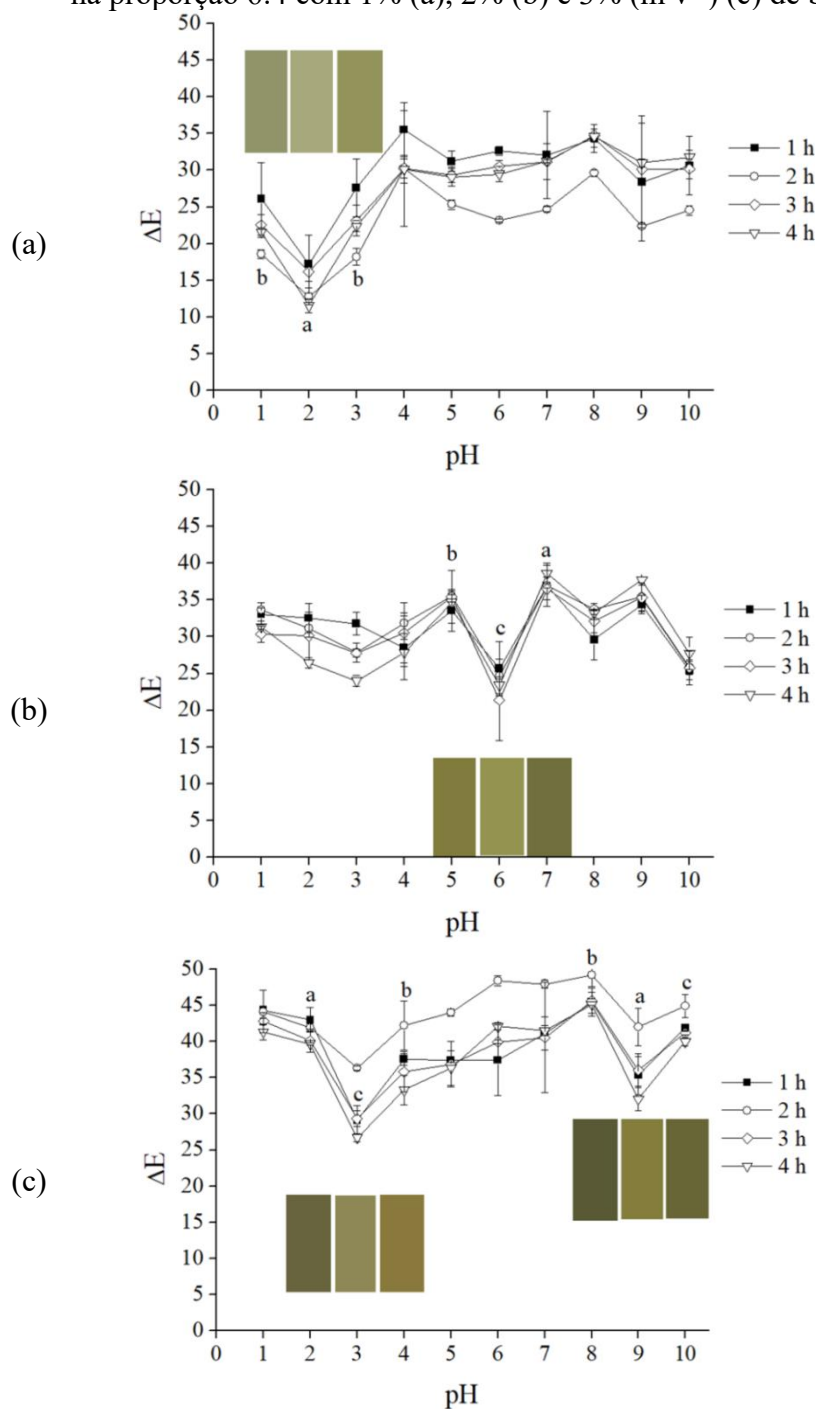
Potencial aplicação também foi verificada para o indicador contendo 2% (m v^{-1}) de biomassa da Figura 6(b) que mostra alteração na cor entre o pH 5 e 7 com valores de ΔE superior a 21 e estatisticamente diferentes. Essa faixa de pH abrange uma variedade de alimentos, principalmente, carnes como a bovina que apresenta pH ideal em torno de 5,5 e a carne de frango em aproximadamente 5,7. Quando ocorre a contaminação microbiológica devido a fatores extrínsecos como temperatura e umidade ou manipulação inadequada dos alimentos, o pH das carnes pode alcançar valores próximos a 7,2 (HOPKIN et al., 2014; SANFELICE et al., 2010).

No estudo de Kuswandi et al. (2012), a contaminação em pescado causou alteração no pH e aumentou o valor de nitrogênio básico volátil total, sendo que a deterioração completa de pescado armazenados à temperatura ambiente mostra mudança de pH de 5,8 para valor acima de 6,9 em apenas 22 h. Por esse motivo, o desenvolvimento de indicadores para monitoramento do pH dos alimentos é essencial para diminuir os problemas de qualidade devido ao crescimento de micro-organismos deteriorantes e patogênicos, e assim aumentar segurança alimentar.

Filmes indicadores de pH foram desenvolvidos por Choi et al. (2017) para correlacionar as mudanças de cor do indicador com alterações de pH na carne suína. Os autores verificaram que o pH inicial da carne suína foi 5,8 e, após 48 h de armazenamento à temperatura ambiente indicando a deterioração completa, este valor de pH aumentou para 7,4. Da mesma forma, o indicador colorimétrico apresentou alteração de vermelho para verde conforme ocorreu a deterioração da carne suína. Portanto, o indicador colorimétrico de pH desenvolvido com biomassa *Spirulina* sp. LEB 18 pode ser um método conveniente e visual

para estimar alterações de qualidade em produtos cárneos em tempo real, uma vez que mudanças nos valores de pH são indicativos de deterioração da carne.

Figura 6 – Resposta de cor em função do pH (1-10) para diferentes tempos (1, 2, 3 e 4 h) dos indicadores com espessura de $99,0 \pm 7,7 \mu\text{m}$ e compostos de nanofibras de 8% PLA/4% PEO na proporção 6:4 com 1% (a), 2% (b) e 3% (m v^{-1}) (c) de biomassa.



Letras minúsculas iguais indicam que os resultados não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores de ΔE .

4 CONCLUSÃO

Neste estudo foram desenvolvidos indicadores colorimétricos de pH utilizando a biomassa de microalga *Spirulina* sp. LEB 18 incorporada nas nanofibras de PLA/PEO. A biomassa mostrou-se sensível à alteração de pH (1-10) e a blenda polimérica de 8% PLA/4% PEO na proporção 6:4 produziu nanofibras que permitiram a interação dos íons com a biomassa, fornecendo assim resposta de cor rápida em função do pH. Os indicadores de nanofibras com biomassa quando submetido as variações de pH, resultaram em valores $\Delta E > 12$ detectáveis pelo olho humano indicando diferença absoluta na cor. Esses resultados de nanofibras de PLA/PEO adicionadas de biomassa microalgal apresentam composição apropriada para visualização de alteração da qualidade dos produtos alimentícios. Portanto, o indicador proposto tem potencial para garantir respostas confiáveis às variações de pH, podendo ser aplicado como embalagens de alimentos inteligentes e contribuir para segurança e a qualidade dos alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, S.; GREINER, A.; WENDORFF, J. H. Functional materials by electrospinning of polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 963-991, 2013.
- ALIPPILAKKOTTE, S.; KUMAR, S.; SREEJITH, L. Fabrication of PLA/Ag nanofibers by green synthesis method using Momordica charantia fruit extract for wound dressing applications. **Colloids and Surfaces A**, v. 529, p. 771–782, 2017.
- ASTM (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS). Standard practice for scanning electron microscope beam size characterization. **ASTM E986 – 04**, West Conshohocken, PA, USA, 2010.
- ASTM (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS). Standard test method for assignment of the DSC procedure for determining Tg of a polymer or an elastomeric compound. **ASTM D7426 – 08**, West Conshohocken, 2013.
- ASTM (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS). Standard test method for rapid thermal degradation of solid electrical insulating materials by thermogravimetric method (TGA). **ASTM D3850 – 12**, West Conshohocken, 2013.
- BAI, R.; ZHANG, X.; YONG, H.; WANG, X.; LIU, Y.; LIU, J. Development and characterization of antioxidant active packaging and intelligent Al³⁺-sensing films based on carboxymethyl chitosan and quercetin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 1074-1084, 2019.
- BATALLER, B. G.; CAPAREDA, S. C. A rapid and non-destructive method for quantifying biomolecules in *Spirulina platensis* via Fourier transform infrared – attenuated total reflectance spectroscopy. **Algal Research**, v. 32, p. 341–352, 2018.

- BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, n.3, p. 325-347, 2010.
- BRIZIO, A. P. D. R.; PRENTICE, C. Development of Aa New Time Temperature Indicator for Enzymatic Validation of Pasteurization of Meat Products. **Journal of Food Science**, v. 80, p. 1271-1276, 2015.
- BRIZIO, A. P. D. R.; PRENTICE, C. Development of an intelligent enzyme indicator for dynamic monitoring of the shelf-life of food products. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 30, p. 208–217, 2015.
- CASASOLA, R.; THOMAS, N.L.; TRYBALA, A.; GEORGIADOU, S. Electrospun poly lactic acid (PLA) fibres: effect of different solvent systems on fibre morphology and diameter. **Polymer**, v. 55, n. 18, p. 4728 – 4737, 2014.
- CHEN, H.-Z.; ZHANG, M.; BHANDARI, B.; YANG, C.-H. Development of a novel colorimetric food package label for monitoring lean pork freshness. **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, p. 43–49, 2019.
- CHOI, I.; LEE, J. Y.; LACROIX, M.; HAN, J. Intelligent pH indicator film composed of agar/potato starch and anthocyanin extracts from purple sweet potato. **Food Chemistry**, v. 218, p. 122–128, 2017.
- COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. **Microalgae for food production**. In Soccol, C. R.; Pandey, A.; Larroche, C. (Eds.), *Fermentation Process Engineering in the Food Industry*, Taylor & Francis, p. 486, 2013.
- DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUI, C. O.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 261 – 269, 2002.
- EU. **Commission regulation of active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food**. N° 450/2009 of 29 May 2009, OJL135,30.05.2009, 3., 2009.
- GADEA, R.; FUENTES, M. Á. F.; PULIDO, R. P.; GÁLVEZ, A.; ORTEGA, E. Adaptive tolerance to phenolic biocides in bacteria from organic foods: Effectson antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses. **FoodResearch International**, v. 85, p. 131–143, 2016.
- HAIDER, S.; AL-ZEGHAYER, Y.; ALI, F. A.; HAIDER, A.; MAHMOOD, A.; AL-MASRY, W.; IMRAN, M.; AIJAZ, M. Highly aligned narrow diameter chitosan electrospun nanofibers. **Journal of Polymer Research**, v. 20, n. 4, p. 1–11, 2013.
- HOPKIN, D. L.; PONNAMPALAM, E. N.; VAN DE VEN, R. J.; WARNER, R. D. The effect of pH decline rate on the meat and eating quality of beef carcasses. **Animal Production Science**, v. 54, p. 407–413, 2014.
- HUSSAIN, M. M.; ASIRI, A. M.; ARSHAD, M. N.; RAHMAN, M. M. Development of selective Co²⁺-ionic sensor based on various derivatives of benzenesulfonohydrazide (BSH) compound: An electrochemical approach. **Chemical Engineering Journal**, v. 339, p. 133–143, 2018.

JAWOREK, A.; KRUPA, A.; LACKOWSKI, M.; SOBCZYK, A. T.; CZECH, T.; RAMAKRISHNA, S.; SUNDARRAJAN, S.; PLISZKA, D. Nanocomposite fabric formation by electrospinning and electrospraying technologies. **Journal of Electrostatics**, v. 67, p. 435–438, 2009.

JEBEL, F. S.; ALMASI, H. Morphological, physical: Antimicrobial and release properties of ZnO nanoparticles-loaded bacterial cellulose films. **Carbohydrate Polymers**, v. 149, p. 8–19, 2016.

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

KUSWANDI, B.; JAYUS; RESTYANA, A.; ABDULLAH, A.; HENG, L. Y.; AHMAD, M. A novel colorimetric food package label for fish spoilage based on polyaniline film. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 184–189, 2012.

KUSWANDI, B.; NURFAWAIDI, A. On-package dual sensors label based on pH indicators for real-time monitoring of beef freshness. **Food Control**, v. 82, p. 91–100, 2017.

LI, Y.; YU, J.; DING, B. **Facile and ultrasensitive sensors based on electrospinning-netting nanofibers/net**. In Macagnano, A.; Zampetti, E.; Kny, E. (Eds), *Electrospinning High Perform. Sensors*, Springer, p. 1–34, 2015.

MACAGNANO, A.; ZAMPETTI, E.; KNY, E. *Electrospinning for high performance sensors*. Springer, 2015.

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

MAFTOONAZAD, N.; RAMASWAMY, H. Design and testing of an electrospun nanofiber mat as a pH biosensor and monitor the pH associated quality in fresh date fruit (*Rutab*). **Polymer Testing**, v. 75, p. 76–84, 2019.

MARKOU, G.; NERANTZIS, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1532–1542, 2013.

MERCANTE, L. A.; SCAGION, V. P.; MIGLIORINI, F. L.; MATTOSO, L. H. C.; CORREA, D. S. Electrospinning-based (bio)sensors for food and agricultural applications: A review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 91, p. 91–103, 2017.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in Southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, n. 1–2, p. 60–64, 2009.

MORAIS, M. G.; VAZ, B. S.; MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V. Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–15, 2015.

MOREIRA, J. B.; TERRA, A. L. M.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Development of pH indicator from PLA/PEO ultrafine fibers containing pigment of microalgae origin.

International Journal of Biological Macromolecules, v. 118, p. 1855–1862, 2018.

PAI, A. J.; SAROJINI, B. K.; HARSHITH, K. R.; HOLLA, B. S.; LOBO, A. G. Spectral, morphological and optical studies on bischalcone doped polylactic acid (PLA) thin films as luminescent and UV radiation blocking materials. **Optical Materials**, v. 90, p. 145–151, 2019.

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

POURJAVAHHER, S.; ALMASI, H.; MESHKINI, S.; PIRSA, S.; PARANDI, E. Development of a colorimetric pH indicator based on bacterial cellulose nanofibers and red cabbage (*Brassica oleraceae*) extract. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 193–201, 2017.

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

PRIETTO, L.; PINTO, V. Z.; EL HALAL, S. L. M.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; LIM, L.-T.; DIAS, A. R. G.; ZAVAREZE, E. R. Ultrafine fibers of zein and anthocyanins as natural pH indicator. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 1, p. 1–9, 2018.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of micro algae: a review. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 3, n. 4, p. 89–100, 2012.

RAMAKRISHNA, S.; FUJUHARA, K.; TEO, W. E.; LIM, T. C.; MA, Z. **An introduction to electrospinning and nanofibers**. Singapore: World Scientific Publishing Company, 2005.

RAO, B. N.; SUVARNA, R. P. A study on optical properties of poly (ethylene oxide) based polymer electrolyte with different alkali metal iodides. **AIP Conference Proceedings**, v. 1728, p. 020076, 2016.

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

ROBERTSON, G.L. **Food packaging: principles and practice**. 3 ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, pp 414–420, 2013.

SALIU, F.; DELLA-PERGOLA, R. Carbon dioxide colorimetric indicators for food packaging application: Applicability of anthocyanin and poly-lysine mixtures. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 258, p. 1117–1124, 2018.

SANFELICE, C., MENDES, A. A., KOMIYAMA, C. M., CAÑIZARES, M. C., RODRIGUES, L., CAÑIZARES, G. I., ROÇA, R. O., ALMEIDA, I. C. L. P., BALOG, A., MILBRADT, E. L., CARDOSO, K. F. G. Evaluation and characterization of breast quality of broiler breeder hen in the end of productive cycle. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 166–170, 2010.

SCHMATZ, D. A.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. A novel nanocomposite for food packaging developed by electrospinning and electrospraying. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 20, p. 100314, 2019.

TAOUKIS, P. S. **Application of time–temperature integrators for monitoring and management of perishable product quality in the cold chain**. Smart packaging technologies for fast moving consumer goods, p. 61–74. John Wiley & Sons, 2008.

TASSANAWAT, S.; PHANDEE, A.; MAGARAPHAN, R.; NITHITANAKUL, M.; MANUSPIYA, H. pHsensitive PP/clay nanocomposites for beverage smart packaging, in: Proceedings of the 2nd IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, INSPEC: 9539713, IEEE Publisher, Thailand, p. 16–99, 2007.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TRIBESS, T. B.; TADINI, C. C. Inactivation kinetics of pectin methylesterase in orange juice as a function of pH and temperature/time process conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1328-1335, 2006.

VANDERROOST, M.; RAGAERT, P.; DEVLIEGHERE, F.; MEULENAER, B. Intelligent food packaging: The next generation. **Trends in Food Science and Technology**, v. 39, n.1, p. 47–62, 2014.

VEGARA, S.; MARTI, N.; LORENTE, J.; COLL, L.; STREITENBERGER, S.; VALERO, M.; SAURA, D. Chemical guide parameters for Punica granatum cv. ‘Mollar’ fruit juices processed at industrial scale. **Food Chemistry**, v. 147, p. 203–208, 2014.

YUAN, Y.; LEE, T. R. **Contact Angle and Wetting Properties**, p. 3–34, 2013.

ZAJKO, S.; KLIMANT, I. The effects of different sterilization procedures on the optical polymer oxygen sensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 177, p. 86–93, 2013.

ZHAI, X.; SHI, J.; ZOU, X.; WANG, S.; JIANG, C.; ZHANG, J.; HOLMES, M. Novel colorimetric films based on starch/polyvinyl alcohol incorporated with roselle anthocyanins for fish freshness monitoring. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 308–317, 2017.

ZHANG, M.; ZHAO, X.; ZHANG, G.; WEI, G.; SU, Z. Electrospinning design of functional nanostructures for biosensor applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, p. 1699–1711, 2017.

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

ARTIGO II

EXTRATOS DE MICROALGAS E FICOCIANINA ADICIONADOS AS NANOFIBRAS:
AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA COR PARA POTENCIAL APLICAÇÃO EM
EMBALAGENS INTELIGENTES

RESUMO

EXTRATOS DE MICROALGAS E FICOCIANINA ADICIONADOS AS NANOFIBRAS: AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA COR PARA POTENCIAL APLICAÇÃO EM EMBALAGENS INTELIGENTES

A incorporação de compostos colorimétricos de microalgas em nanofibras é alternativa para o desenvolvimento de indicador colorimétrico de pH, por apresentar alta capacidade de reatividade e sensibilidade ao ambiente circundante. Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a estabilidade da cor de nanofibras indicadoras de pH desenvolvidas a partir de extrato de microalga *Chlorella fusca* LEB 111 e ficocianina durante armazenamento. As nanofibras foram preparadas com 8% (m v⁻¹) de poli(ácido láctico) e 4% (m v⁻¹) de óxido de polietileno na proporção 6:4. Extratos de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 foram adicionados individualmente à solução polimérica na concentração de 3% (m v⁻¹) bem como 1% (m v⁻¹) de ficocianina. O indicador contendo 3% (m v⁻¹) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 e 1% (m v⁻¹) de ficocianina mostrou maior variação de ângulo *hue* (133 a 225°) e valores $\Delta E \geq 5$ perceptível a olho humano entre pH 3 e 8. Além disso, alterou a coloração de azul-esverdeada em pH 5, para azul em pH 6 e verde em pH 7. O material não apresentou perda da capacidade colorimétrica após 9 meses de armazenamento e mostrou estabilidade da cor em temperaturas de -16 e 4 °C. Assim, o indicador desenvolvido com nanofibras contendo extrato de microalga e ficocianina é promissor para aplicação no controle da qualidade de alimentos perecíveis com taxa de deterioração na faixa de pH de 5 a 7, em condições refrigeradas ou de congelamento.

Palavras-chave: Biomassa. Clorofila. *Electrospinning*. Indicador colorimétrico.

1 INTRODUÇÃO

Sistemas como as embalagens inteligentes têm sido estudadas para promover a segurança alimentar (BALBINOT-ALFARO et al., 2019; YILDIZ; SUMNU; KAHYAOGU, 2021). Essas embalagens são baseadas na aplicação de indicadores colorimétricos como parte integrante da embalagem ou como rótulos (MOREIRA et al., 2020). O crescimento microbiano e modificações bioquímicas alteram o pH e diminuem o frescor dos produtos alimentícios (FANG et al., 2017; KUSWANDI, 2017; MÜLLER; SCHMID, 2019; POYATOS-RACIONERO et al., 2018). Os indicadores de pH são capazes de fornecer informações sobre a qualidade e segurança dos alimentos aos consumidores emitindo sinal visual em resposta a deterioração do produto em tempo real (KANG et al., 2018; ZHAI et al., 2018). A capacidade de alteração de cor nos indicadores ocorre devido a presença de corantes sensíveis ao pH integrados às matrizes sólidas. Neste contexto, os corantes naturais tornam-se alternativa como substituição aos sintéticos, pois são ambientalmente corretos, atóxicos e biocompatíveis com células e tecidos (MAHDAVI et al., 2014; ZHANG; LU; CHEN, 2014).

Spirulina e *Chlorella* são microalgas com certificação *Generally Recognized as Safe* (GRAS) emitido pelo *Food and Drug Administration* (FDA), que permite sua aplicação na produção de alimentos funcionais, nutracêuticos e rações animais (MORAIS et al., 2015). *Spirulina* é fonte de diversos pigmentos fotossintéticos como carotenoides, ficocianina e clorofila com potencial aplicação na indústria alimentícia (VAZ et al., 2016). De acordo com as condições de cultivo microalgal, a ficocianina é encontrada em alta concentração ($13,17 \pm 1,78 \text{ mg mL}^{-1}$) na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (DEAMICI; COSTA; SANTOS, 2016). Esse pigmento apresenta coloração azul e está localizado na membrana tilacoide de microalgas verde-azuladas (PATEL et al., 2019). Além disso, a ficocianina é considerada um complexo proteína-pigmento, instável a temperaturas superiores a ambiente e soluções ácidas/alcalinas (ZHANG et al., 2021b).

Chlorella também é fonte de pigmentos como carotenoides e clorofilas a e b (BAUER et al., 2017). Clorofilas tem a função como receptor de luz para direcionar a fotossíntese (MACINTYRE et al., 2002). O conteúdo de clorofilas presentes na biomassa de *Chlorella* pode variar entre 4,0 e 8,9 mg L^{-1} (BAUER et al., 2017). A clorofila é responsável pela coloração verde brilhante nas microalgas que em condições ácidas transforma-se em feofitina. Essa transformação ocorre devido à perda de íons de magnésio da estrutura da clorofila, resultando na alteração da cor para verde intenso ou castanho (GUNAWAN; BARRINGER, 2000; KOCA; KARADENIZ; BURDURLU, 2007; QU et al., 2020). Desta forma, considerando a preferência do consumidor por produtos naturais, a ficocianina e as microalgas *Spirulina* e *Chlorella* apresentam potencial para aplicação como indicadores colorimétricos de pH.

Os compostos naturais podem ser incorporados em matrizes poliméricas para o desenvolvimento de indicadores colorimétricos. Nanofibras produzidas por *electrospinning* são alternativa para encapsulação desses compostos os quais apresentam potencial utilização como indicadores de pH (KUNTZLER et al., 2020). Essas nanoestruturas apresentam diâmetro na nanoescala que proporciona elevado contato superficial da nanofibra com os alimentos, resultando na maior interação dos sítios ativos (KUNTZLER et al., 2018; ZHAO et al., 2020). Além disso, a elevada porosidade das nanofibras permite maior sensibilidade de detecção e reatividade dos compostos com o pH do alimento, resultando na rápida alteração da cor (TOPUZ; UYAR, 2020).

Polímeros com propriedades funcionais e características ecológicas como poli(ácido láctico) (PLA) e óxido de polietileno (PEO) são utilizados para o desenvolvimento das nanofibras. O PLA é hidrofóbico, atóxico, biodegradável, pode ser obtido de fontes

naturais e aprovado para utilização em embalagem de alimentos pelo FDA (DHALL; ALAM, 2020). O PEO tem caráter hidrofílico que permite a interação dos corantes com o alimento, além de ser biocompatível com células e tecidos e biodegradável (AMIRI et al., 2020; SAFI et al., 2007). Neste contexto, o grupo de pesquisa é o pioneiro no desenvolvimento de embalagens inteligentes de nanofibras com compostos colorimétricos de microalga. Assim, o diferencial deste estudo é aprimorar a performance do indicador de pH, através da adição de extratos de diferentes microalgas com ficocianina em nanofibras poliméricas. Desta forma, o objetivo do estudo foi avaliar a estabilidade da cor de nanofibras indicadoras de pH desenvolvidas a partir de extrato de microalga *Chlorella fusca* LEB 111 e ficocianina durante armazenamento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Os polímeros utilizados foram poli(ácido láctico) (PLA) (6201D) (3,1 densidade relativa) da Nature Works LLC (Minnetonka, Estados Unidos) e o óxido de polietileno (PEO) (massa molar 600 kDa) da Sigma-Aldrich® (EUA). A ficocianina foi obtida da Zhejiang Binmei Biotechnology (China) e os solventes utilizados foram o clorofórmio e metanol (Synth, Brasil).

2.2 OBTENÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL

A biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi cultivada na planta piloto do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) localizada às margens da Lagoa Mangueira (33° 30' 13" S; 53° 08' 59" W) em biorreatores tipo *raceway* de 10000 L (MORAIS et al., 2009). A biomassa da microalga *Chlorella fusca* LEB 111 foi cultivada com meio BG-11 no Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG (DUARTE et al., 2017).

2.3 PREPARO DA BIOMASSA E DOS EXTRATOS DE MICROALGAS

O tamanho das partículas de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foi padronizada em peneira de aço inox com abertura de 400 mesh (Granutest, Brasil). Posteriormente, a biomassa foi macerada com nitrogênio líquido (50 mL) durante 30 min para liberação dos biocompostos e redução das partículas. Após, a biomassa foi armazenada sob refrigeração a 4 °C. Os extratos de microalgas foram obtidos com 5 g de cada biomassa seca e 30 mL de

metanol sob agitação orbital (New Brunswick, I44, Alemanha) a 100 rpm, 4 °C por 24 h. Ao final, a suspensão foi centrifugada (2000 g) (Kasvi, K14-4000, Brasil) por 10 min e o sobrenadante (extrato) armazenado a 4 °C.

2.4 ALTERAÇÃO DE COR DA FICOCIANINA E DOS EXTRATOS DE MICROALGAS

A capacidade de variação de cor dos extratos em função do pH foi avaliada por espectrofotometria (UVmini-1240 Shimadzu, Japão). Para isso, os extratos de *Spirulina* sp. LEB 18, *Chlorella fusca* LEB 111 e a ficocianina foram adicionados em soluções com variação de pH entre 1 e 10. Após, realizou-se varredura em espectro de 200 a 800 nm. As soluções tampão foram compostas de mistura de cloreto de potássio e ácido clorídrico para pH 1-2, ácido clorídrico glicina para pH 3, citrato para pH 4, 5, 6 e 7 e fosfato para pH 8, 9 e 10. Todas as soluções foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C.

2.5 SOLUÇÕES POLIMÉRICAS E PROCESSO DE *ELECTROSPINNING*

As soluções poliméricas foram preparadas com blenda de 8% (m v⁻¹) de PLA e 4% (m v⁻¹) de PEO na proporção 6:4 solubilizadas em clorofórmio:metanol (8:2) (Kuntzler et al., 2020). A biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (Sp), o extrato de *Spirulina* sp. LEB 18 (ESp) e *Chlorella fusca* LEB 111 (ECh), e ficocianina (Fc) foram adicionados nas soluções poliméricas conforme Tabela 1. Todas as soluções foram solubilizadas por 16 h em agitador magnético a 1800 rpm (Fisatom, Brasil) em temperatura ambiente (22 ± 4 °C).

O equipamento de *electrospinning* consiste em bomba de deslocamento positivo (Modelo KDS 100, KD Scientific, Estados Unidos) e fonte de corrente contínua de alta tensão (Modelo ET 5000 CC, Electric Test Sert, Brasil). As condições do processo foram determinadas de acordo com Kuntzler et al. (2020). Todos os processos foram conduzidos à 21 °C e umidade relativa do ar de 45±5%.

2.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS NANOFIBRAS

A morfologia e diâmetro das nanofibras foram analisadas com imagens de microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Jeol JSM-6610 LV, Japão). Para isso, amostras foram fixadas em suporte metálico e recobertas com ouro utilizando o metalizador *diode sputtering* (Denton Vacuum CAR001-0038, Estados Unidos), para visualização das imagens (ASTM E986-04, 2010). O diâmetro médio de cada imagem de MEV das nanofibras (n = 60) foi analisado pelo software ImageJ.

Tabela 1 – Composição de biomassa e extrato microalgal com ficocianina nas soluções poliméricas contendo 8% (m v⁻¹) de PLA e 4% (m v⁻¹) de PEO para produção de nanofibras indicadoras de pH.

Composições	Biomassa Sp (% m v ⁻¹)	Ficocianina (% m v ⁻¹)	Extrato Sp (% v v ⁻¹)	Extrato Ch (% v v ⁻¹)
4Sp	4	-	-	-
5Sp	5	-	-	-
2Sp/1Fc	2	1	-	-
2Sp/2Fc	2	2	-	-
2Sp/3Fc	2	3	-	-
3ESp	-	-	3	-
3ECh	-	-	-	3
3ESp/1Fc	-	1	3	-
3ECh/1Fc	-	1	-	3

2.7 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A eficiência de encapsulação (EE) da ficocianina nas nanofibras foi avaliada adicionando 10 mg de amostra em 4 mL de água destilada. As amostras foram agitadas em vórtex (Phoenix-Luferco, AP 59, Brasil) por 15 min para solubilização da ficocianina encapsulada em meio aquoso. A absorbância foi obtida em espectrofotômetro a 615 nm (A₆₁₅) e 652 nm (A₆₅₂), sendo determinada a concentração de ficocianina (FC, mg mL⁻¹) de acordo com a Equação 1 (BENNETT; BOGORAD, 1971).

$$FC = (A_{615} - 0,474 A_{652}) / 5,34 \quad (1)$$

A EE (% m m⁻¹) foi calculada pela razão da massa de ficocianina encapsulada em 1 mL de solução polimérica e a massa total de ficocianina adicionada na solução polimérica no início do processo de *electrospinning* (ZHU et al., 2015).

2.8 AVALIAÇÃO DOS INDICADORES DE pH

2.8.1 Propriedades da cor

As nanofibras contendo biomassa, extratos de microalgas e ficocianina foram seccionadas em seções de 20 x 20 mm. Após, estes materiais foram submersos em cada solução tampão (pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0) por 5 min a 25 °C. Nesta faixa de pH ocorre a

deterioração da maioria dos alimentos perecíveis. Os parâmetros de cor dos indicadores de pH foram determinados utilizando colorímetro (Modelo Chroma Meter CR-400/410, Konica Minolta, Japão) e sistema CIELab. Três medidas foram realizadas para cada indicador, e os valores de L^* (luminosidade), a^* (vermelho/verde) e b^* (amarelo/azul) foram medidos. A média dos valores de L^* , a^* e b^* foi utilizada no cálculo da diferença total de cor (ΔE), de acordo com a Equação 2.

$$\Delta E = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2} \quad (2)$$

Em que: $\Delta L^* = L - L_0^*$; $\Delta a^* = a - a_0^*$ e $\Delta b^* = b - b_0^*$

Os parâmetros de ângulo *Hue* e *Chroma* foram calculados através das Equações 3 e 4:

$$Hue = \tan^{-1}(b^*/a^*) \quad (3)$$

$$Chroma = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (4)$$

Em que: a^* e b^* são os parâmetros do sistema CIELab.

2.8.2 Estabilidade da cor em função do tempo e temperatura

O indicador contendo extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 e 1% ($m\ v^{-1}$) de ficocianina foi avaliado quanto a variação da cor em função do tempo e temperatura. A estabilidade da cor do indicador foi realizada de acordo com Mohammadlinejad, Almasi, Moradi (2020) com modificações. O indicador foi submerso em tampão pH 7 e armazenado em ambiente (25 °C), refrigeração (4 °C) e congelamento (-16 °C) durante 5 dias. As alterações de cor foram avaliadas a cada dia de armazenamento e comparadas com a coloração do indicador sem contato com a solução tampão.

A estabilidade da cor em função do tempo foi avaliada de acordo Tirtashi et al. (2019) com modificações. A nanofibra indicadora foi armazenada durante 9 meses a 25 °C e umidade controlada. Após, esse material foi imerso em soluções tampão de pH entre 3,0 e 8,0 por 5 min a 25 °C, para a comparação da coloração com os indicadores no tempo zero. Os parâmetros de cor das análises de estabilidade foram obtidos como descrito na Equação 2. Em que L_0^* , a_0^* e b_0^* são os valores correspondentes aos indicadores sem o tratamento com solução tampão (controle).

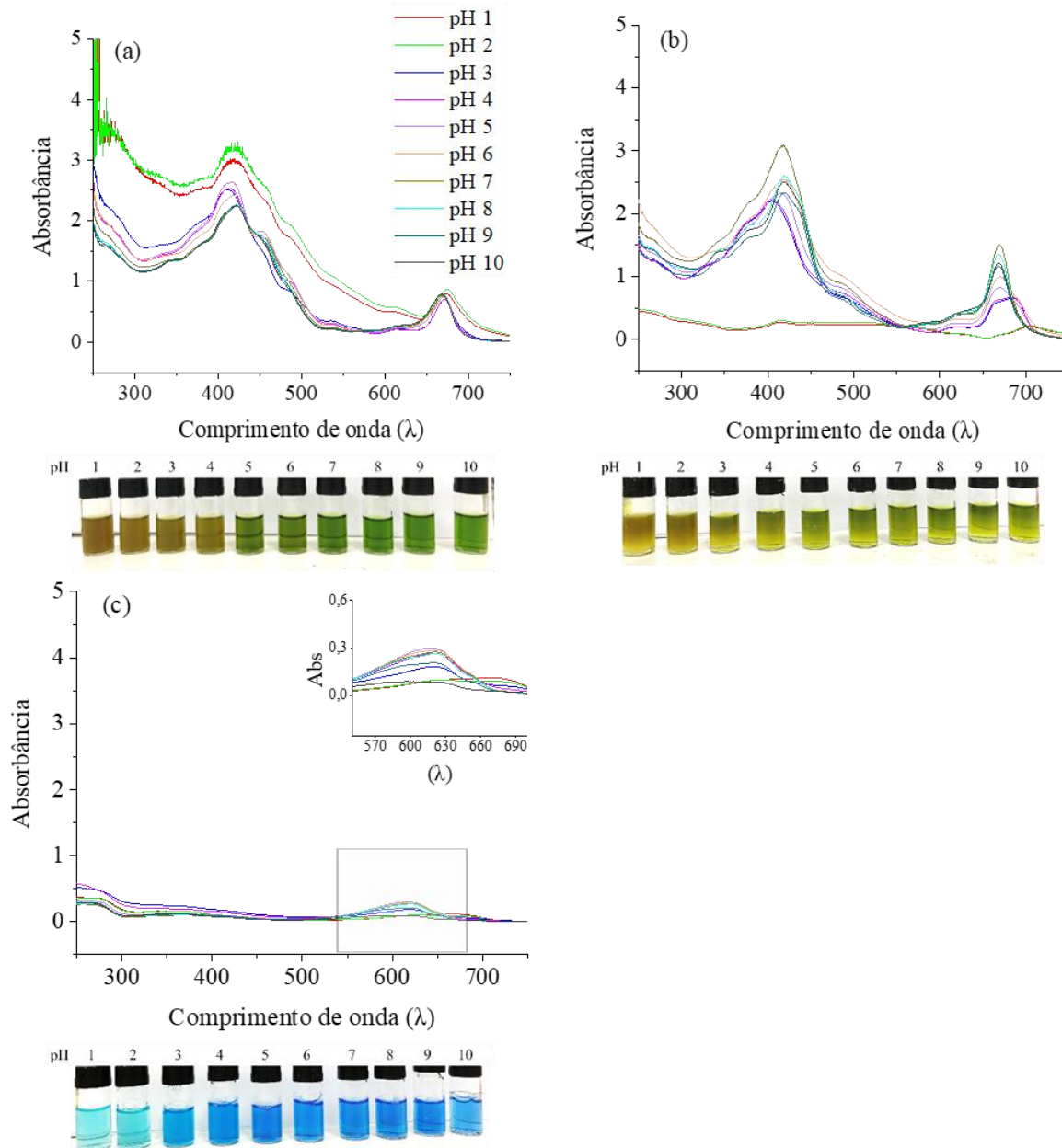
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 INTERAÇÃO DOS EXTRATOS DE MICROALGAS E FICOCIANINA EM DIFERENTES SOLUÇÕES DE pH

A variação de cor da ficocianina e dos extratos de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 foi observada após exposição a diferentes soluções de pH. O extrato de *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou coloração castanho entre pH 1 e 3, verde oliva entre pH 5 e 7 e verde brilhante em pH entre 8-10 (Figura 1a). O extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 mostrou perfil colorimétrico similar, porém em tonalidades mais claras. A coloração verde dos extratos está relacionada a presença de clorofila nas biomassas das microalgas. Esse pigmento é responsável pela fotossíntese nas microalgas e ao natural expressam a coloração verde intensa. As clorofilas em pH ácido degradam-se em feofitina e feoforbida resultando em coloração verde intensa, amarela ou castanho (ANDRÉS-BELLO et al., 2013). Durante esta reação, os íons de hidrogênio transformam as moléculas de clorofila em feofitinas, substituindo o íon magnésio do anel de porfirina (MARQUEZ; SINNECKER, 2007). Além disso, a degradação da clorofila é inibida em ambiente alcalino (JAMRÓZ et al., 2019), portanto é difícil a visualização de alteração da cor verde nos extratos em pH de 8 a 10.

Os espectros de UV-vis dos extratos mostraram dois picos de absorção em 410–430 e 650–670 nm na faixa de pH 1 a 10 (Figura 1a). Os picos de absorção são referentes a presença da clorofila. No entanto, observa-se diferença de intensidade das bandas de absorção dos extratos nos pH 1 e 2, devido a formação de agregados do monômero de clorofila na presença de solução ácida (QU et al., 2020). A intensidade menor das bandas de absorção (pH 1 e 2) (Figura 1b) pode estar relacionado a rápida degradação da clorofila do extrato de *Chlorella fusca* LEB 111. A intensidade maior em pH 1 e 2 (Figura 1a) do extrato de *Spirulina* sp. LEB 18 sugere a presença dos monômeros de clorofila ainda não degradados totalmente pelas soluções ácidas. Na Figura 1b, observa-se que o pico de absorção de 650–670 nm, em pH ácidos segmentou-se em duas partes, devido a formação do polímero pelos monômeros nestas condições de pH (QU et al., 2020). À medida que o pH se aproxima da neutralidade, a divisão desaparece e há a predominância do pico em torno de 670 nm. As bandas referentes a faixa de pH alcalino dos extratos permaneceram com o mesmo perfil de intensidade, indicando que a clorofila não sofreu degradação. A coloração verde observada nas imagens das soluções confirma esta afirmação.

Figura 1 – Espectro UV-Vis e coloração das soluções de extratos de microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 (a), *Chlorella fusca* LEB 111 (b) e ficocianina (c) expostas em pH de 1 a 10.



Na Figura 1c, observa-se a estabilidade da cor da ficocianina entre pH 3 e 9. Terra et al. (2021) verificou o mesmo perfil de alteração de cor de soluções contendo 1 e 2% (m v⁻¹) de ficocianina. Os espectros de UV-vis da Figura 1c mostram duas áreas de absorção localizadas nas faixas de 260-280 e 610-630 nm. Esses picos estão relacionados com a absorção de aminoácidos aromáticos e complexo proteína-pigmento (ficocianobilina), respectivamente. A menor intensidade dos picos na faixa de 610-630 nm é referente ao pH 1, 2 e 10, confirmando que nessas soluções o pigmento sofreu degradação e consequente perda da coloração. Wu et al. (2016) atribuíram a menor intensidade dos picos de absorção a

estrutura da ficocianina que é desdobrada, dissociando em monômeros e resultando na precipitação da proteína.

A estrutura da ficocianina é composta por α e β subunidades. A ficocianobilina pertencente as subunidades α e β , é ligada covalentemente ao monômero através de resíduos de cisteína (FERRARO et al., 2020; SHEN; SCHLUCHTER; BRYANT, 2008; TONG et al., 2020). Essa configuração da molécula é responsável pela modificação das cores do pigmento em contato com as soluções de pH. Dessa forma, a suscetibilidade de mudança de coloração dos extratos de microalgas e ficocianina torna possível a aplicação destes individualmente ou em combinações para o desenvolvimento de indicador de pH.

3.2 DIFERENÇA TOTAL DE COR DOS INDICADORES EM RELAÇÃO AO pH

Kuntzler et al. (2020) observaram que as nanofibras de PLA/PEO com 2 e 3% (m v^{-1}) de biomassa produziram resultados promissores de ΔE para aplicação como indicadores de pH. Por isso, adição de maiores concentrações (4 e 5% m v^{-1}) de biomassa nas nanofibras foram propostas no presente estudo para verificar se o aumento de ΔE é diretamente proporcional ao conteúdo de biomassa. A Figura 2a apresenta que o comportamento de ΔE do indicador contendo 4% (m v^{-1}) de biomassa entre pH 3 e 8 diminuiu de 11,1 até 3,3, com baixa variação de ΔE . O indicador com 5% (m v^{-1}) de biomassa apresentou ΔE próximos de 10 entre os valores de pH de 4 e 7. Essa diferença de cor é em média 71 e 73% inferior na mesma faixa de pH aos resultados obtidos por Kuntzler et al. (2020) para indicadores contendo 2 e 3% de (m v^{-1}) biomassa, respectivamente. Portanto, elevadas concentrações de biomassa dificultam a interação do composto com íons H^+ das soluções de pH, proporcionando baixa sensibilidade da coloração em ambos os indicadores.

Uma alternativa para aumentar o espectro de cor dos indicadores com biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foi a adição de 1, 2 e 3% (m v^{-1}) ficocianina. No estudo de Kuntzler et al. (2020), o indicador com 2% (m v^{-1}) de biomassa apresentou amplitude de ΔE significativamente maior do que o indicador com 3% (m v^{-1}) de biomassa, entre os pH 5 e 7, o que permite aplicação em diversos alimentos. Por isso, a ficocianina foi adicionada nas nanofibras contendo 2% (m v^{-1}) de biomassa. Na Figura 2b, destacam-se os indicadores contendo 2 e 3% (m v^{-1}) de ficocianina por apresentaram valores de ΔE superiores a 5 na faixa de pH de 3 a 8. Especificamente, o indicador com 3% (m v^{-1}) de ficocianina em pH 6, 7 e 8 apresentou valores de ΔE iguais ou superiores a 12, indicando a diferença de cor absoluta pelo olho humano. No entanto, em todos os indicadores foi observado que ao aumentar a

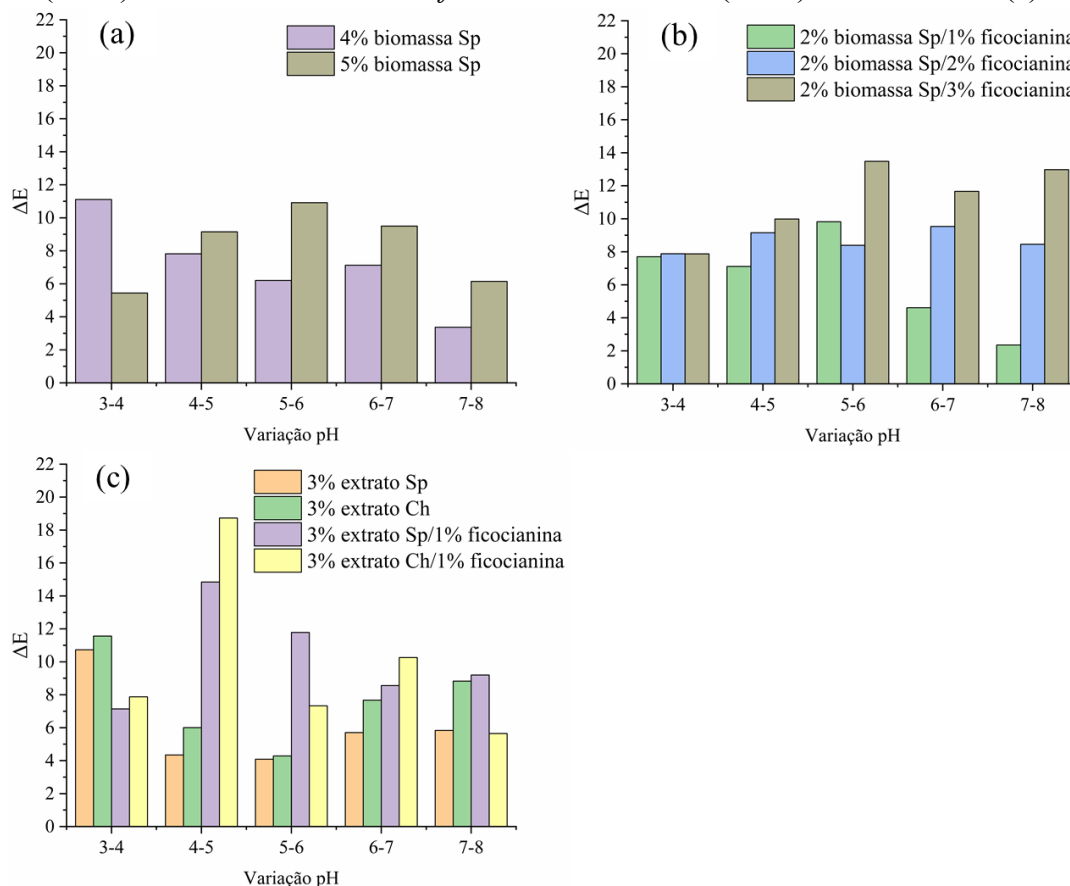
concentração de ficocianina provocou a liberação do pigmento na mesma proporção para o meio.

Os indicadores formados de nanofibras de PLA/PEO contendo extratos de microalgas exibiram alterações de cor semelhantes entre si, variando do amarelo ao verde claro em valores de pH 3 e 4 e entre 5 e 8, respectivamente (Figura 2c). As nanofibras contendo 3% (v v⁻¹) de extrato de *Spirulina* sp. LEB 18 (Figura 2a) em pH 3 e 4 apresentaram ΔE em torno de 10. No entanto, em valores de pH entre 5 e 8 resultou em baixo ΔE com valores de 4,2 a 5,8. Além disso, a amplitude de ΔE entre a faixa de pH 4 e 8 manteve-se baixa ou constante, o que dificulta a identificação de mudança de pH pelo consumidor. Segundo Sun et al. (2019), a diferença de cor pode ser percebida visualmente pelos olhos humanos quando o valor de ΔE for maior do que 5,0, e a diferença de cor absoluta é considerada quando o valor de ΔE for superior ao 12. Portanto, o indicador contendo extrato de *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou maior ΔE entre pH 3 e 4, representando potencial aplicação na identificação da deterioração de sucos cítricos. Segundo Silva et al. (2021) o pH ótimo do suco de laranja é cerca de 4, no entanto se houver a fermentação por *Lactobacillus acidophilus*, o pH é reduzido para 3,6.

As nanofibras contendo 3% (v v⁻¹) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 apresentaram maiores valores de ΔE em relação a amostra contendo extrato de *Spirulina* sp. LEB 18. Os valores de ΔE variam de 11,5 a 7,5 em pH de 3 a 8. No entanto, entre pH 5 e 6, o ΔE permaneceu menor do que 5, considerado abaixo da capacidade de visualização da cor a olho humano. Esse comportamento também foi verificado no indicador contendo extrato de *Spirulina* sp. LEB 18, o que pode estar relacionado com a estabilidade da clorofila em pH 5 e 6, que mantém a coloração verde oliva nas amostras. Portanto, as nanofibras contendo extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 apresentam maior potencial de aplicação em diversos alimentos, pois é possível identificar a mudança absoluta da coloração pelos consumidores.

A adição de 1% (m v⁻¹) de ficocianina nos indicadores contendo extratos microalgais aumentou os valores de ΔE , mantendo-se superiores a 5, indicando que a presença da ficocianina resulta na maior percepção da cor. A sequência de cores dos indicadores foi verde claro (pH 3 e 4), azul-esverdeado (pH 5), azul (pH 6) e verde (pH 7 e 8). Terra et al. (2021) utilizaram 0,5% (m v⁻¹) de ficocianina para o desenvolvimento de indicadores de nanofibras poliméricas contendo 2% (m v⁻¹) de curcumina. Os autores observaram que 66,7% dos resultados do ΔE foram superiores às outras condições (nanofibras com 2% (m v⁻¹) de curcumina e nanofibras com 2% (m v⁻¹) de curcumina e 1% (m v⁻¹) de ficocianina), confirmando que a adição de ficocianina melhora os valores de ΔE .

Figura 2 – ΔE dos indicadores de PLA/PEO com 4 e 5% (m v^{-1}) de biomassa *Spirulina* sp. LEB 18 (a); 2% (m v^{-1}) de biomassa *Spirulina* sp. LEB 18 + 1, 2 ou 3% (m v^{-1}) de ficocianina (b); 3% (m v^{-1}) de extrato de *Spirulina* sp. LEB 18 (Sp), 3% (m v^{-1}) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 (Ch), 3% (m v^{-1}) de extrato *Spirulina* sp. LEB 18 + 1% (m v^{-1}) de ficocianina, 3% (m v^{-1}) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 + 1% (m v^{-1}) de ficocianina (c).



O melhor comportamento de alteração de cor em função do pH foi observado no indicador contendo extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 com ficocianina (Figura 2c), pois apresentou a maior amplitude de ΔE entre os valores de pH. Essa variação apresenta elevada percepção de cor, mostrando que o indicador alterou a coloração de azul-esverdeado em pH 5, para azul em pH 6 e verde em pH 7. Esse resultado proporciona maior sensibilidade de visualização das cores pelos consumidores. Nesta faixa de pH, encontram-se diversos alimentos perecíveis com alta taxa de contaminação microbiana. O pH ideal da carne de frango é aproximadamente 5,9, no entanto em condições inadequadas de armazenamento, os processos microbiológicos são acelerados, resultando em valores de pH em torno de 7,0 (FRANCO et al., 2021).

A contaminação microbiana em carne suína pode levar à produção de alto nível de nitrogênio volátil, que altera o nível de pH da carne. A carne suína fresca apresenta pH de 5,8. O início da contaminação é verificado quando o pH altera para 7,0, sendo que a deterioração completa da carne apresenta pH 8,0 (KOSHY et al., 2021). Em frutos do mar, a contaminação

microbiana e reações bioquímicas aumentam o pH, ocorrendo também o acúmulo de aminas voláteis. O pH ideal do pescado em condições adequadas de armazenamento é 5,6, após 36 h de deterioração o pH aumentou gradualmente para 6,9 (EZATI; BANG; RHIM, 2021). Kuswandi e Nurfawaidi (2017) verificaram que os valores de pH de carne bovina variam de 5,6 no estágio fresco a 6,16 para a deterioração em 8 h em temperatura ambiente.

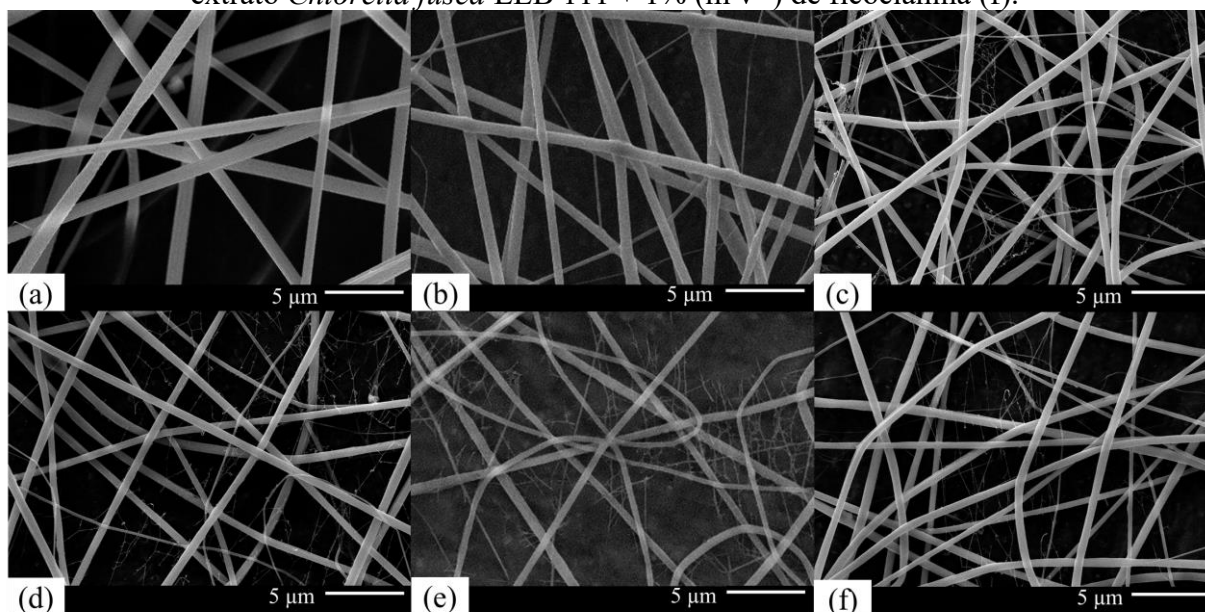
3.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS NANOFIBRAS

A eficiência de encapsulação de 1% (m v^{-1}) de ficocianina nas nanofibras contendo os extratos de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 foi 88 e 90,3%, respectivamente. Locilento et al. (2019) observaram eficiência de encapsulação de $86,8 \pm 1,7\%$ do extrato de semente de uva em nanofibras de PLA/PEO. Dessa forma, esses resultados indicaram pouca perda de ficocianina durante o processo de *electrospinning*. Além disso, a elevada eficiência de encapsulação nas matrizes poliméricas revela a potencial utilização de nanofibras contendo extrato e ficocianina como indicadores colorimétricos de pH. A eficiência de encapsulação de 3% (m v^{-1}) de ficocianina nas nanofibras foi 74%, resultado menor do que as nanofibras contendo extrato e 1% (m v^{-1}) do composto. A diminuição da eficiência de encapsulação também foi relatada por Moreira et al. (2018), que adicionou ficocianina em nanofibras de PLA/PEO. Os autores observaram que 80,7% e 71,4% do composto foi encapsulado nas nanofibras contendo 2 e 3% do composto, respectivamente.

As características morfológicas são essenciais para compreender o mecanismo de atuação e reatividade dos indicadores (LIU et al., 2020). Os resultados das análises visual e quantitativa foram determinantes na escolha das membranas para avaliação da estrutura. As nanofibras apresentam morfologia uniforme com filamentos cilíndricos e sem rugosidade (Figura 3). O diâmetro médio das nanofibras de PLA/PEO contendo 5% (m v^{-1}) de biomassa *Spirulina* sp. LEB 18 e nanofibras de PLA/PEO contendo 2% (m v^{-1}) de biomassa *Spirulina* sp. LEB 18 com 3% (m v^{-1}) de ficocianina foi 929 ± 49 e 850 ± 72 nm, respectivamente. Esse resultado apresenta o aumento de 22,3 e 15,5% no diâmetro médio em relação as nanofibras com extrato de *Spirulina* sp. LEB 18. O mesmo comportamento foi observado no estudo de Kuntzler et al. (2020), que o aumento da concentração da biomassa também resultou no incremento do diâmetro médio das nanofibras. A distribuição dos diâmetros das nanofibras com biomassa (Figura 4a, b) assemelha-se a configuração unimodal com assimetria à direita, enquanto a distribuição das nanofibras sem a biomassa é semelhante a configuração normal (Figura 4c-f).

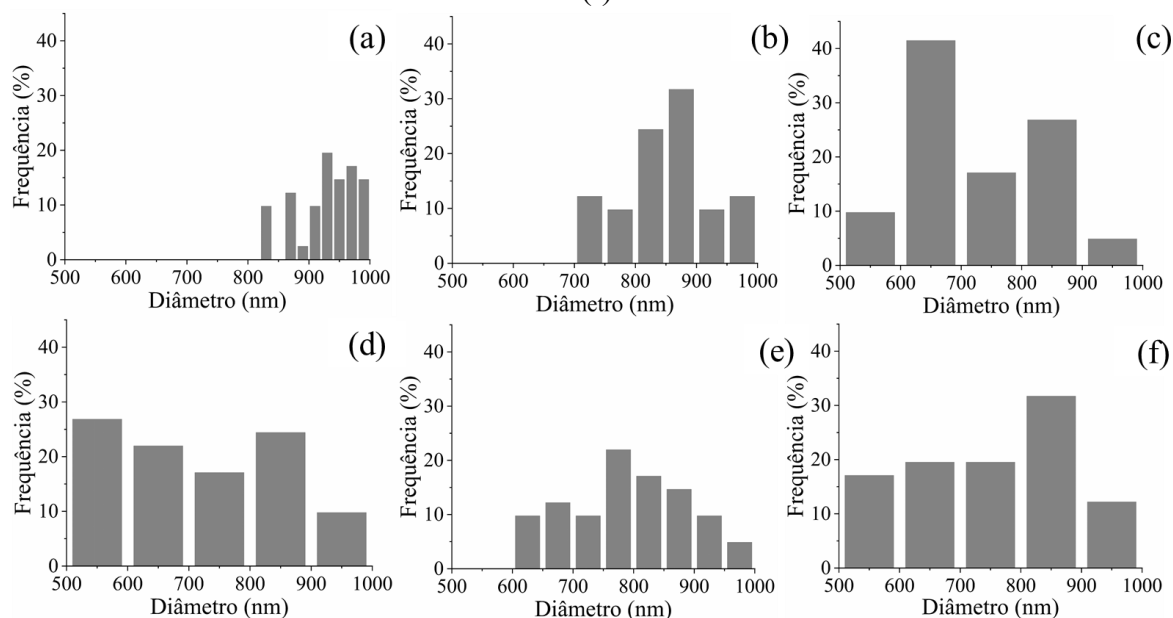
O diâmetro médio das nanofibras de PLA/PEO contendo 3% (m v^{-1}) de extrato de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 foi 722 ± 136 e 718 ± 109 nm, respectivamente. A adição de 1% (m v^{-1}) de ficocianina nas nanofibras de PLA/PEO contendo os extratos de *Spirulina* sp. LEB e *Chlorella fusca* LEB 111, resultou no diâmetro médio de 785 ± 101 e 758 ± 133 nm, respectivamente. Kuntzler et al. (2020) desenvolveram nanofibras de PLA/PEO nas mesmas condições deste estudo e obtiveram diâmetro médio das nanofibras de 728 ± 121 nm. Portanto, a adição dos extratos de microalgas e a presença da ficocianina às soluções poliméricas como substâncias cromóforas apresentaram diâmetro de nanofibra semelhante ao estudo de Kuntzler et al. (2020).

Figura 3 – Nanofibras de PLA/PEO com 5% (m v^{-1}) de biomassa *Spirulina* sp. LEB 18 (a), 2% (m v^{-1}) de biomassa *Spirulina* sp. LEB 18 + 3% (m v^{-1}) de ficocianina (b), 3% (m v^{-1}) de extrato de *Spirulina* sp. LEB 18 (c), 3% (m v^{-1}) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 (d), 3% (m v^{-1}) de extrato *Spirulina* sp. LEB 18 + 1% (m v^{-1}) de ficocianina (e) e 3% (m v^{-1}) de extrato *Chlorella fusca* LEB 111 + 1% (m v^{-1}) de ficocianina (f).



No desenvolvimento de indicadores para embalagens de alimentos é vantajoso a utilização de nanofibras com menores diâmetros para intensificar a detecção das alterações de pH. Os menores diâmetros proporcionam elevada superfície de contato que resulta em alta adsorção/absorção dos compostos de interesse. Além disso, pequenos poros intersticiais são formados, gerando alta porosidade e eficiência de detecção. Essas nanoestruturas também apresentam alta sensibilidade e especificidade que aumenta a reatividade do material, apresentando rápida resposta (AGHAEI et al., 2020; LIU et al., 2020).

Figura 4 – Distribuição do diâmetro das nanofibras de PLA/PEO com 5% (m v⁻¹) de biomassa *Spirulina* sp. LEB 18 (a), 2% (m v⁻¹) de biomassa *Spirulina* sp. LEB 18 + 3% (m v⁻¹) de ficocianina (b), 3% (m v⁻¹) de extrato de *Spirulina* sp. LEB 18 (c), 3% (m v⁻¹) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 (d), 3% (m v⁻¹) de extrato *Spirulina* sp. LEB 18 + 1% (m v⁻¹) de ficocianina (e) e 3% (m v⁻¹) de extrato *Chlorella fusca* LEB 111 + 1% (m v⁻¹) de ficocianina (f).



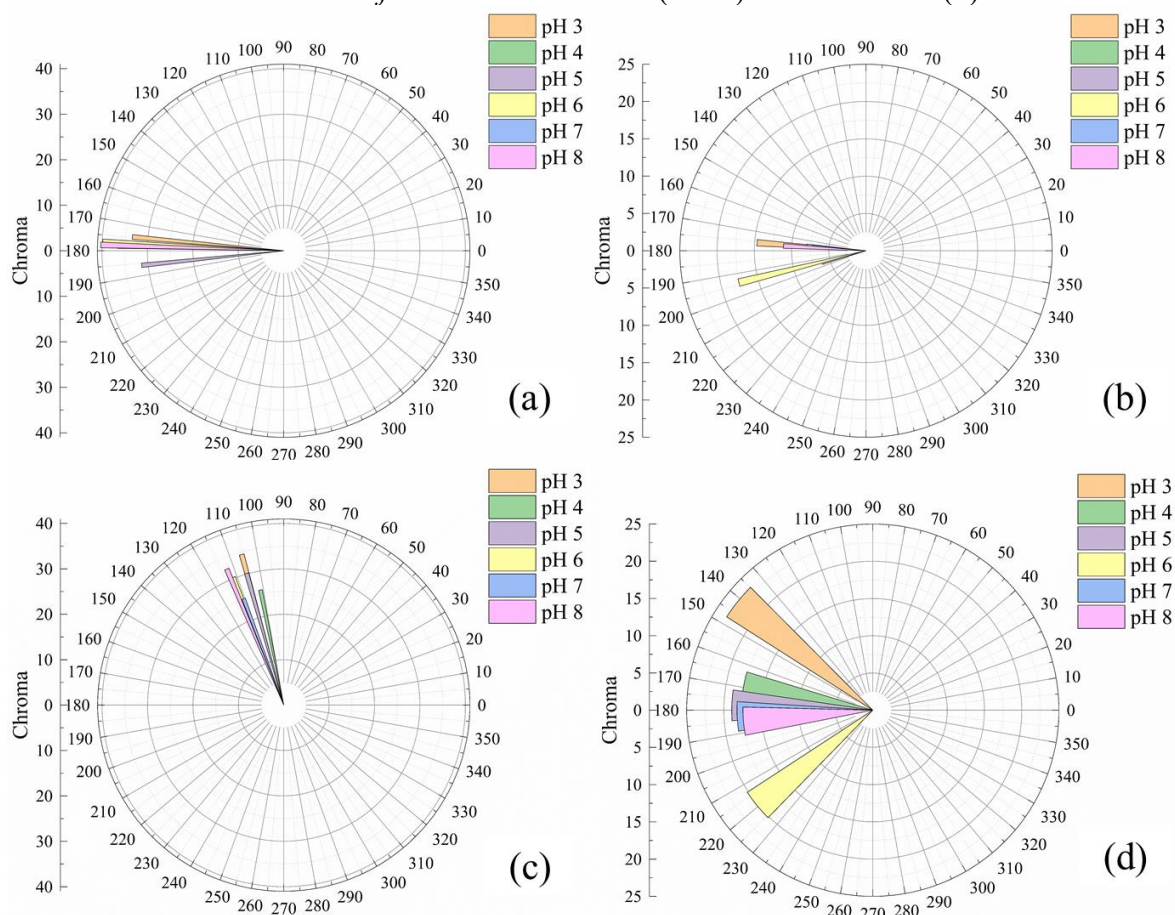
3.4 CROMATICIDADE DOS INDICADORES DE pH

A cromaticidade das nanofibras contendo extratos de microalgas está apresentada no 2º quadrante referente a transição das cores amarelo para verde (Figura 5a). Os ângulos *hue* desses indicadores variaram de 101 a 115° entre o pH de 3 a 8, que significam baixa visualização da mudança de cor. O *chroma* variou de 24 a 34, o que confirma os baixos valores de ΔE encontrados para as nanofibras contendo os extratos de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111.

A difícil visualização da alteração de cor foi confirmada com os ângulos *hue* (174 a 181°) dos indicadores contendo 4 e 5% (m v⁻¹) de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (Figura 5a). Indicadores contendo 2% (m v⁻¹) de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 com 1, 2 e 3% (m v⁻¹) de ficocianina demonstraram o mesmo comportamento na tonalidade. O ângulo *hue* de todos variou entre 175 e 195°, representando as cores verde a azul-esverdeado (Figura 5b). Os valores de *chroma* variaram de 7 a 25, indicando baixa intensidade das cores. A baixa cromaticidade dos indicadores contendo biomassa com e sem ficocianina, pode ser explicada pelo maior diâmetro das nanofibras em relação aos indicadores contendo os extratos de microalgas. Diâmetros elevados proporcionam baixa área de contato dos compostos com a

solução de pH, que resulta na baixa difusão dos íons do ambiente aquoso circundante dificultando a protonação ou desprotonação com a variação do pH (LIU et al., 2020).

Figura 5 – Cromaticidade das nanofibras de PLA/PEO com 5% (m v^{-1}) de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (a), 2% (m v^{-1}) de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 + 3% (m v^{-1}) de ficocianina, 3% (m v^{-1}) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 (b), (c) e 3% (m v^{-1}) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 + 1% (m v^{-1}) de ficocianina (d).



A adição de ficocianina as nanofibras produzidas com extratos alterou a tonalidade dos indicadores. O ângulo *hue* do indicador de extrato de *Spirulina* sp. LEB 18 e ficocianina variou de 170 a 184°, representando a transição do verde para verde-azulado. Essa configuração está localizada no final do 2º quadrante permanecendo baixa visualização da alteração de cor de acordo com o pH. No entanto, a maior variação do ângulo *hue* (133 a 225°) foi observada nos indicadores de extratos de *Chlorella fusca* LEB 111 e ficocianina (Figura 5d). Essa variação resultou na ampliação dos espectros das cores localizadas nos 2 e 3º quadrantes, significando melhor visualização da mudança de cor entre um pH e outro. Esses resultados confirmam a alta variabilidade de ΔE , alcançando valores acima (cerca de 18) da percepção absoluta da diferença de cor entre os indicadores de pH.

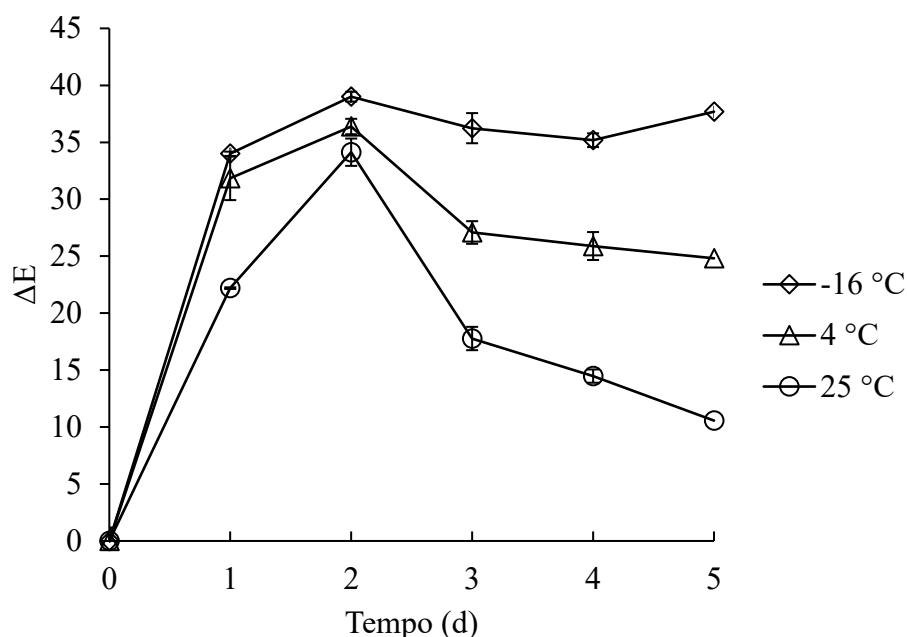
3.5 ESTABILIDADE DA COR DOS INDICADORES DE pH

A capacidade do indicador de pH de manter a cor no prazo de validade do alimento é parâmetro essencial para fornecer visualização adequada ao consumidor (MOHAMMADALINEJHAD; ALMASI; MORADI, 2020). O valor de ΔE do indicador contendo extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 e 1% (m v⁻¹) de ficocianina diminuiu à medida que a temperatura aumentou de -16 para 25 °C (Figura 6). Esse indicador foi escolhido, pois apresentou o conjunto de resultados mais promissores como a elevada amplitude de ΔE , diâmetro médio das nanofibras e amplo espectro das cores (2 e 3º quadrantes). Em temperatura ambiente, o indicador exibiu os menores valores de ΔE durante todo tempo de armazenamento. A alteração máxima de ΔE foi observada após 2 dias em todas as temperaturas estudadas. A partir do 3º dia, em -16 e 4 °C foi observada tendência constante de ΔE , revelando alta estabilidade de cor do indicador. Na temperatura ambiente, ocorreu o decréscimo de ΔE entre os dias 3 a 5, resultando na perda da cor nestas condições.

Mohammadalinejhad, Almasi, Moradi (2020) desenvolveram indicador de pH com antocianinas que apresentou o mesmo comportamento de máximo ΔE no segundo dia e estabilidade entre os dias 2 a 6 de armazenamento sob -18, 4 e 25 °C. Zhang et al. (2021a) produziram indicador visual de pH com antocianinas e observaram que o material armazenado a 4 °C apresentou maior estabilidade da cor em relação ao armazenamento a 25 °C, durante 14 dias. O hidrogel com curcumina para utilização como indicador de pH foi fabricado por Zhang et al. (2021a). Os autores verificaram que o indicador visual armazenado durante 14 dias a 4 °C teve melhor estabilidade colorimétrica do que em relação a 25 °C, devido a inibição da reação de oxidação da curcumina. De acordo com estes resultados, sugere-se que o indicador contendo extrato de microalga e ficocianina possa ser adequado para alimentos armazenados em condições de refrigeração ou congelamento.

A carne de frango é altamente perecível e pode deteriorar-se facilmente mesmo sob condições de refrigeração. A deterioração está relacionada com o crescimento de diferentes micro-organismos como a *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas* spp. e leveduras, além da carga microbiana inicial ser outro fator importante (HURLEY et al., 2014). Yildiz, Sumnu, Kahyaoglu (2021) verificaram que a partir de 5 dias, o valor de pH do peito de frango armazenada sob refrigeração (4 °C) estava inaceitável para consumo. Além disso, em 8 dias, os valores de pH aumentaram para 6,7, indicando que a deterioração do produto.

Figura 6 – Estabilidade cor dos indicadores de 3% (m v^{-1}) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 e 1% (m v^{-1}) de ficocianina temperatura de congelamento ($-16\text{ }^{\circ}\text{C}$), refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) e ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) no pH 7.

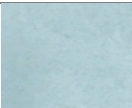
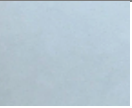


A estabilidade da cor é diretamente afetada pelas propriedades estruturais do suporte sólido e da qualidade e pureza do material que está proporcionado a cor (EZATI et al., 2021). Então, com a finalidade de avaliar essas propriedades, os valores de ΔE antes e depois do armazenamento em diferentes soluções de pH são apresentados na Tabela 2. A cor controle do indicador de pH apresentou alteração durante o armazenamento e isso resultou no aumento de ΔE entre pH 3 e 8 após 9 meses. As maiores diferenças nos valores de ΔE foram encontradas no pH 3, 4, 6 e 7 em relação ao ΔE do tempo zero. No entanto, a estabilidade de ΔE em pH 6, 7 e 8 dos indicadores após o armazenamento dificulta a percepção da diferença da cor. A coloração dos indicadores permaneceu acentuada após o armazenamento, causando mudança de cor substancial e perceptível em valores de pH de 3 a 6. A estrutura de nanofibras poliméricas teve a capacidade de proteção dos compostos sensíveis ao pH, impedindo a perda da eficiência colorimétrica através da degradação ou oxidação destes.

Singh et al. (2021) produziram filmes indicadores de pH com antocianinas para monitorar o frescor de suco de laranja e leite. Os autores conduziram o estudo de estabilidade da cor do filme durante 45 dias a temperatura ambiente. Os resultados mostraram que não houve alteração nos valores de ΔE e nem perda da capacidade indicadora dos filmes à temperatura ambiente sem incidência de luz. Ezati et al. (2021) desenvolveram indicador visual de pH com pigmento natural de cor vermelha. O estudo mostrou que esse material teve

alta estabilidade da cor após 4 meses de armazenamento a 25 °C. Portanto, o indicador de pH contendo extrato de microalga e ficocianina apresentou alta estabilidade de cor e pode ser considerado adequado para armazenamento a longo prazo de alimentos embalados.

Tabela 2 – Aparência da cor do indicador de 3% (m v⁻¹) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 e 1% (m v⁻¹) de ficocianina durante o armazenamento em diferentes pH.

pH	Controle	3	4	5	6	7	8
Tempo zero							
ΔE	-	13,7±1,7	20,9±1,2	29,4±0,5	34,3±1,8	40,7±1,9	42,7±1,9
9 meses							
ΔE	9,7±0,4	29,9±1,3	36,0±1,6	32,5±0,7	50,2±0,4	50,3±1,1	47,8±0,8

4 CONCLUSÃO

Nanofibras de PLA/PEO desenvolvidas com biomassa de microalgas e ficocianina mostraram alteração de cor quando expostas a soluções de pH entre 3 e 8. A combinação de 3% (m v⁻¹) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 e 1% de ficocianina potencializou o perfil colorimétrico dos indicadores de pH, apresentando amplitude de ΔE entre 13,7 ± 1,7 a 42,7 ± 1,9. O indicador alterou a coloração de azul-esverdeada em pH 5, para azul em pH 6 e verde em pH 7 e a maior variação de ângulo *hue* encontrada foi 133 a 225°. Esses resultados demonstram a alta sensibilidade de visualização das alterações de cores das nanofibras indicadoras de pH. O indicador apresentou estabilidade de cor em temperatura de congelamento e refrigeração, permitindo o acompanhamento da deterioração dos alimentos mesmo sob refrigeração. Além disso, após 9 meses de armazenamento sob temperatura e umidade controlada o indicador não mostrou perda da capacidade indicadora de pH. Esse estudo apresenta alternativa inovadora na utilização de compostos naturais de microalgas para desenvolvimento de embalagem inteligente, pois são atóxicos para o alimento e consequentemente para o consumidor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHAEI, Z.; GHORANI, B.; EMADZADEH, B.; KADKHODAEI, R.; TUCKER, N. Protein-based halochromic electrospun nanosensor for monitoring trout fish freshness. **Food Control**, v. 111, p. 107065, 2020.
- AMIRI, N.; AJAMI, S.; SHAHROODI, A.; JANNATABADI, N.; DARBAN, S. A.; BAZZAZ, B. S. F.; PISHAVAR, E.; KALALINIA, F.; MOVAFFAGH, J. Teicoplanin-loaded chitosan-PEO nanofibers for local antibiotic delivery and wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 645-656, 2020.
- ANDRÉS-BELLO, A.; BARRETO-PALACIOS, V.; GARCÍA-SEGOVIA, P.; MIR-BEL, J.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J. Effect of pH on color and texture of food products. **Food Engineering Reviews**, v. 5, n. 3, p. 158–170, 2013.
- ASTM (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS). Standard practice for scanning electron microscope beam size characterization. **ASTM E986 – 04**, West Conshohocken, PA, USA, 2010.
- BALBINOT-ALFARO, E.; CRAVEIRO, D. V.; LIMA, K. O.; COSTA, H. L. G.; LOPES, D. R.; PRENTICE, C. Intelligent packaging with pH indicator potential. **Food Engineering Reviews**, v. 11, p. 235-244, 2019.
- BAUER, L. M.; COSTA, J. A. V.; ROSA, A. P. C.; SANTOS, L. O. Growth stimulation and synthesis of lipids, pigments and antioxidants with magnetic fields in *Chlorella kessleri* cultivations. **Bioresource technology**, v. 244, p. 1425-1432, 2017.
- BENNETT, A.; BOGORAD, L. Properties of subunits and aggregates of blue-green algal biliproteins. **Biochemistry**, v. 10, n. 19, p. 3625-34, 1971.
- DEAMICI, K. M.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. Magnetic fields as triggers of microalga growth: evaluation of its effect on *Spirulina* sp. **Bioresource technology**, v. 220, p. 62-67, 2016.
- DHALL, R., K.; ALAM, M. S. **Biodegradable Packaging**. In Hashmi, S.; Choudhury, I. A. (Eds), *Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials*, p. 26-43, Elsevier, 2020.
- DUARTE, J. H.; MORAIS, E. G.; RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Biological CO₂ mitigation from coal power plant by *Chlorella fusca* and *Spirulina* sp. **Bioresource Technology**, v. 234, p. 472-475, 2017.
- EZATI, P.; BANG, Y.-J.; RHIM, J.-W. Preparation of a shikonin-based pH-sensitive color indicator for monitoring the freshness of fish and pork. *Food Chemistry*, v. 337, p. 127995, 2021.
- FANG, Z.; ZHAO, Y.; WARNER, R. D.; JOHNSON, S. K. Active and intelligent packaging in meat industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 61, p. 60-71, 2017.
- FERRARO, G.; IMBIMBO, P.; MARSEGLIA, A.; ILLIANO, A.; FONTANAROSA, C.; AMORESANO, A.; OLIVIERI, G.; POLLIO, A.; MONTI, D. M.; MERLINO, A. A

thermophilic C-phycoerythrin with unprecedented biophysical and biochemical properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 38-51, 2020.

GUNAWAN, M. I.; BARRINGER, S. A. Green color degradation of blanched broccoli (*Brassica oleracea*) due to acid and microbial growth. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 24, p. 253–263, 2000.

HURLEY, B. R. A.; OUZTS, A.; FISCHER, J.; GOMES, T. 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, p. 399–412, 2014.

JAMRÓZ, E.; KULAWIK, P.; KRZYŚCIAK, P.; TALAGA-ĆWIERTNIA, K.; JUSZCZAK, L. Intelligent and active furcellaran-gelatin films containing green or pu-erh tea extracts: Characterization, antioxidant and antimicrobial potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 745-757, 2019.

KANG, S.; WANG, H.; GUO, M.; ZHANG, L.; CHEN, M.; JIANG, S.; LI, X.; JIANG, S. Ethylene-vinyl alcohol copolymer–montmorillonite multilayer barrier film coated with mulberry anthocyanin for freshness monitoring. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 13268-13276, 2018.

KOCA, N.; KARADENİZ, F.; BURDURLU, H. S. Effect of pH on chlorophyll degradation and colour loss in blanched green peas. **Food Chemistry**, v. 100, p. 609–615, 2007.

KOSHY, R. R.; KOSHY, J. T.; MARY, S. K.; SADANANDAN, S.; JISHA, S.; POTHAN, L. A. Preparation of pH sensitive film based on starch/carbon nano dots incorporating anthocyanin for monitoring spoilage of pork. **Food Control**, v. 126, p. 108039, 2021

KUNTZLER, S. G.; COSTA, J. A. V.; BRIZIO, A. P. D. R.; MORAIS, M. G. Development of a colorimetric pH indicator using nanofibers containing *Spirulina* sp. LEB 18. **Food Chemistry**, v. 328, p. 126768, 2020.

KUNTZLER, S. G.; UEBEL, L. S.; SCHMATZ, D. A.; BARCIA, M. T.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. **Nanofibers and Their Applications**. In Nalwa, H. S. (Ed.), Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, v. 28, p. 387–414, 2018.

KUSWANDI, B. Freshness Sensors for Food Packaging. **Reference Module in Food Science**, 2017.

KUSWANDI, B.; NURFAWAIDI, A. On-package dual sensors label based on pH indicators for real-time monitoring of beef freshness. **Food Control**, v. 82, p. 91–100, 2017.

LIU, Y.; HAO, M.; CHEN, Z.; LIU, L.; LIU, Y.; YANG, W.; RAMAKRISHNA, S. A Review on Recent Advances in Application of Electrospun Nanofiber Materials as Biosensors. **Current Opinion in Biomedical Engineering**, v. 13, p. 174-189, 2020.

LOCILENTO, D. A.; MERCANTE, L. A.; ANDRE, R. S.; MATTOSO, L. H. C.; LUNA, G. L. F.; BRASSOLATTI, P.; ANIBAL, F. F.; CORREA, D. S. Biocompatible and Biodegradable Electrospun Nanofibrous Membranes Loaded with Grape Seed Extract for Wound Dressing Application. **Journal of Nanomaterials**, v. 2019, p. 11, 2019.

MACINTYRE, H. L.; KANA, T. M.; ANNING, T.; GEIDER, R. J. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. **Journal of Phycology**, v. 38, p. 17–38, 2002.

MAHDAVI, S. A.; JAFARI, S. M.; GHORBANI, M.; ASSADPOOR, E. Spray-Drying microencapsulation of Anthocyanins by natural biopolymers: A review. **Drying Technology**, v. 32, n. 5, p. 509-518, 2014.

MARQUEZ, U. M. L.; SINNECKER, P. **Chlorophylls in foods: Sources and stability**. Oxfordshire: Taylor & Francis Group, 2007.

MOHAMMADALINEJHAD, S.; ALMASI, H.; MORADI, M. Immobilization of *Echium amoenum* anthocyanins into bacterial cellulose film: A novel colorimetric pH indicator for freshness/spoilage monitoring of shrimp. **Food Control**, v. 113, p. 107169, 2020.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in Southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, n. 1–2, p. 60-64, 2009.

MORAIS, M. G.; VAZ, B. S.; MORAIS, E. G.; COSTA, J. A.V. Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

MOREIRA, J. B.; KUNTZLER, S. G.; TERRA, A. L. M.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. **Electrospun nanofibers: Fundamentals, food packaging technology, and safety**. In Rangappa, S. M.; Parameswaranpillai, J.; Thiagamani, S. M. K.; Krishnasamy, S.; Siengchin S. (Eds.), *Food packaging advanced materials, technologies, and innovations* (p. 223–254). United Kingdom: Taylor Francis, 2020.

MOREIRA, J. B.; TERRA, A. L. M.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Development of pH indicator from PLA/PEO ultrafine fibers containing pigment of microalgae origin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1855–1862, 2018.

MÜLLER, P., SCHMID, M. Intelligent packaging in the food sector: A brief overview. **Foods**, v. 8, p. 16, 2019.

PATEL, H. M.; ROSZAK, A. W.; MADAMWAR, D.; COGDELL, R. J. Crystal structure of phycocyanin from heterocyst-forming filamentous cyanobacterium *Nostoc* sp. WR13. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 135, p. 62–68, 2019.

POYATOS-RACIONERO, E.; ROS-LIS, J. V.; VIVANCOS, J. L.; MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R. Recent advances on intelligent packaging as tools to reduce food waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, p. 3398-3409, 2018.

QU, F.; GONG, N.; WANG, S.; GAO, Y.; SUN, C.; FANG, W.; MEN, Z. Effect of pH on fluorescence and absorption of aggregates of chlorophyll a and carotenoids. **Dyes and Pigments**, v. 173, p. 107975, 2020.

SAFI, S.; MORSHED, M.; RAVANDI, S. A. H.; GHIACI, M. Study of electrospinning of sodium alginate, blended solutions of sodium alginate/poly(vinyl alcohol) and sodium

alginate/poly(ethylene oxide). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 104, n. 5, p. 3245-3255, 2007.

SHEN, G.; SCHLUCHTER, W. M.; BRYANT, D. A. Biogenesis of phycobiliproteins: I. cpcS-I and cpcU mutants of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 define a heterodimeric phycocyanobilin lyase specific for beta-phycocyanin and allophycocyanin subunits. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 12, p. 7503–7512, 2008.

SILVA, T. M.; PINTO, V. S.; SOARES, V. R. F.; MAROTZ, D.; CICHOSKI, A. J.; ZEPKA, L. Q.; LOPES, E. J.; SILVA, C. B.; MENEZES, C. R. Viability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* by complex coacervation associated with enzymatic crosslinking under application in different fruit juices. **Food Research International**, v. 141, p. 110190, 2021.

SINGH, S.; NWABOR, O. F.; SYUKRI, D. M.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Chitosan-poly(vinyl alcohol) intelligent films fortified with anthocyanins isolated from *Clitoria ternatea* and *Carissa carandas* for monitoring beverage freshness. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 1015-1025, 2021.

TERRA, A. L. M.; MOREIRA, J. B.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Development of time-pH indicator nanofibers from natural pigments: An emerging processing technology to monitor the quality of foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 142, p. 111020, 2021.

TIRTASHI, F. E.; MORADI, M.; TAJIK, H.; FOROUGH, M.; EZATI, P.; KUSWANDI, B. Cellulose/chitosan pH-responsive indicator incorporated with carrot anthocyanins for intelligent food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 920–926, 2019.

TONG, X.; PRASANNA, G.; ZHANG, N.; JING, P. Spectroscopic and molecular docking studies on the interaction of phycocyanobilin with peptide moieties of C-phycocyanin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 236, p. 118316, 2020.

TOPUZ, F.; UYAR, T. Antioxidant, antibacterial and antifungal electrospun nanofibers for food packaging applications. **Food Research International**, v. 130, p. 108927, 2020.

VAZ, B. S.; MOREIRA, J. B.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 73-77, 2016.

WU, H. L.; WANG, G. H.; XIANG, W. Z.; LI, T.; HE, H. Stability and antioxidant activity of food-grade phycocyanin isolated from *Spirulina platensis*. **International Journal of Food Properties**, v. 19, n. 10, p. 2349–2362, 2016.

YILDIZ, E.; SUMNU, G.; KAHYAOGU, L. N. Monitoring freshness of chicken breast by using natural halochromic curcumin loaded chitosan/PEO nanofibers as an intelligent package. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 170, p. 437–446, 2021.

ZHAI, X.; LI, Z.; ZHANG, J.; SHI, J.; ZOU, X.; HUANG, X.; ZHANG, D.; SUN, Y.; YANG, Z.; HOLMES, M.; GONG, Y.; POVEY, M. Natural biomaterial-based edible and pH-

sensitive films combined with electrochemical writing for intelligent food packaging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 12836-12846, 2018.

ZHANG, J.; HUANG, X.; SHI, J.; LIU, L.; ZHANG, X.; ZOU, X.; XIAO, L.; ZHAI, X.; ZHANG, D.; LI, Y.; SHEN, T. A visual bi-layer indicator based on roselle anthocyanins with high hydrophobic property for monitoring griskin freshness. **Food Chemistry**, v. 355, p. 129573, 2021a.

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

ZHANG, Z.; CHO, S.; DADMOHAMMADI, Y.; LI, Y.; ABBASPOURRAD, A. Improvement of the storage stability of C-phycocyanin in beverages by high-pressure processing. **Food Hydrocolloids**, v. 110, p. 106055, 2021b.

ZHAO, L.; DUAN, G.; ZHANG, G.; YANG, H.; HE, S.; JIANG, S. Electrospun functional materials toward food packaging applications: A review. **Nanomaterials**, v. 10, n. 1, p. 150, 2020.

ZHU, W.; MASOOD, F.; O'BRIEN, J.; ZHANG, L. G. Highly aligned nanocomposite scaffolds by electrospinning and electrospraying for neural tissue regeneration. **Regenerative Nanomedicine**, v. 11, p. 693-704, 2015.

ARTIGO III

MONITORAMENTO DA QUALIDADE DA CARNE DE FRANGO E PESCADO UTILIZANDO
INDICADORES COLORIMÉTRICOS DE pH

RESUMO

MONITORAMENTO DA QUALIDADE DA CARNE DE FRANGO E PESCADO

UTILIZANDO INDICADORES COLORIMÉTRICOS DE pH

As embalagens inteligentes apresentam a função de monitorar o frescor dos alimentos e informar as alterações através de sinais colorimétricos. Neste contexto, este estudo teve como objetivo aplicar os indicadores de pH desenvolvidos com biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 e ficocianina em filés de frango e pescado. Biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 ou extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 com ficocianina foram adicionados à solução polimérica. A adição de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 ou extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 com ficocianina aumentou significativamente a espessura dos materiais apresentando valores de $0,049 \pm 0,005$ e $0,065 \pm 0,002$ mm, respectivamente. Todos os indicadores apresentaram baixa permeabilidade ao vapor de água que variou de $2,55 \pm 0,17$ a $3,37 \pm 0,04 \times 10^{-11} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ em relação aos filmes poliméricos. O indicador contendo extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 com ficocianina desempenhou melhor alteração de cor em função do pH dos alimentos. A verificação da deterioração foi por meio da mudança visual da cor verde para azul em pH $6,0 \pm 0,1$ e $6,5 \pm 0,3$, respectivamente para filés de frango e $5,9 \pm 0,1$ e $6,8 \pm 0,2$, respectivamente, nos filés de pescado. Assim, o indicador desenvolvido com nanofibras de PLA/PEO contendo extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 com ficocianina pode ser utilizado para o monitoramento da qualidade de alimentos perecíveis.

Palavras-chave: *Electrospinning*, embalagem inteligente, encapsulamento, ficocianina, segurança alimentar.

1 INTRODUÇÃO

Carnes apresentam alto teor de proteínas que, durante a deterioração, são degradadas pelos micro-organismos resultando em modificações sensoriais e na diminuição do frescor dos produtos (ALA; SHAHBAZI, 2019; ZHOU et al., 2021). A deterioração do peixe gera compostos de aminas voláteis mesmo em embalagens fechadas, resultando no aumento do pH do alimento (SHI et al., 2021). A carne fresca de frango é altamente perecível mesmo sob refrigeração, resultando em alterações nas propriedades físico-químicas, incluindo o aumento do pH (DOUROU et al., 2021). Os fatores como elevada capacidade de retenção de água e produção de compostos nitrogenados nesse alimento favorecem o crescimento de micro-organismos (COBOS; DÍAZ, 2015; ODEYEMI et al., 2020).

Métodos não-invasivos e alternativos têm sido explorados para fornecer informações relativas as condições de qualidade de alimentos perecíveis. Os sistemas de embalagens inteligentes consistem na inserção de indicadores de frescor nos produtos embalados, a fim de verificar as alterações e informar aos consumidores sobre a qualidade do alimento (BUMBUDSANPHAROKE; KO, 2019). O indicador colorimétrico de pH apresenta baixo custo, versatilidade de fabricação e simples visualização da mudança de cor a olho nu

(WELLS; YUSUFU; MILLS, 2019; ZHANG et al., 2019). Portanto, indicadores colorimétricos de pH podem ser utilizados para monitorar a deterioração da carne de frango e/ou pescado, permitindo a verificação visual da qualidade de forma rápida pelos consumidores (SHI et al., 2021; YILDIZ; SUMNU; KAHYAOGU, 2021).

Materiais de embalagens inteligentes baseados em nanofibras poliméricas têm sido estudados para o desenvolvimento de indicadores de pH (PRIETTO et al., 2018; SILVA et al., 2019) para monitorar o frescor da carne de porco (GUO et al., 2019), leite (TRIPATHY et al., 2019), frutas (MAFTOONAZAD; RAMASWAMY, 2019) e carne de frango (YILDIZ; SUMNU; KAHYAOGU, 2021). *Electrospinning* é uma tecnologia inovadora que permite a produção de nanofibras em escala industrial e a encapsulação de corantes naturais sensíveis ao pH (MOHAMMADI; HOSSEINI; YOUSEFI, 2020; VASS et al., 2020). As nanoestruturas apresentam características promissoras para aplicação em embalagem inteligente. Especificamente, a elevada porosidade e área de superfície em relação ao volume devido ao diâmetro das nanofibras facilita a interação do material com a matriz alimentícia, resultando na maior sensibilidade e difusão dos íons do ambiente circundante (ANDRE et al., 2021; MERCANTE et al., 2017). Além disso, no processo de produção das nanofibras são utilizadas forças eletrostáticas e temperatura ambiente que não provocam degradação dos biocompostos adicionados à matriz polimérica (MOREIRA et al., 2020).

As microalgas apresentam biomassa rica em compostos naturais com potencial de modificação da coloração em função do pH, podendo ser encapsuladas em nanofibras para produzir indicadores colorimétricos. A cor do indicador de pH baseado em nanofibras poliméricas contendo 2% de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 alterou de castanho claro (pH 1-3) para verde (pH 4,0 a 7,0) e verde escuro (pH 8-10) (KUNTZLER et al., 2020). Ficocianina extraída de microalgas foi encapsulada em nanofibras por *electrospinning* e o indicador apresentou diferentes intensidade da cor de azul (pH 1-8) até a perda total da coloração em pH 9 e 10 (MOREIRA et al., 2018; TERRA et al., 2021). No entanto, esses estudos que desenvolveram indicadores de pH com compostos de microalgas avaliaram o comportamento da cor em solução tampão, mas não aplicaram para monitorar a deterioração dos alimentos frescos. Portanto, o objetivo do estudo foi monitorar a qualidade dos filés de frango e pescado com indicadores de pH baseados em nanofibras e incorporados de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 e ficocianina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 POLÍMEROS E MICROALGAS

Os polímeros utilizados foram poli(ácido láctico) (PLA) (6201D) (3,1 densidade relativa) da Nature Works LLC (Minnetonka, Estados Unidos) e o óxido de polietileno (PEO) (massa molar 600 kDa) da empresa Sigma-Aldrich® (EUA). A ficocianina foi obtida da Zhejiang Binmei Biotechnology (China). A biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi cultivada na planta piloto do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) localizada às margens da Lagoa Mangueira (33° 30' 13" S; 53° 08' 59" W) em biorreatores tipo raceway de 10000 L (MORAIS et al., 2009). A biomassa da microalga *Chlorella fusca* LEB 111 foi cultivada com meio BG-11 no Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG (DUARTE et al., 2017).

2.2 PREPARO DOS INDICADORES DE pH

2.2.1 Soluções poliméricas

As soluções poliméricas foram preparadas com blenda de 8% de PLA e 4% (m v⁻¹) de PEO na proporção 6:4 e solubilizadas em clorofórmio:metanol (8:2) (KUNTZLER et al., 2020). O primeiro indicador de pH foi desenvolvido com 2% (m v⁻¹) de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 adicionada na solução polimérica. Outro indicador foi produzido com 3% (v v⁻¹) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 e 1% (m v⁻¹) de ficocianina também adicionados na solução polimérica. Todas as soluções foram solubilizadas por 16 h em agitador magnético a 1800 rpm (Fisatom, Brasil) a temperatura ambiente (22 ± 4 °C).

2.2.2 Processo de *electrospinning*

As nanofibras compostas por PLA/PEO com e sem a incorporação de 2% (m v⁻¹) de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 e 3% (v v⁻¹) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 com 1% (m v⁻¹) ficocianina foram desenvolvidas por *electrospinning*. As condições do processo foram determinadas de acordo com Kuntzler et al. (2020). A produção das nanofibras foi conduzida à 21 °C e umidade relativa do ar de 45±5%.

2.3 Caracterização estrutural dos indicadores de pH

A matriz polimérica dos indicadores com os compostos de microalgas foi analisada em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Jeol JSM-6610 LV, Japão). A

amostra foi seccionada para observação lateral e fixada em fita de carbono adesiva. Posteriormente, a amostra foi pulverizada com ouro sob vácuo utilizando o metalizador *diode sputtering* (Denton Vacuum CAR001-0038, Estados Unidos), para visualização da seção transversal (ASTM E986-04, 2010). As nanofibras com e sem os compostos de microalgas, os polímeros e compostos microalgais foram avaliados em espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (IR Prestige-21, Shimadzu Corp., Japan). Os espectros foram registrados entre 0 e 4000 cm^{-1} com resolução espectral de 4 cm^{-1} . As amostras foram analisadas utilizando cápsulas de brometo de potássio (KBr). A análise de difração de raios-X (DRX) foi realizada nas nanofibras com e sem os compostos de microalgas, polímeros e nos compostos microalgais, utilizando difratômetro de raios-X D8 Advance (Bruker, Estados Unidos), equipado com tubo de cobre. A radiação foi produzida com comprimento de onda de 0,154 nm, a 40 kV e 40 mA. Os difratogramas foram obtidos à temperatura ambiente (25 °C) sob ângulo de 2 θ entre 10° e 90° em passos de 0,05° s^{-1} . Os espectros de FTIR e difratogramas foram processados pelo software Origin Pro 8.0.

2.4 PROPRIEDADES FÍSICAS DOS INDICADORES DE pH

2.4.1 Espessura

As nanofibras com e sem os compostos microalgais foram produzidas com 3 mL de solução polimérica. Ao final do processo de *electrospinning*, as medições aleatórias da espessura dos indicadores foram determinadas utilizando micrômetro (Insize, 3109-25, Brasil), com precisão de 0,001 mm.

2.4.2 Capacidade de intumescimento

A análise de intumescimento das nanofibras com e sem os compostos microalgais foi determinada de acordo com Wang et al. (2017) com modificações. Amostras de dimensão 2 x 2 cm foram imersas em 30 mL de água destilada a temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, os indicadores foram retirados, o excesso de líquido foi removido com papel absorvente e as amostras foram pesadas. A quantidade de água absorvida foi calculada pelo aumento do peso em relação ao peso inicial do indicador de pH.

2.4.3 Solubilidade em água

As nanofibras com e sem os compostos microalgais foram secas em estufa (DeLeo, Brasil) a 105 °C durante 24 h para determinação do peso seco inicial. Após, as amostras foram imersas em 50 mL de água destilada e agitada em agitador orbital (New

Brunswick, I44, Alemanha) a 175 rpm, 25 °C durante 24 h. O indicador não dissolvido em água foi novamente seco em estufa, e a solubilidade foi calculada considerando o peso seco inicial e o peso seco não dissolvido (FILIPINI; ROMANI; MARTINS, 2020).

2.4.4 Permeabilidade ao vapor d'água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) das nanofibras com e sem os compostos de microalgas foi determinada gravimetricamente segundo o método ASTM E96 (ASTM, 2000) com modificações. As cápsulas contendo os indicadores na superfície superior com área de permeação 3,31 cm² e a substância dessecante (sílica) no interior. Essas cápsulas foram colocadas em dessecador com umidade relativa controlada a 75%. As cápsulas com os indicadores foram pesadas a cada 24 h por 5 dias e o PVA expresso em g m⁻¹ s⁻¹ Pa⁻¹ foi calculado de acordo com a Equação 1.

$$PVA = (M \times E) / (A \times t \times \Delta P) \quad (1)$$

Onde, M: ganho de massa da sílica (g), E: espessura do indicador (mm), A: área de permeação (m²), t: tempo (d), ΔP: diferença de pressão de vapor.

2.4.5 Absorção de umidade

O conteúdo de umidade das nanofibras com e sem os compostos de microalgas foi determinado considerando o peso inicial do indicador e após a secagem em estufa (DeLeo, Brasil) a 105 °C durante 24 h (EZATI et al., 2021).

2.5 APLICAÇÃO DO INDICADOR DE pH PARA MONITORAMENTO DO FRESCOR DA CARNE DE FRANGO E PESCADO

A aplicação dos indicadores de pH de foi baseada na metodologia de Kanatt et al. (2020) com modificações. Amostras de filé de frango e tilápia frescos (100 g) foram adquiridas no comércio local e inseridos em embalagens esterilizadas. Os indicadores com biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (2% m v⁻¹) e extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 (3% v v⁻¹) com ficocianina (1% m v⁻¹) foram colocados em contato com as amostras e cobertas com filme transparente. As embalagens foram armazenadas durante 36 h à temperatura ambiente (25 ± 2 °C). As imagens fotográficas e a alteração do pH das amostras foram medidas durante armazenamento, nos períodos 0, 12, 24 e 36 h. O acompanhamento do pH das amostras de frango e pescado foram determinados através da homogeneização de 10 g de amostra em 90

mL de água destilada durante 5 min. O pH foi medido utilizando pHmetro digital (Ionlab, PHS-3E, Brasil).

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os testes de propriedades físicas foram realizados em triplicata e os resultados foram demonstrados em média $\pm$ desvio padrão. Os dados coletados das amostras de nanofibras com e sem os compostos naturais foram considerados na análise de variância unidireccional (ANOVA) e comparados no teste Tukey a 95% de nível de confiança, utilizando o software *Statistica 7.0*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

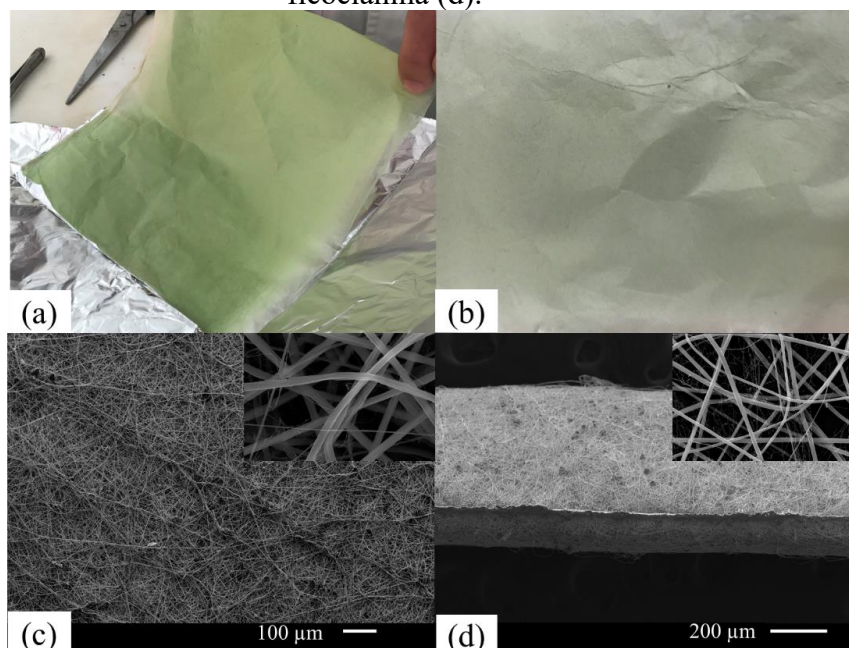
3.1 NANOESTRUTURAS DOS INDICADORES

Os indicadores mostraram superfície lisa e densa com coloração uniforme, resultado da distribuição homogênea dos compostos naturais durante o processo de *electrospinning* (Figura 1a, b). No entanto, a morfologia de superfície das nanofibras de PLA/PEO contendo 2% ($m\ v^{-1}$) de biomassa *Spirulina* sp. LEB 18 (Figura 1c) evidenciou que a biomassa não estava totalmente dispersa na solução polimérica, o que resultou em alguns grânulos de maior tamanho ao longo das nanofibras. O indicador de nanofibras de PLA/PEO contendo 3% ($v\ v^{-1}$) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 com 1% ($m\ v^{-1}$) de ficocianina apresentou superfície lisa, indicando a dissolução total do extrato e composto na solução e a interação com a matriz polimérica. As nanofibras dos indicadores têm característica porosa e a presença de algumas nanofibras secundárias formaram a rede fibrosa de alta compatibilidade e integridade dos indicadores. Segundo Megelski et al. (2002), a formação de poros nas nanofibras é devido ao baixo (61,2 °C) ponto de ebulição do clorofórmio, que pode ser evaporado rapidamente, resfriando a superfície do jato polimérico durante o percurso capilar-coletor. À medida que a superfície esfria, a umidade do ar condensa-se em gotículas, resultando em marcas de gotas de água na superfície das fibras em forma de poros, após a total evaporação do solvente.

Conforme mostrado na Figura 1d, a estrutura da seção transversal dos indicadores é relativamente suave e regular, contendo vários interstícios. A porosidade intersticial gera vantagens em relação a aplicação como sensores, pois são formados canais condutores devido a tridimensionalidade do material. Essas características podem melhorar a resposta da camada ativa em relação à detecção de analitos (WANG et al., 2016a, WANG et al., 2016b). Além

disso, a morfologia das nanofibras constituída por poros e canais, reduz a resistência ao transporte de massa encontrada pelo fluido que permeia a membrana (MERCANTE et al. 2017).

Figura 1 – Indicador (a) e superfície das nanofibras (c) de PLA/PEO contendo 2% (m v^{-1}) de biomassa *Spirulina* sp. LEB 18 e indicador (b) e seção transversal das nanofibras de PLA/PEO contendo 3% (v v^{-1}) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 com 1% (m v^{-1}) de ficocianina (d).



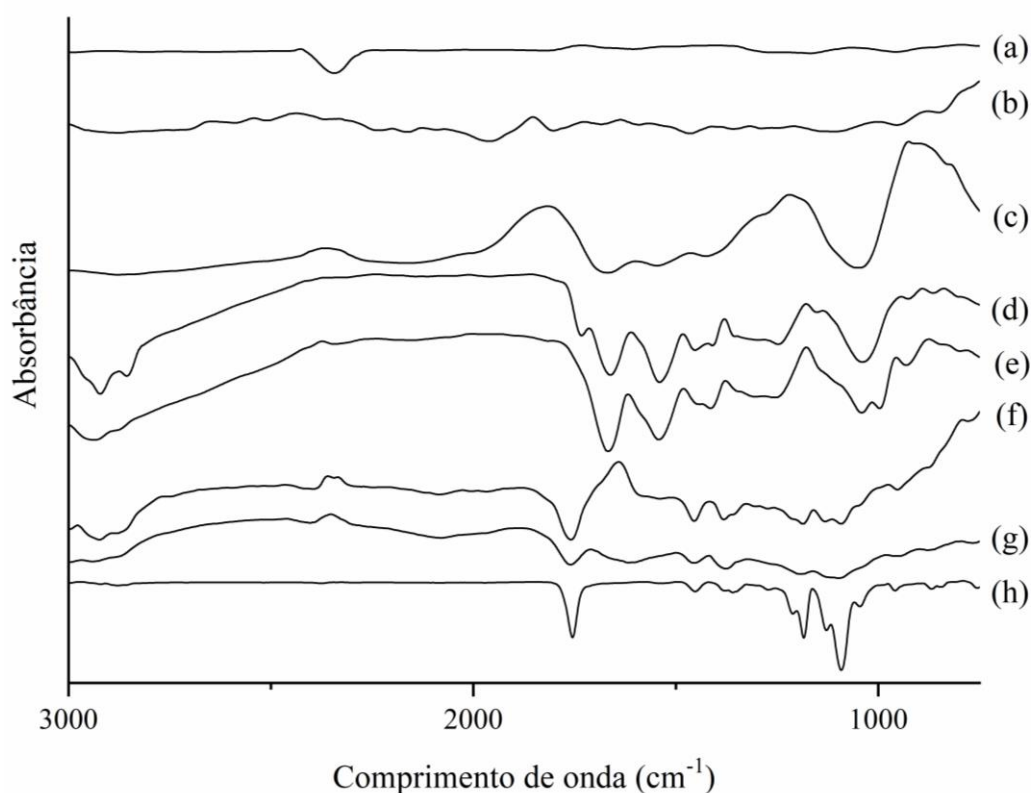
3.2 INTERAÇÕES MOLECULARES E CRISTALINIDADE

O espectro do PLA (Figura 2a) apresenta dois picos característicos do polímero em 1750 e 1180 cm^{-1} referentes ao alongamento de $\text{C}=\text{O}$ e a vibração de $\text{C}-\text{O}$, respectivamente (ŞENGÜL; DILSIZ, 2014). Os picos do PEO (Figura 2b) em 1450 , 1340 e 1100 cm^{-1} são atribuídos a ligação de CH_2 , alongamento da ligação $-\text{CH}_2$ e às vibrações de alongamento de $\text{C}-\text{O}$ na cadeia molecular (WANG et al., 2019). Essas bandas de absorção tiveram maior intensidade nas nanofibras contendo o extrato e ficocianina, seguido das nanofibras de PLA/PEO e menor evidência nas nanofibras contendo biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (Figura 2f, g, h). Nas nanofibras, as bandas de absorção de PLA e PEO são semelhantes, indicando a interação molecular entre os polímeros.

O espectro de biomassa de *Spirulina* sp LEB18 (Figura 2c) identificou a amida II, que resulta das vibrações de flexão $\text{N}-\text{H}$ e alongamento $\text{C}-\text{N}$ em $1583\text{--}1484\text{ cm}^{-1}$ e a ligação $\text{P}-\text{O}$ em 1024 cm^{-1} (BATALLER; CAPAREDA, 2018; GERHARDT et al., 2020). Os espectros de *Chlorella fusca* LEB 111 e ficocianina são semelhantes (Figura 2d, e),

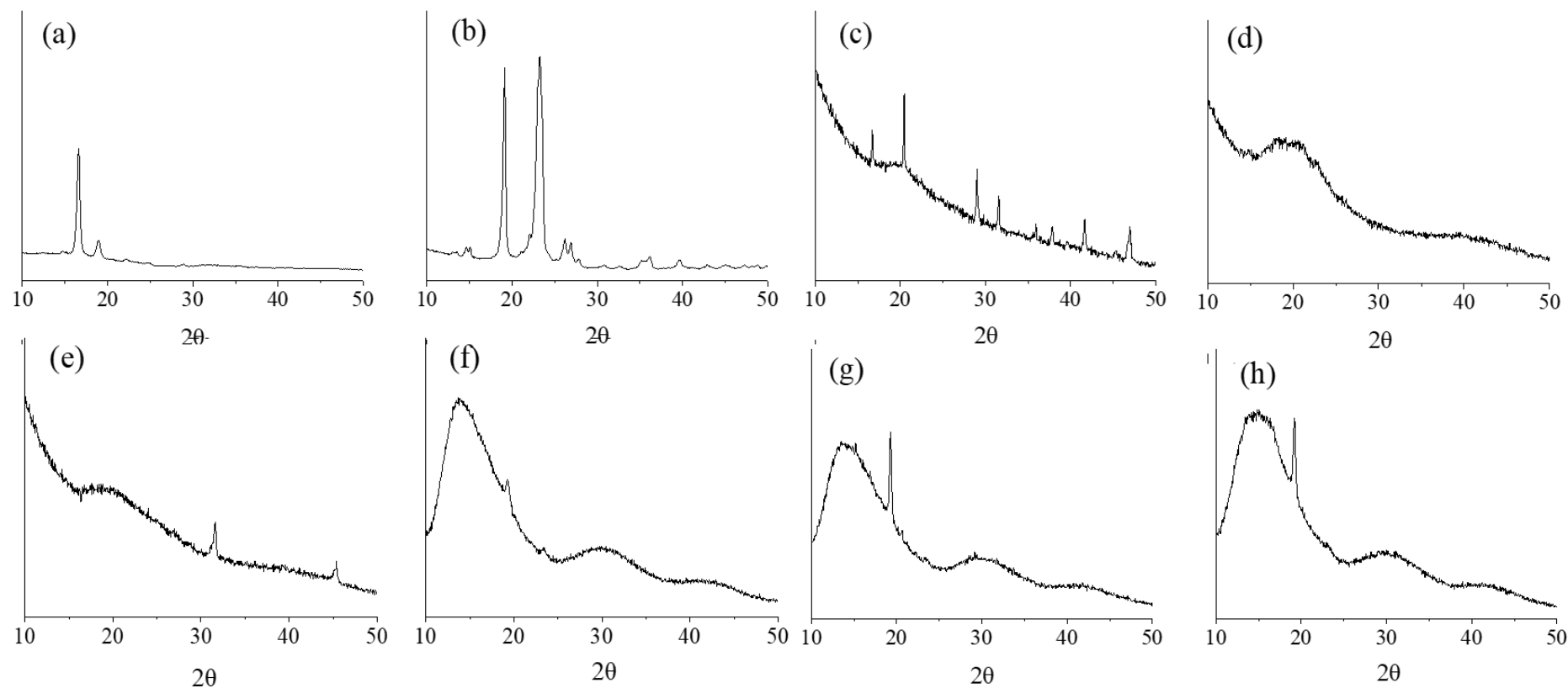
apresentando picos de absorção em 1656 cm^{-1} (amida I), 1543 cm^{-1} (amida II e alongamento da ligação C = O) e 1446 cm^{-1} (ligação C–N) (MUNAWAROH et al., 2020). As mesmas bandas foram encontradas nas nanofibras com os compostos de microalgas, confirmando a incorporação nas nanoestruturas e interação molecular com os polímeros.

Figura 2 - Espectros FTIR de PLA (a), PEO (b), biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (c), extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 (d), ficocianina (e), nanofibras de PLA/PEO (f) contendo 2% (m v^{-1}) de biomassa *Spirulina* sp. LEB 18 (g) e 3% (v v^{-1}) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 com 1% (m v^{-1}) de ficocianina (h).



Os difratogramas de PLA apresentaram dois picos em $2\theta = 16,5$ e $19,5^\circ$, indicando que o polímero tem estrutura semicristalina (Figura 3a). Os picos de difração identificados em $2\theta = 19,2$ e $23,1^\circ$ foram atribuídos a estrutura semicristalina do polímero PEO (Figura 3b). A biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (Figura 3c) foi caracterizada como composto cristalino e foram verificados os picos em $2\theta = 16,3; 20,2; 28,7; 31,4; 41,6$ e $46,7^\circ$.

Figura 3 – Difratomogramas DRX de PLA (a), PEO (b), biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (c), extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 (d), ficocianina (e), nanofibras de PLA/PEO (f), contendo 2% (m v⁻¹) de biomassa *Spirulina* sp. LEB 18 (g) e 3% (v v⁻¹) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 com 1% (m v⁻¹) de ficocianina (h).



Por outro lado, o difratograma de *Chlorella fusca* LEB 111 apresentou apenas halos amorfos nas regiões de $2\theta = 20,0$ e $40,0$ e ficocianina foi considerada semicristalina com picos em $2\theta = 31,8$ e $45,0^\circ$ (Figura 3d, e).

A incorporação dos compostos na nanofibras foi identificado no pico $2\theta = 19,4^\circ$ referente a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (Figura 3g) e a maior intensidade nos halos amorfos em $2\theta = 19,9$ e $30,6^\circ$ referentes a *Chlorella fusca* LEB 111 e ficocianina. Após o processo do *electrospinning*, as nanofibras com e sem os compostos mostraram halos amorfos em $2\theta = 16,0$ e $30,0^\circ$, resultado da hibridização dos polímeros PLA e PEO (Figura 3f, g, h). Kuntzler et al. (2018a, b) observaram a transformação da estrutura cristalina dos polímeros poli(hidroxibutirato), PEO e quitosana para amorfa das nanofibras produzidas por *electrospinning*.

3.3 EFEITO DOS COMPOSTOS MICROALGAIS NAS PROPRIEDADES FÍSICAS DOS INDICADORES DE pH

A espessura do indicador é um parâmetro que afeta as propriedades mecânicas, ópticas, de barreira, biológicas e a durabilidade do material de embalagem (CHAVOSHIZADEH; PIRSA; MOHTARAMI, 2020; YONG et al., 2019). Os indicadores contendo biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 ou extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 e ficocianina nas nanofibras apresentaram espessura de $0,049 \pm 0,005$ e $0,065 \pm 0,002$ nm, respectivamente, sendo maior comparado ao indicador sem compostos (Tabela 1). Especificamente, o incremento foi diretamente proporcional a encapsulação. Do mesmo modo, Filipini, Romani, Martins (2020) observaram que a adição de 10 e 30% de extrato de jambolão em filmes de metilcelulose aumentou significativamente de $0,056 \pm 0,003$ para $0,079 \pm 0,005$ mm a espessura dos filmes, respectivamente. Sani et al. (2021) desenvolveram filmes indicadores de pH com metilcelulose, nanofibras de quitina e extrato de antocianinas de amora vermelha. A espessura do filme aumentou de $0,126 \pm 0,015$ para $0,130 \pm 0,008$ mm com a adição de 3% do extrato. Portanto, a incorporação de compostos às nanofibras poliméricas modifica a espessura dos indicadores.

O índice de intumescimento avalia a capacidade de absorção de água durante armazenamento e afeta o desempenho da resposta à cor de indicadores de pH. No indicador controle, o índice de intumescimento ($567,20 \pm 25,09\%$) foi significativamente maior do que os indicadores com os compostos microalgais que variaram de $250,04 \pm 17,90$ a $358,26 \pm 27,37\%$ (Tabela 1). A redução do índice de intumescimento dos indicadores pode ser devido a incorporação dos compostos microalgais que resultaram na diminuição das interações

intermoleculares entre PEO e água. No estudo de Ezati et al. (2019) que produziram indicador de pH com celulose e alizarina também observaram que a adição do corante diminuiu significativamente o índice de intumescimento do indicador. Em outro estudo de Filipini, Romani, Martins (2020) verificaram que a adição de extrato de antocianinas diminuiu o índice de intumescimento das embalagens ativas e inteligentes que variaram de $420,5 \pm 17,2$ a $467,2 \pm 15,8\%$. Segundo Wei et al. (2017) o maior índice de intumescimento, resulta na liberação mais rápida dos compostos da matriz polimérica. Portanto, a redução desse índice verificada nos indicadores de pH com os compostos microalgais foi favorável para que diminua a perda destes para o meio.

Tabela 1 – Especificações dos indicadores a base de nanofibras de PLA/PEO contendo 2% (m v^{-1}) de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (a), 3% (v v^{-1}) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 e 1% (m v^{-1}) de ficocianina (b).

Composição das nanofibras de PLA/PEO			
Características físicas	Controle	a	b
Espessura (mm)	$0,035 \pm 0,001^c$	$0,049 \pm 0,005^b$	$0,065 \pm 0,002^a$
Intumescimento (%)	$567,20 \pm 25,09^a$	$250,04 \pm 17,90^b$	$358,26 \pm 27,37^c$
Solubilidade (%)	$16,19 \pm 0,23^c$	$27,23 \pm 1,34^a$	$21,31 \pm 0,64^b$
PVA ($\times 10^{-11} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$)	$1,63 \pm 0,26^c$	$2,55 \pm 0,17^b$	$3,37 \pm 0,04^a$
Umidade (%)	$2,49 \pm 0,21^b$	$7,84 \pm 3,04^{ab}$	$9,89 \pm 1,12^a$

Letras diferentes na mesma linha indicam amostra significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Controle: nanofibras produzidas com PLA/PEO sem incorporação dos compostos de microalgas.

As nanofibras de PLA/PEO apresentaram a menor solubilidade em água (Tabela 1). A incorporação de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 e ficocianina aumentou significativamente a solubilidade dos indicadores. Esse comportamento pode ser atribuído ao caráter parcialmente hidrofílico das microalgas e alta afinidade da ficocianina com água (AMREI; KHOOBKAR, 2021; CARULLO et al., 2021). Zhang et al. (2021) observaram que a solubilidade em água alterou de $28,71 \pm 2,61$ para $35,06 \pm 2,21\%$ nos filmes indicadores de pH à base de álcool polivinílico/alginato de sódio/extrato de antocianinas contendo camada de fluoreto de polivinilideno ou papel filtro, respectivamente. O mesmo estudo observou que o teor de umidade dos indicadores variou de $2,88 \pm 0,35$ a $7,50 \pm 1,98\%$.

Xiao et al. (2021) produziram filmes indicadores de pH contendo curcumina e nanocristais de celulose/polivinilpirrolidona, polivinilpirrolidona ou nanocristais de celulose,

que apresentaram solubilidade de $22,63 \pm 2,19$, $28,76 \pm 1,49$ e $24,04 \pm 1,25\%$, respectivamente. No desenvolvimento de indicadores inteligentes para embalagens de alimentos é desejável baixos índices de umidade e solubilidade em água, pois estes devem possuir resistência à água e manter a integridade dos compostos durante o armazenamento dos produtos cárneos ou laticínios (MUSHTAQ et al., 2018; TORO-MÁRQUEZ; MERINO; GUTIÉRREZ, 2018). Portanto, os indicadores contendo compostos de microalgas apresentaram baixa solubilidade e comportamento semelhante aos filmes indicadores contendo antocianinas e curcumina.

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) avalia a difusão da umidade que pode influenciar na degradação de moléculas, entrada de micro-organismos e diminuição da vida útil dos alimentos, por isso a barreira à umidade é considerada essencial para embalagens de alimentos (RANJBARYAN; POURFATHI; ALMASI, 2019). A baixa permeabilidade encontrada em todos os indicadores (Tabela 1) demonstra que o material tem alta capacidade de barreira, possibilitando a aplicação em embalagens de alimentos. Medina-Jaramillo et al. (2017) desenvolveram filme para embalagem ativa e inteligente com amido de mandioca contendo os extratos de chá verde ou manjerição, os quais mostraram valores de $5,2 \pm 0,4$ e $3,4 \pm 0,2 \times 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ de PVA, respectivamente.

No estudo de Yao et al. (2021), a permeabilidade dos filmes de amido, álcool polivinílico e diferentes fontes de extrato de betacianinas variaram de $9,26 \pm 0,10$ a $11,59 \pm 0,02 \times 10^{-11} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$. Os baixos resultados de PVA para os indicadores com e sem os compostos de microalgas, pode estar relacionado com a escala nano e a rede tridimensional de nanofibras dos indicadores de pH. Yildiz, Sumnu e Kahyaoglu (2021) observaram que ao aumentar o diâmetro da nanofibra provocou maior permeabilidade do vapor de água nos indicadores inteligentes, resultando na baixa barreira a umidade. No entanto, o decréscimo do diâmetro das nanoestruturas resulta em rede compacta de caminho sinuoso que retarda a migração do vapor de água, consequentemente aumenta a proteção da umidade considerada essencial para as embalagens.

3.4 APLICAÇÃO DOS INDICADORES DE pH

Os indicadores contendo biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 ou extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 com ficocianina mostraram a intensificação da cor verde mudança de pH $5,7 \pm 0,1$ para $6,0 \pm 0,1$ para amostras de frango, e pH $5,3 \pm 0,3$ para $5,9 \pm 0,1$ durante 12 h (Tabela 2). No entanto, após 24 h de armazenamento, a cor do indicador contendo extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 com ficocianina alterou para azul quando o pH modificou de

6,0 $\pm$ 0,1 para 6,5 $\pm$ 0,3 permanecendo nesta cor até pH 6,8 $\pm$ 0,2 em 36 h para a amostras de filé de frango. Em contrapartida, mesmo com a alteração do pH, o indicador de nanofibras de PLA/PEO contendo biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 permaneceu na cor verde nas 24 h, apresentando mudança para castanho claro em 6,8 $\pm$ 0,2 após 36 h (Tabela 2).

Tabela 2 – Monitoramento da deterioração de filé de frango com os indicadores de pH contendo 2% (m v⁻¹) de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (a), 3% (v v⁻¹) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 e 1% (m v⁻¹) de ficocianina (b).

		Indicadores de nanofibras de PLA/PEO	
Tempo (h)	pH	a	b
0	5,7 $\pm$ 0,1		
12	6,0 $\pm$ 0,1		
24	6,5 $\pm$ 0,3		
36	6,8 $\pm$ 0,2		

Os micro-organismos, durante a deterioração da carne e produtos marinhos mesmo sob refrigeração, podem degradar proteínas para produzir compostos de nitrogênio volátil, alterando assim o pH dos alimentos (MA et al., 2017; ZHANG et al., 2019). O aumento do pH influencia na taxa de processos bioquímicos e proporciona melhores condições de crescimento microbiano nos produtos perecíveis (BEKHIT et al., 2021). O pH não ideal da carne facilita a transição gradual de micro-organismos dependentes de glicogênio para os tipos de bactérias que degradam proteínas (LYU et al., 2016). Além disso, enzimas microbianas e endógenas que provocam a hidrólise de aminoácidos, resultando em compostos de amônia alcalina, aumentam o pH da carne (CAO et al., 2013). Por esse motivo, o monitoramento no prazo de validade da contaminação microbiana em produtos cárneos frescos é essencial para promover a segurança alimentar.

A mesma tendência de mudança de cor foi observada para as amostras de filé de tilápia durante o armazenamento de 36 h (Tabela 3). A percepção de alteração da cor foi mais evidente utilizando o indicador de nanofibras de PLA/PEO contendo extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 com ficocianina no pescado comparado ao frango. Esse comportamento pode estar relacionado com a cor natural desses alimentos e a maior amplitude de pH do filé de pescado em comparação com o frango. A cor azul escura do indicador no final do período de armazenamento indica que o processo de deterioração da carne iniciou, e que o frescor dos alimentos embalados pode ser avaliado em tempo real através da alteração de cor do indicador.

O pH dos alimentos frescos aumentaram gradualmente de $5,7 \pm 0,1$ a $6,8 \pm 0,2$ para o filé de frango e $5,3 \pm 0,2$ a $7,6 \pm 0,2$ para filé de pescado após armazenamento de 36 h a temperatura ambiente. Dessa forma, a coloração dos indicadores ao longo do tempo respondeu ao processo de deterioração. Ezati et al. (2021) aplicaram indicador de pH em amostras de peixe durante 36 h a temperatura ambiente e observaram que o pH do alimento fresco e deteriorado foi 5,7 e 6,9, respectivamente. Segundo Ezati et al. (2019), peixes com valores de pH acima de 7,0 não podem ser consumidos. Kanatt (2020) desenvolveu embalagem inteligente com extrato vegetal para detectar a deterioração de frango e peixe em condições de 2-4 °C durante 12 dias. Na análise de aplicação, o peixe fresco apresentou pH inicial de 5,9 que aumentou para 8,5 após 3 dias de armazenamento, enquanto o pH inicial do frango era 5,7 e aumentou para 6,5 em 3 dias.

No estudo de Yildiz, Sumnu e Kahyaoglu (2021), o pH de 6,2 do peito de frango armazenado sob refrigeração manteve-se estável por 3 dias, no entanto ao final do armazenamento o valor de pH aumentou para $6,75 \pm 0,06$. Segundo Kim et al. (2017), o valor

de pH de 6,3 e 6,5 relata o início da deterioração do peito de frango. Dessa forma, a resposta de cor dos indicadores a base de nanofibras de PLA/PEO contendo os compostos microalgais correlacionaram as cores e pH com a deterioração dos alimentos, possibilitando ser alternativa para aplicação como embalagem inteligente.

Tabela 3 – Monitoramento da deterioração de filé de pescado com os indicadores de pH contendo 2% (m v⁻¹) de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (a), 3% (v v⁻¹) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 e 1% (m v⁻¹) de ficocianina (b).

		Indicadores de nanofibras de PLA/PEO	
Tempo (h)	pH	a	b
0	5,3±0,3		
12	5,9±0,1		
24	6,8±0,2		
36	7,6±0,4		

4 CONCLUSÃO

Os indicadores apresentaram baixa solubilidade e alta barreira ao vapor de água que variam de $27,23 \pm 1,34$ a $21,31 \pm 0,64\%$ e $2,55 \pm 0,17$ a $3,37 \pm 0,04 \times 10^{-11} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$. Além disso, o indicador composto de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 com ficocianina desempenhou rápida e fácil visualização de cor, quando aplicado nos alimentos frango e pescado. Esse material monitorou o pH durante o armazenamento de 36 h que alterou da cor verde para azul quando os valores de pH modificaram de $5,9 \pm 0,1$ para $6,8 \pm 0,2$ dos filés de pescado. Portanto, a utilização de nanofibras de PLA/PEO contendo extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 com ficocianina como embalagem inteligente podem ser alternativa inovadora para detectar alterações da qualidade dos produtos perecíveis em tempo real, promovendo assim a segurança alimentar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALA, M. A. N.; SHAHBAZI, Y. The effects of novel bioactive carboxymethyl cellulose coatings on food borne pathogenic bacteria and shelf life extension of fresh and sauced chicken breast fillets. **LWT-Food Science and Technology**, v. 111, p. 602-611, 2019.
- AMREI, H. D.; KHOOBKAR, Z. Using Phycocyanin as Spectral Converter on the Growth Parameters and Lipid Content of the Green Microalga *Chlorella* sp. in a Double Layer Flat Panel Photobioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, p. 940–951, 2021.
- ANDRE, R. S.; MERCANTE, L. A.; FACURE, M. H. M.; PAVINATTO, A.; CORREA, D. S. **Electrospun composite nanofibers as sensors for food analysis**. In Dong, Y., Baji, A.; Ramakrishna, S. (Eds), Composites Science and Engineering, Electrospun Polymers and Composites, Woodhead Publishing, p. 261-286, 2021.
- ASTM (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS). Standard test methods for water vapor transmission of material. **ASTM E96-00**, West Conshohocken, PA, USA, 2000.
- ASTM (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS). Standard practice for scanning electron microscope beam size characterization. **ASTM E986 – 04**, West Conshohocken, PA, USA, 2010.
- BATALLER, B. G.; CAPAREDA, S. C. A rapid and non-destructive method for quantifying biomolecules in *Spirulina platensis* via Fourier transform infrared – attenuated total reflectance spectroscopy. **Algal Research**, v. 32, p. 341–352, 2018.
- BEKHIT, A. E.-D. A.; HOLMAN, B. W. B.; GITERU, S. G.; HOPKINS, D. L. Total volatile basic nitrogen (TVB-N) and its role in meat spoilage: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 109, p. 280–302, 2021.

BUMBUDSANPHAROKE, N.; KO, S. Nanomaterial-based optical indicators: Promise, opportunities, and challenges in the development of colorimetric systems for intelligent packaging. **Nano Research**, p. 1–12, 2019.

CAO, Y.; GU, W.; ZHANG, J.; CHU, Y.-J.; YE, X.; HU, Y.; CHEN, J. Effects of chitosan, aqueous extract of ginger, onion and garlic on quality and shelf life of stewed-pork during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1655–1660, 2013.

CARULLO, D.; DONSI, F.; FERRARI, G.; PATARO, G. Extraction improvement of water-soluble compounds from *Arthrospira platensis* through the combination of high-shear homogenization and pulsed electric fields. **Algal Research**, v. 57, p. 102341, 2021.

CHAVOSHIZADEH, S.; PIRSA, S.; MOHTARAMI, F. Conducting/smart color film based on wheat gluten/chlorophyll/polypyrrole nanocomposite. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 24, p. 100501, 2020.

COBOS, Á.; DÍAZ, O. **Chemical Composition of Meat and Meat Products**. In Cheung, P. (Ed.), *Handbook of Food Chemistry*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, p. 471–510, 2015.

DOUROU, D.; SPYRELLI, E. D.; DOULGERAKI, A. I.; ARGYRI, A. A.; GROUTA, A.; NYCHAS, G. E.; CHORIANOPOULOS, N. G.; TASSOU, C. C. Microbiota of Chicken Breast and Thigh Fillets Stored under Different Refrigeration Temperatures Assessed by Next-Generation Sequencing. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 4, p. 765, 2021.

DUARTE, J. H.; MORAIS, E. G.; RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Biological CO₂ mitigation from coal power plant by *Chlorella fusca* and *Spirulina* sp. **Bioresource Technology**, v. 234, p. 472–475, 2017.

EZATI, P.; PRIYADARSHI, R.; BANG, Y. J.; RHIM, J. W. CMC and CNF-based intelligent pH-responsive color indicator films integrated with shikonin to monitor fish freshness. **Food Control**, v. 126, p. 108046, 2021.

EZATI, P.; TAJIK, H.; MORADI, M.; MOLAEI, R. Intelligent pH-sensitive indicator based on starch-cellulose and alizarin dye to track freshness of rainbow trout fillet. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 157–165, 2019.

FILIPINI, G. S.; ROMANI, V. P.; MARTINS, V. G. Biodegradable and active-intelligent films based on methylcellulose and jambolão (*Syzygium cumini*) skins extract for food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 109, p. 106139, 2020.

GERHARDT, R.; FARIAS, B. S.; MOURA, J. M.; ALMEIDA, L. S.; SILVA, A. R.; DIAS, D.; CADAVAL, T. R. S.; PINTO, L. A. A. Development of chitosan/*Spirulina* sp. blend films as biosorbents for Cr⁶⁺ and Pb²⁺ removal. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 155, p. 142–152, 2020.

GUO, M.; WANG, H.; WANG, Q.; CHEN, M.; LI, L.; LI, X.; JIANG, S. Intelligent double-layer fiber mats with high colorimetric response sensitivity for food freshness monitoring and preservation. **Food Hydrocolloids**, v. 101, p. 105468, 2020.

- KANATT, S. R. Development of active/intelligent food packaging film containing Amaranthus leaf extract for shelf life extension of chicken/fish during chilled storage. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 24, p. 100506, 2020.
- KIM, D.; LEE, S.; LEE, K.; BAEK, S.; SEO, J. Development of a pH indicator composed of high moisture-absorbing materials for real-time monitoring of chicken breast freshness. **Food science and biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 37-42, 2017.
- KUNTZLER, S. G.; ALMEIDA, A. C. A.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Polyhydroxybutyrate and phenolic compounds microalgae electrospun nanofibers: A novel nanomaterial with antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 1008-1014, 2018a.
- KUNTZLER, S. G.; COSTA, J. A. V.; BRIZIO, A. P. D. R.; MORAIS, M. G. Development of a colorimetric pH indicator using nanofibers containing *Spirulina* sp. LEB 18. **Food Chemistry**, v. 328, p. 126768, 2020.
- KUNTZLER, S. G.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Development of electrospun nanofibers containing chitosan/PEO blend and phenolic compounds with antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 800–806, 2018b.
- LYU, F.; SHEN, K.; DING, Y.; MA, X. Effect of pretreatment with carbon monoxide and ozone on the quality of vacuum packaged beef meats. **Meat Science**, v. 117, p. 137–146, 2016.
- MA, Q.; REN, Y.; GU, Z.; WANG, L. Developing an intelligent film containing *Vitis amurensis* husk extracts: The effects of pH value of the film-forming solution. **Journal of Cleaner Production**, p. 166, v. 851–859, 2017.
- MAFTOONAZAD, N.; RAMASWAMY, H. Design and testing of an electrospun nanofiber mat as a pH biosensor and monitor the pH associated quality in fresh date fruit (*Rutab*). **Polymer Testing**, v. 75, p. 76–84, 2019.
- MEDINA-JARAMILLO, C.; OCHOA-YEPES, O.; BERNAL, C.; FAMÁ, L. Active and smart biodegradable packaging based on starch and natural extracts. **Carbohydrate Polymers**, v. 176, p. 187–194, 2017.
- MEGELSKI, S.; STEPHENS, J. S.; CHASE, D. B.; RABOLT, J. F. Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers. **Macromolecules**, v. 35, p. 8456-8466, 2002.
- MERCANTE, L. A.; SCAGION, V. P.; MIGLIORINI, F. L.; MATTOSO, L. H. C.; CORREA, D. S. Electrospinning-based (bio)sensors for food and agricultural applications: A review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 91, p. 91-103, 2017.
- MOHAMMADI, M.A.; HOSSEINI, S. M.; YOUSEFI, M. Application of electrospinning technique in development of intelligent food packaging: A short review of recent trends. **Food Science & Nutrition**, v. 8, p. 4656–4665, 2020.
- MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in Southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, n. 1–2, p. 60-64, 2009.

MOREIRA, J. B.; KUNTZLER, S. G.; TERRA, A. L. M.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. **Electrospun nanofibers: Fundamentals, food packaging technology, and safety.** In Rangappa, S. M.; Parameswaranpillai, J.; Thiagamani, S. M. K.; Krishnasamy, S.; Siengchin S. (Eds.), *Food packaging advanced materials, technologies, and innovations* (p. 223–254). United Kingdom: Taylor Francis, 2020.

MOREIRA, J. B.; TERRA, A. L. M.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Development of pH indicator from PLA/PEO ultrafine fibers containing pigment of microalgae origin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1855–1862, 2018.

MUNAWAROH, H. S. H.; GUMILAR, G. G.; ALIFIA, C. R.; MARTHANIA, M.; STELLASARY, B.; YULIANI, G.; WULANDARI, A. P.; KURNIAWAN, I.; HIDAYAT, R.; NINGRUM, A.; KOYANDE, A. K.; SHOW, P.-L. Photostabilization of phycocyanin from *Spirulina platensis* modified by formaldehyde. **Process Biochemistry**, v. 94, p. 297–304, 2020.

MUSHTAQ, M.; GANI, A.; GANI, A.; PUNOO, H. A.; MASOODI, F. A. Use of pomegranate peel extract incorporated zein film with improved properties for prolonged shelf life of fresh Himalayan cheese (Kalari/kradi). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 48, p. 25–32, 2018.

ODEYEMI, O. A.; ALEGBELEYE, O. O.; STRATEVA, M.; STRATEV, D. Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 19, p. 311–331, 2020.

PRIETTO, L.; PINTO, V. Z.; EL HALAL, S. L. M.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; LIM, L.-T.; DIAS, A. R. G.; ZAVAREZE, E. R. Ultrafine fibers of zein and anthocyanins as natural pH indicator. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 1, p. 1–9, 2018.

RANJBARYAN, S.; POURFATHI, B.; ALMASI, H. Reinforcing and release controlling effect of cellulose nanofiber in sodium caseinate films activated by nanoemulsified cinnamon essential oil. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 21, p. 100341, 2019.

SANI, M. A.; TAVASSOLI, M.; HAMISHEHKAR, H.; MCCLEMENTS, D. J. Carbohydrate-based films containing pH-sensitive red barberry anthocyanins: Application as biodegradable smart food packaging materials. **Carbohydrate Polymers**, v. 255, 1p. 17488, 2021.

ŞENGÜL, B.; DILSİZ, N. Barrier properties of polylactic acid/layered silicate nanocomposites for food contact applications. **Polymer Science**, v. 56, p. 896–906, 2014.

SHI, C.; ZHANG, J.; JIA, Z.; YANG, X.; ZHOU, Z. Intelligent pH indicator films containing anthocyanins extracted from blueberry peel for monitoring tilapia fillet freshness. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, p. 1800–1811, 2021.

SILVA, C. K.; MASTRANTONIO, D. J. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Innovative pH sensors developed from ultrafine fibers containing açai (*Euterpe oleracea*) extract. **Food Chemistry**, v. 294, p. 397–404, 2019.

TERRA, A. L. M.; MOREIRA, J. B.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Development of time-pH indicator nanofibers from natural pigments: An emerging processing technology to monitor the quality of foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 142, p. 111020, 2021.

TORO-MÁRQUEZ, L. A.; MERINO, D.; GUTIÉRREZ, T. J. Bionanocomposite films prepared from corn starch with and without nanopackaged Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) flower extract. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, p. 1955–1973, 2018.

TRIPATHY, S.; REDDY, M. S.; VANJARI, S. R. K.; JANA, S.; SINGH, S. G. A step towards miniaturized milk adulteration detection system: Smartphone-based accurate pH sensing using electrospun halochromic nanofibers. **Food Analytical Methods**, v. 12, p. 612–624, 2019.

VASS, P.; SZABÓ, E.; DOMOKOS, A.; HIRSCH, E.; GALATA, D.; FARKAS, B.; DÉMUTH, B.; ANDERSEN, S. K.; VIGH, T.; VERRECK, G.; MAROSI, G.; NAGY, Z. K. Scale-up of electrospinning technology: Applications in the pharmaceutical industry. **WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 12, p. 1611, 2020.

WANG, D.; CHENG, W.; WANG, Q.; ZANG, J.; ZHANG, Y.; HAN, G. Preparation of electrospun chitosan/poly(ethylene oxide) composite nanofibers reinforced with cellulose nanocrystals: Structure, morphology, and mechanical behavior. **Composites Science and Technology**, v. 182, p. 107774, 2019.

WANG, K.; WU, K.; XIAO, M.; KUANG, Y.; CORKE, H.; NI, X.; JIANG, F. Structural characterization and properties of konjac glucomannan and zein blend films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, n. 1, p. 1096-1104, 2017.

WANG, N.; XU, Z.; QU, Y.; ZHENG, G.; DAI, K.; LIU, C.; SHEN, C. Liquid sensing behaviors of carbon black/polyamide 6/high-density polyethylene composite containing ultrafine conductive electrospun fibrous network. **Colloid and Polymer Science**, v. 294, n. 8, p. 1343-1350, 2016a.

WANG, T.; GUO, Y.; WAN, P.; ZHANG, H.; CHEN, X.; SUN, X. Flexible transparent electronic gas sensors. **Small**, v. 12, n. 28, p. 3748-3756, 2016b.

WEI, Y.-C.; CHENG, C.-H.; HO, Y.-C.; TSAI, M.-L.; MI, F.-L. Active gellan gum/purple sweet potato composite films capable of monitoring pH variations. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 491-502, 2017.

WELLS, N.; YUSUFU, D.; MILLS, A. Colourimetric plastic film indicator for the detection of the volatile basic nitrogen compounds associated with fish spoilage. **Talanta**, v. 194, p. 830-83, 2019.

XIAO, Y.; LIU, Y.; KANG, S.; CUI, M.; XU, H. Development of pH-responsive antioxidant soy protein isolate films incorporated with cellulose nanocrystals and curcumin nanocapsules to monitor shrimp freshness. **Food Hydrocolloids**, v. 120, p. 106893, 2021.

YAO, X.; QIN, Y.; ZHANG, M.; ZHANG, J.; QIAN, C.; LIU, J. Development of active and smart packaging films based on starch, polyvinyl alcohol and betacyanins from different plant sources. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 358-368, 2021.

YILDIZ, E.; SUMNU, G.; KAHYAOGU, L. N. Monitoring freshness of chicken breast by using natural halochromic curcumin loaded chitosan/PEO nanofibers as an intelligent package. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 170, p. 437–446, 2021.

YONG, H.; WANG, X.; ZHANG, X.; LIU, Y.; QIN, Y.; LIU, J. Effects of anthocyanin rich purple and black eggplant extracts on the physical, antioxidant and pH-sensitive properties of chitosan film. **Food Hydrocolloids**, v. 94, p. 93–104, 2019.

ZHANG, J.; ZOU, X.; ZHAI, X.; HUANG, X.; JIANG, C.; HOLMES, M. Preparation of an intelligent pH film based on biodegradable polymers and roselle anthocyanins for monitoring pork freshness. **Food Chemistry**, v. 272, p. 306–312, 2019.

ZHOU, X.; YU, X.; XIE, F.; FAN, Y.; XU, X.; QI, J. XIONG, G.; GAO, X.; ZHANG, F. pH-responsive double-layer indicator films based on konjac glucomannan/camellia oil and carrageenan/anthocyanin/curcumin for monitoring meat freshness. **Food Hydrocolloids**, v. 118, p. 106695, 2021.

CAPÍTULO IV

5 CONCLUSÃO GERAL

Este estudo demonstrou a possibilidade de desenvolver indicadores colorimétricos de pH utilizando biomassa de microalga de *Spirulina* sp. LEB 18, *Chlorella fusca* LEB 111 e ficocianina incorporadas em nanofibras poliméricas. Indicadores produzidos com nanofibras de blenda de 8% PLA/4% PEO na proporção 6:4 e 2% (m v⁻¹) de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 mostraram maior variação de cor em função do pH (1-10) em relação a 1 e 3% (m v⁻¹) de biomassa. O comportamento de ΔE do material contendo 2% (m v⁻¹) de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 mostra alteração na cor entre o pH 5 e 7 com valores de ΔE superior a 21 e estatisticamente diferentes. Além disso, a estabilidade da cor durante os efeitos do pH mostrou que a biomassa não perde seu potencial colorimétrico ao longo do tempo, o que aumenta a percepção de cor e facilita a visualização para o consumidor. O indicador de pH desenvolvido com nanofibras de PLA/PEO contendo 3% (m v⁻¹) de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 e 1% de ficocianina potencializou o perfil colorimétrico, apresentando amplitude de ΔE entre $13,7 \pm 1,7$ a $42,7 \pm 1,9$. Além disso, este mostrou alteração da coloração de azul-esverdeada em pH 5, para azul em pH 6 e verde em pH 7 e a maior variação de ângulo *hue* encontrada foi 133 a 225 °. O indicador apresentou estabilidade de cor em temperatura de congelamento e refrigeração, permitindo o acompanhamento da deterioração dos alimentos mesmo sob refrigeração. Além disso, após 9 meses de armazenamento sob temperatura e umidade controlada o indicador não mostrou perda da capacidade colorimétrica.

Os indicadores apresentaram baixa solubilidade e alta barreira ao vapor de água que variam de $27,23 \pm 1,34$ a $21,31 \pm 0,64\%$ e $2,55 \pm 0,17$ a $3,37 \pm 0,04 \times 10^{-11} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$. Além disso, o indicador composto de extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 com ficocianina monitorou o pH durante o armazenamento de 36 h que alterou da cor verde para azul quando os valores de pH modificaram de $5,9 \pm 0,1$ para $6,8 \pm 0,2$ dos filés de pescado. Esses resultados com nanofibras de PLA/PEO adicionadas de biomassa microalgal e biocompostos apresentam composição apropriada para visualização de alteração da qualidade dos produtos alimentícios. Portanto, esse estudo apresenta alternativa inovadora na utilização de compostos naturais de microalgas para desenvolvimento de embalagem inteligente, pois são atóxicos para o alimento e consequentemente para o consumidor. Além disso, a utilização de nanofibras de PLA/PEO contendo extrato de *Chlorella fusca* LEB 111 com ficocianina como embalagem inteligente mostrou-se promissora para detectar alterações da qualidade dos produtos perecíveis em tempo real, promovendo assim maior segurança alimentar.

CAPÍTULO V

RESÍDUOS GERADOS E DESTINO

Os resíduos gerados nos experimentos compreendem os solventes das soluções poliméricas, soluções de pH e as nanofibras poliméricas. Todos os resíduos foram etiquetados e armazenados para o correto descarte de acordo com as normas da Universidade.

SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- 1) Desenvolver indicadores de pH com outros polímeros para avaliar a influência da cor em função do pH;
- 2) Analisar a alteração da cor dos indicadores em diferentes tempo-temperatura;
- 3) Avaliar as propriedades mecânicas dos indicadores de pH;
- 4) Realizar análises antimicrobianas e antioxidantes dos indicadores desenvolvidos;
- 5) Aplicar os indicadores desenvolvidos em frutas e legumes;
- 6) Determinar os índices de deterioração como nitrogênio básico, aminas voláteis e análise microbiológica nos alimentos;
- 7) Realizar análise sensorial com consumidores.

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, D. A. P.; CRUZ, J. M.; LOSADA, P. P. Active and intelligent packaging for the food industry. **Food Reviews International**, v. 28, p. 146-187, 2012.
- AGARWAL, S.; GREINER, A.; WENDORFF, J. H. Functional materials by electrospinning of polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 963-991, 2013.
- AGHAEI, Z.; EMADZADEH, B.; GHORANI, B.; KADKHODAEI, R. Cellulose acetate nanofibres containing alizarin as a halochromic sensor for the qualitative assessment of rainbow trout fish spoilage. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 5, p. 1087–1095, 2018.
- AGHAEI, Z.; GHORANI, B.; EMADZADEH, B.; KADKHODAEI, R.; TUCKER, N. Protein-based halochromic electrospun nanosensor for monitoring trout fish freshness. **Food Control**, v. 111, p. 107065, 2020.
- ALIPPILAKKOTTE, S.; KUMAR, S.; SREEJITH, L. Fabrication of PLA/Ag nanofibers by green synthesis method using Momordica charantia fruit extract for wound dressing applications. **Colloids and Surfaces A**, v. 529, p. 771–782, 2017.
- ALIZADEH-SANI, M.; MOHAMMADIAN, E.; RHIM, J.-W.; JAFARI, S. M. pH-sensitive (halochromic) smart packaging films based on natural food colorants for the monitoring of food quality and safety. **Trends in Food Science & Technology**, v. 105, p. 93–144, 2020.
- AMIRI, N.; AJAMI, S.; SHAHROODI, A.; JANNATABADI, N.; DARBAN, S. A.; BAZZAZ, B. S. F.; PISHAVAR, E.; KALALINIA, F.; MOVAFFAGH, J. Teicoplanin-loaded chitosan-PEO nanofibers for local antibiotic delivery and wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 645-656, 2020.
- AMREI, H. D.; KHOOBKAR, Z. Using Phycocyanin as Spectral Converter on the Growth Parameters and Lipid Content of the Green Microalga *Chlorella* sp. in a Double Layer Flat Panel Photobioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, p. 940–951, 2021.
- ANDRE, R. S.; MERCANTE, L. A.; FACURE, M. H. M.; PAVINATTO, A.; CORREA, D. S. **Electrospun composite nanofibers as sensors for food analysis**. In Dong, Y., Baji, A.; Ramakrishna, S. (Eds), Composites Science and Engineering, Electrospun Polymers and Composites, Woodhead Publishing, p. 261-286, 2021.
- ANDRÉS-BELLO, A.; BARRETO-PALACIOS, V.; GARCÍA-SEGOVIA, P.; MIR-BEL, J.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J. Effect of pH on color and texture of food products. **Food engineering reviews**, v. 5, p. 158–170, 2013.
- ARRIETA, M. P.; GARCÍA, F. J. P.; MARTÍNEZ, J. L.; VIDAL, R. N.; FERRÁNDIZ, S. Pyrolysis of bioplastic waste: obtained products from poly(lactic acid). **DYNA**, v. 87, p. 395–399, 2012.
- ARRIETA, M. P.; LÓPEZ, J.; FERRÁNDIZ, S.; PELTZER, M. A. Characterization of PLA-limonene blends for food packaging applications. **Polymer Testing**, v. 32, p. 760–768, 2013.

ASTM (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS). Standard test methods for water vapor transmission of material. **ASTM E96-00**, West Conshohocken, PA, USA, 2000.

ASTM (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS). Standard practice for scanning electron microscope beam size characterization. **ASTM E986 – 04**, West Conshohocken, PA, USA, 2010.

ASTM (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS). Standard test method for assignment of the DSC procedure for determining Tg of a polymer or an elastomeric compound. **ASTM D7426 – 08**, West Conshohocken, 2013.

ASTM (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS). Standard test method for rapid thermal degradation of solid electrical insulating materials by thermogravimetric method (TGA). **ASTM D3850 – 12**, West Conshohocken, 2013.

AVEROUS, L. Biodegradable multiphase systems based on plasticized starch: a review. **Journal of Macromolecular Science-Polymer Reviews C**, v. 44, p. 231–274, 2004.

AYDOGDU, A.; SUMNU, G.; SAHIN, S. Fabrication of gallic acid loaded Hydroxypropyl methylcellulose nanofibers by electrospinning technique as active packaging material. **Carbohydrate Polymers**, v. 208, p. 241–250, 2019.

BAI, R.; ZHANG, X.; YONG, H.; WANG, X.; LIU, Y.; LIU, J. Development and characterization of antioxidant active packaging and intelligent Al³⁺-sensing films based on carboxymethyl chitosan and quercetin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 1074-1084, 2019.

BALBINOT-ALFARO, E.; CRAVEIRO, D. V.; LIMA, K. O.; COSTA, H. L. G.; LOPES, D. R.; PRENTICE, C. Intelligent packaging with pH indicator potential. **Food Engineering Reviews**, v. 11, p. 235-244, 2019.

BATALLER, B. G.; CAPAREDA, S. C. A rapid and non-destructive method for quantifying biomolecules in *Spirulina platensis* via Fourier transform infrared – attenuated total reflectance spectroscopy. **Algal Research**, v. 32, p. 341–352, 2018.

BAUER, L. M.; COSTA, J. A. V.; ROSA, A. P. C.; SANTOS, L. O. Growth stimulation and synthesis of lipids, pigments and antioxidants with magnetic fields in *Chlorella kessleri* cultivations. **Bioresource technology**, v. 244, p. 1425-1432, 2017.

BEIJERINCK, M. **Kulturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen**. Botanische Ztg, v. 48, p. 729, 1890.

BEKHIT, A. E.-D. A.; HOLMAN, B. W. B.; GITERU, S. G.; HOPKINS, D. L. Total volatile basic nitrogen (TVB-N) and its role in meat spoilage: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 109, p. 280–302, 2021.

BENNETT, A.; BOGORAD, L. Properties of subunits and aggregates of blue-green algal biliproteins. **Biochemistry**, v. 10, n. 19, p. 3625-34, 1971.

BERTHON, J.-Y.; NACHAT-KAPPES, R.; BEY, M.; CADORET, J.-P.; RENIMEL, I.; FILAIRE, E. Marine algae as attractive source to skin care. **Free Radical Research**, v. 510, n. 6, p. 555-567, 2017.

BEWICKE, D.; POTTER, B. A. **Chlorella: The Emerald Food**. Ronin Publishing, 2009.

BHALAMUR, G. L.; VALERIE, O.; MARK, L. Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review. **Environmental Engineering Research**, v. 230, n. 3, p. 229-241, 2018.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, n.3, p. 325-347, 2010.

BHUSHANI, J. A.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 38, n. 1, p. 21-33, 2014.

BOON, C. S.; McCLEMENTS, D. J.; WEISS, J.; DECKER, E. A. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, p. 515–532, 2010.

BOONYAWAN, D.; SARAPIROM, S.; TUNMA, S.; CHAIWONG, C.; RACHTANAPUN, P.; AURAS, R. Characterization and antimicrobial properties of fluorine-rich carbon films deposited on poly(lactic acid). **Surface & Coatings Technology**, v. 205, p. 552–557, 2011.

BORGES, J. A.; ROSA, G. M.; MEZA, L. H. R.; HENRARD, A. A.; SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* sp. LEB-18 culture using effluent from the anaerobic digestion. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 2, p. 277–287, 2013.

BRIZIO, A. P. B. R.; GONZAGA JR., M. A.; FOGAÇA, F. H. S.; PRENTICE, C. Dynamic monitoring of the shelf life of Cobia (*Rachycentron canadum*): a study on the applicability of a smart photochromic indicator. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, p. 790–796, 2015.

BRIZIO, A. P. D. R.; PRENTICE, C. Development of Aa New Time Temperature Indicator for Enzymatic Validation of Pasteurization of Meat Products. **Journal of Food Science**, v. 80, p. 1271-1276, 2015.

BRIZIO, A. P. D. R.; PRENTICE, C. Development of an intelligent enzyme indicator for dynamic monitoring of the shelf-life of food products. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 30, p. 208–217, 2015.

BRIZIO, A. P. D. R.; PRENTICE, C. Use of smart photochromic indicator for dynamic monitoring of the shelf life of chilled chicken based products. **Meat Science**, v. 96, p. 1219–1226, 2014.

BUMBUDSANPHAROKKE, N.; KO, S. Nanomaterial-based optical indicators: Promise, opportunities, and challenges in the development of colorimetric systems for intelligent packaging. **Nano Research**, p. 1–12, 2019.

- CAO, Y.; GU, W.; ZHANG, J.; CHU, Y.-J.; YE, X.; HU, Y.; CHEN, J. Effects of chitosan, aqueous extract of ginger, onion and garlic on quality and shelf life of stewed-pork during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1655–1660, 2013.
- CARULLO, D.; DONSI, F.; FERRARI, G.; PATARO, G. Extraction improvement of water-soluble compounds from *Arthrospira platensis* through the combination of high-shear homogenization and pulsed electric fields. **Algal Research**, v. 57, p. 102341, 2021.
- CASASOLA, R.; THOMAS, N.L.; TRYBALA, A.; GEORGIADOU, S. Electrospun poly lactic acid (PLA) fibres: effect of different solvent systems on fibre morphology and diameter. **Polymer**, v. 55, n. 18, p. 4728 – 4737, 2014.
- CASPER, C. L.; STEPHENS, J. S.; TASSI, N. G.; CHASE, D. B.; RABOLT, J. F. Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: Effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process. **Macromolecules**, v. 37, n. 2, 2004.
- CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; BUNNAG, B. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 659–664, 2012.
- CHAVOSHIZADEH, S.; PIRSA, S.; MOHTARAMI, F. Conducting/smart color film based on wheat gluten/chlorophyll/polypyrrole nanocomposite. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 24, p. 100501, 2020.
- CHEN, H. M.; YU, D.G. An elevated temperature electrospinning process for preparing acyclovir-loaded PAN ultrafine fibers. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 210, n. 12, p. 1551-1555, 2010.
- CHEN, H.-Z.; ZHANG, M.; BHANDARI, B.; YANG, C.-H. Development of a novel colorimetric food package label for monitoring lean pork freshness. **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, p. 43–49, 2019.
- CHEN, S.; WU, M.; LU, P.; GAO, L.; YAN, S.; WANG, S. Development of pH indicator and antimicrobial cellulose nanofibre packaging film based on purple sweet potato anthocyanin and oregano essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 271–280, 2020.
- CHENG, J.; JUN, Y.; QIN, J.; LEE, S. H. Electrospinning versus microfluidic spinning of functional fibers for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 114, p. 121-143, 2017.
- CHIEN, Y.-C.; LIANG, C.; YANG, S.-H. Exploratory study on the pyrolysis and PAH emissions of polylactic acid. **Atmospheric Environment**, v. 45, p. 123–127, 2011.
- CHOI, I.; LEE, J. Y.; LACROIX, M.; HAN, J. Intelligent pH indicator film composed of agar/potato starch and anthocyanin extracts from purple sweet potato. **Food Chemistry**, v. 218, p. 122–128, 2017.
- CHUN, H.-N.; KIM, B.; SHIN, H.-S. Evaluation of a freshness indicator for quality of fish products during storage. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, p. 1719-1725, 2014.

- COBOS, Á.; DÍAZ, O. **Chemical Composition of Meat and Meat Products**. In Cheung, P. (Ed.), *Handbook of Food Chemistry*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, p. 471–510, 2015.
- COOK, C. A.; HURI, P. Y.; GINN, B. P.; GILBERT-HONICK, J.; SOMERS, S. M.; TEMPLE, J. P.; MAO, H. Q.; GRAYSON, W. L. Characterization of a novel bioreactor system for 3D cellular mechanobiology studies. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, p. 1825-1837, 2016.
- COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. **Microalgae for food production**. In Soccol, C. R.; Pandey, A.; Larroche, C. (Eds.), *Fermentation Process Engineering in the Food Industry*, Taylor & Francis, p. 486, 2013
- COSTA, J. A. V.; RADMANN, E. M.; CERQUEIRA, V. S.; SANTOS, G. C.; CALHEIROS, M. N. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 17, n. 4, p. 429–436, 2006.
- COSTA, R. G. F.; OLIVEIRA, J. E.; PAULA, G. F.; MEDEIROS, E. S.; RIBEIRO, C.; MATTOSO, L. H. C.; PICCIANI, P. H. S. Eletrofiação de polímeros em Solução. Parte I: Fundamentação Teórica. **Polímeros**, v. 22, p. 170-177, 2012.
- DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUI, C. O.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 261 – 269, 2002.
- DEAMICI, K. M.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. Magnetic fields as triggers of microalga growth: evaluation of its effect on *Spirulina* sp. **Bioresource technology**, v. 220, p. 62-67, 2016.
- DEITZEL, J.; KLEINMEYER, J.; HARRIS, D.; TAN, N. B. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. **Polymer**, v. 42, p. 261-272, 2001.
- DEY, A.; NEOGI, S. Oxygen scavengers for food packaging applications: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 90, p. 26–34, 2019.
- DHALL, R. K.; ALAM, M. S. **Biodegradable Packaging**. In Hashmi, S.; Choudhury, I. A. (Eds), *Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials*, p. 26-43, Elsevier, 2020.
- DOSHI, J.; RENEKER, D. H. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. **Journal of Electrostatics**, v. 35, n. 2 e 3, 1995.
- DOUROU, D.; SPYRELLI, E. D.; DOULGERAKI, A. I.; ARGYRI, A. A.; GROUTA, A.; NYCHAS, G. E.; CHORIANOPOULOS, N. G.; TASSOU, C. C. Microbiota of Chicken Breast and Thigh Fillets Stored under Different Refrigeration Temperatures Assessed by Next-Generation Sequencing. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 4, p. 765, 2021.
- DUARTE, J. H.; MORAIS, E. G.; RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Biological CO₂ mitigation from coal power plant by *Chlorella fusca* and *Spirulina* sp. **Bioresource Technology**, v. 234, p. 472-475, 2017.

ELLOUZE, M.; AUGUSTIN, J. C. Applicability of biological time temperature integrators as quality and safety indicators for meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, p. 119–129, 2010.

ERIKSEN, N. T. Production of phycocyanin – a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 1–14, 2008.

EU. **Commission regulation of active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food**. N° 450/2009 of 29 May 2009, OJL135,30.05.2009, 3., 2009.

EZATI, P.; BANG, Y.-J.; RHIM, J.-W. Preparation of a shikonin-based pH-sensitive color indicator for monitoring the freshness of fish and pork. **Food Chemistry**, v. 337, p. 127995, 2021.

EZATI, P.; PRIYADARSHI, R.; BANG, Y. J.; RHIM, J. W. CMC and CNF-based intelligent pH-responsive color indicator films integrated with shikonin to monitor fish freshness. **Food Control**, v. 126, p. 108046, 2021.

EZATI, P.; TAJIK, H.; MORADI, M.; MOLAEI, R. Intelligent pH-sensitive indicator based on starch-cellulose and alizarin dye to track freshness of rainbow trout fillet. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 157–165, 2019.

FANG, Z.; ZHAO, Y.; WARNER, R. D.; JOHNSON, S. K. Active and intelligent packaging in meat industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 61, p. 60-71, 2017.

FERRARO, G.; IMBIMBO, P.; MARSEGLIA, A.; ILLIANO, A.; FONTANAROSA, C.; AMORESANO, A.; OLIVIERI, G.; POLLIO, A.; MONTI, D. M.; MERLINO, A. A thermophilic C-phycocyanin with unprecedented biophysical and biochemical properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 38-51, 2020.

FILIPINI, G. S.; ROMANI, V. P.; MARTINS, V. G. Biodegradable and active-intelligent films based on methylcellulose and jambolão (*Syzygium cumini*) skins extract for food packaging, **Food Hydrocolloids**, v. 109, p. 106139, 2020.

FONSECA, L. M.; CRUXEN, C. E. S.; BRUNI, G. P.; FIORENTINI, A. M.; ZAVAREZE, E. R.; LIM, L.-T.; DIAS, A. R. G. Development of antimicrobial and antioxidant electrospun soluble potato starch nanofibers loaded with carvacrol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 1182-1190, 2019.

FORTUNATI, E.; ARMENTANO, I.; IANNONI, A.; KENNY, J. M. Development and thermal behaviour of ternary PLA matrix composites. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, p. 2200–2206, 2010.

FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; COLOGNA, N.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Microbial analysis of raw cows milk used for cheese making: Influence of storage treatments on microbial composition and other technological traits. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 171–180, 2011.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Ed Atheneu, 2008.

FRENOT, A.; CHRONAKIS, I. S. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 8, n. 1, p. 64-75, 2003.

GADEA, R.; FUENTES, M. Á. F.; PULIDO, R. P.; GÁLVEZ, A.; ORTEGA, E. Adaptive tolerance to phenolic biocides in bacteria from organic foods: Effectson antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses. **FoodResearch International**, v. 85, p. 131–143, 2016.

GARCÍA, J.L.; VICENTE, M.; GALÁN, B. Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. **Microbial Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 1017-1024, 2017.

GERHARDT, R.; FARIAS, B. S.; MOURA, J. M.; ALMEIDA, L. S.; SILVA, A. R.; DIAS, D.; CADAVAL, T. R. S.; PINTO, L. A. A. Development of chitosan/*Spirulina* sp. blend films as biosorbents for Cr⁶⁺ and Pb²⁺ removal. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 155, p. 142-152, 2020.

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

GIANNAKOUROU, M. C.; KOUTSOUMAINS, K.; NYCHAS, G. J. E.; TAOUKIS, P. S. Field evaluation of the application of time temperature integrators for monitoring fish quality in the chill chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 323-336, 2005.

GÖRS, M.; SCHUMANN, R.; HEPPELE, D.; KARSTEN, U. Quality analysis of commercial Chlorella products used as dietary supplement in human nutrition. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, p. 265–276, 2010.

GUNAWAN, M. I.; BARRINGER, S. A. Green color degradation of blanched broccoli (*Brassica oleracea*) due to acid and microbial growth. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 24, p. 253–263, 2000.

GUO, M.; WANG, H.; WANG, Q.; CHEN, M.; LI, L.; LI, X.; JIANG, S. Intelligent double-layer fiber mats with high colorimetric response sensitivity for food freshness monitoring and preservation. **Food Hydrocolloids**, v. 101, p. 105468, 2020.

HAIDER, S.; AL-ZEGHAYER, Y.; ALI, F. A.; HAIDER, A.; MAHMOOD, A.; AL-MASRY, W.; IMRAN, M.; AIJAZ, M. Highly aligned narrow diameter chitosan electrospun nanofibers. **Journal of Polymer Research**, v. 20, n. 4, p. 1–11, 2013.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 709-732, 2012.

HE, C. L.; NIE, W.; FENG, W. Engineering of biomimetic nanofibrous matrices for drug delivery and tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, p. 7828-7848, 2014.

HOGAN, S. A.; KERRY, J. P. **Smart packaging of meat and poultry**. In: Kerry, J.; Butler, P. (Eds), *Smart Packaging Technologies for Fast Moving Consumer Goods*. John Wiley and Sons Ltd., West Sussex, p. 33–60, 2008.

HOPKIN, D. L.; PONNAMPALAM, E. N.; VAN DE VEN, R. J.; WARNER, R. D. The effect of pH decline rate on the meat and eating quality of beef carcasses. **Animal Production Science**, v. 54, p. 407–413, 2014.

HURLEY, B. R. A.; OUZTS, A.; FISCHER, J.; GOMES, T. 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, p. 399–412, 2014.

HUSSAIN, M. M.; ASIRI, A. M.; ARSHAD, M. N.; RAHMAN, M. M. Development of selective Co²⁺-ionic sensor based on various derivatives of benzenesulfonohydrazide (BSH) compound: An electrochemical approach. **Chemical Engineering Journal**, v. 339, p. 133–143, 2018.

HWANG, S. W.; SHIM, J. K.; SELKE, S. E. M.; SOTO-VALDEZ, H.; MATUANA, L.; RUBINO, M.; AURAS, R. Poly(L-lactic acid) with added α-tocopherol and resveratrol: optical, physical, thermal and mechanical properties. **Polymer International**, v. 61, p. 418–425, 2012.

JAMRÓZ, E.; KULAWIK, P.; KRZYŚCIAK, P.; TALAGA-ĆWIERTNIA, K.; JUSZCZAK, L. Intelligent and active furcellaran-gelatin films containing green or pu-erh tea extracts: Characterization, antioxidant and antimicrobial potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 745–757, 2019.

JAWOREK, A.; KRUPA, A.; LACKOWSKI, M.; SOBCZYK, A. T.; CZECH, T.; RAMAKRISHNA, S.; SUNDARRAJAN, S.; PLISZKA, D. Nanocomposite fabric formation by electrospinning and electrospraying technologies. **Journal of Electrostatics**, v. 67, p. 435–438, 2009.

JEBEL, F. S.; ALMASI, H. Morphological, physical: Antimicrobial and release properties of ZnO nanoparticles-loaded bacterial cellulose films. **Carbohydrate Polymers**, v. 149, p. 8–19, 2016.

JENSEN, S.; KNUTSEN, G. Influence of light and temperature on photoinhibition of photosynthesis in *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 5, p. 495–504, 1993.

JHUANG, J.-R.; LIN, S.-B.; CHEN, L.-C.; LOU, S.-N.; CHEN, S.-H.; CHEN, H.-H. Development of immobilized laccase-based time temperature indicator by electrospinning zein fiber. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 23, p. 100436, 2020.

KALPANA, S.; PRIYADARSHINI, S. R.; LEENA, M. M.; MOSES, J. A.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Intelligent packaging: Trends and applications in food systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 93, p. 145–157, 2019.

KANATT, S. R. Development of active/intelligent food packaging film containing *Amaranthus* leaf extract for shelf life extension of chicken/fish during chilled Storage. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 24, p. 100506, 2020.

KANG, S.; WANG, H.; GUO, M.; ZHANG, L.; CHEN, M.; JIANG, S.; LI, X.; JIANG, S. Ethylene-vinyl alcohol copolymer–montmorillonite multilayer barrier film coated with mulberry anthocyanin for freshness monitoring. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 13268–13276, 2018.

KELLY, C. A.; SANTOVITO, E.; CRUZ-ROMERO, M.; KERRY, J. P.; PAPKOVSKY, D. P. Application of O₂ sensor technology to monitor performance of industrial beef samples packaged on three different vacuum packaging machines. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 304, p. 127338, 2020.

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

KHANRA, S.; MONDAL, M.; HALDER, G.; TIWARI, O.N.; GAYEN, K.; BHOWMICK, T. K. Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review. **Food and Bioproducts Processing**, v. 110, p. 60-84, 2018.

KIM, D.; LEE, S.; LEE, K.; BAEK, S.; SEO, J. Development of a pH indicator composed of high moisture-absorbing materials for real-time monitoring of chicken breast freshness. **Food Science and Biotechnology**, v. 26, p. 37-42, 2017.

KOCA, N.; KARADENIZ, F.; BURDURLU, H. S. Effect of pH on chlorophyll degradation and colour loss in blanched green peas. **Food Chemistry**, v. 100, p. 609–615, 2007.

KOSHY, R. R.; KOSHY, J. T.; MARY, S. K.; SADANANDAN, S.; JISHA, S.; POTHAN, L. A. Preparation of pH sensitive film based on starch/carbon nano dots incorporating anthocyanin for monitoring spoilage of pork. **Food Control**, v. 126, p. 108039, 2021

KUNTZLER, S. G.; ALMEIDA, A. C. A.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Polyhydroxybutyrate and phenolic compounds microalgae electrospun nanofibers: A novel nanomaterial with antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 1008-1014, 2018

KUNTZLER, S. G.; COSTA, J. A. V.; BRIZIO, A. P. D. R.; MORAIS, M. G. Development of a colorimetric pH indicator using nanofibers containing *Spirulina* sp. LEB 18. **Food Chemistry**, v. 328, p. 126768, 2020.

KUNTZLER, S. G.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Development of electrospun nanofibers containing chitosan/PEO blend and phenolic compounds with antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 800–806, 2018.

KUNTZLER, S. G.; UEBEL, L. S.; SCHMATZ, D. A.; BARCIA, M. T.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. **Nanofibers and Their Applications**. In Nalwa, H. S. (Ed.), Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, v. 28, p. 387–414, 2018.

KUSWANDI, B. Freshness Sensors for Food Packaging. **Reference Module in Food Science**, 2017.

KUSWANDI, B.; JAYUS; RESTYANA, A.; ABDULLAH, A.; HENG, L. Y.; AHMAD, M. A novel colorimetric food package label for fish spoilage based on polyaniline film. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 184-189, 2012.

KUSWANDI, B.; NURFAWAIDI, A. On-package dual sensors label based on pH indicators for real-time monitoring of beef freshness. **Food Control**, v. 82, p. 91–100, 2017.

- LEE, K.; BAEK, S.; KIM, D.; SEO, J. A freshness indicator for monitoring chicken-breast spoilage using a Tyvek® sheet and RGB color analysis. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 19, p. 40–46, 2019a.
- LEE, K.; BAEK, S.; KIM, D.; SEO, J. Development of a food freshness indicator for monitoring spoilage of chicken breast using a porous substrate. **Korean Journal of Packaging Science and Technology**, v. 23, p. 37-45, 2017.
- LEE, K.; PARK, H.; BAEK, S.; HAN, S.; KIM, D.; CHUNG, S.; YOON, J.-Y.; SEO, J. Colorimetric array freshness indicator and digital color processing for monitoring the freshness of packaged chicken breast. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 22, p. 100408, 2019b.
- LEE, R. E. Basic characteristics of the algae. In: LEE, R. E. (Ed.). **Phycology**. 4. ed. New York, Cambridge University Press, 2008.
- LEIDY, R.; XIMENA, Q.-C. M. Use of electrospinning technique to produce nanofibres for food industries: A perspective from regulations to characterisations. **Trends in Food Science & Technology**, v. 85, p. 92–106, 2019.
- LI, D.; XIA, Y. N. Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel? **Advanced Materials**, v. 16, p. 1151-1170, 2004.
- LI, Y.; YU, J.; DING, B. **Facile and ultrasensitive sensors based on electrospinning-netting nanofibers/net**. In Macagnano, A.; Zampetti, E.; Kny, E. (Eds), *Electrospinning High Perform. Sensors*, Springer, p. 1-34, 2015.
- LIN, L.; GU, Y.; CUI, H. Moringa oil/chitosan nanoparticles embedded gelatin nanofibers for food packaging against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on cheese. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 19, p. 86–93, 2019.
- LIU, Y.; HAO, M.; CHEN, Z.; LIU, L.; LIU, Y.; YANG, W.; RAMAKRISHNA, S. A Review on Recent Advances in Application of Electrospun Nanofiber Materials as Biosensors. **Current Opinion in Biomedical Engineering**, v. 13, p. 174-189, 2020.
- LOCILENTO, D. A.; MERCANTE, L. A.; ANDRE, R. S.; MATTOSO, L. H. C.; LUNA, G. L. F.; BRASSOLATTI, P.; ANIBAL, F. F.; CORREA, D. S. Biocompatible and Biodegradable Electrospun Nanofibrous Membranes Loaded with Grape Seed Extract for Wound Dressing Application. **Journal of Nanomaterials**, v. 2019, p. 11, 2019.
- LU, P.; XIA, Y. Maneuvering the internal porosity and surface morphology of electrospun polystyrene yarns by controlling the solvent and relative humidity. **Langmuir**, v. 29, p. 7070-7078, 2013.
- LUO, C. J.; STOYANOV, S. D.; STRIDE, E.; PELAN, E.; EDIRISINGHE, M. Electrospinning versus fibre production methods: from specifics to technological convergence. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 4708-4735, 2012.
- LUO, X.; LIM, L.-T. Curcumin-loaded electrospun nonwoven as a colorimetric indicator for volatile amines. **LWT**, v. 128, p. 109493, 2020.

LYU, F.; SHEN, K.; DING, Y.; MA, X. Effect of pretreatment with carbon monoxide and ozone on the quality of vacuum packaged beef meats. **Meat Science**, v. 117, p. 137–146, 2016.

LYU, J. S.; CHOI, I.; HWANG, K.-S.; LEE, J.-Y.; SEO, J.; KIM, S. Y.; HAN, J. Development of a BTB-/TBA+ ion-paired dye-based CO₂ indicator and its application in a multilayered intelligent packaging system. **Sensors & Actuators B: Chemical**, v. 282, p. 359–365, 2019.

MA, Q.; REN, Y.; GU, Z.; WANG, L. Developing an intelligent film containing *Vitis amurensis* husk extracts: The effects of pH value of the film-forming solution. **Journal of Cleaner Production**, p. 166, v. 851–859, 2017.

MA, Q.; WANG, L. Preparation of a visual pH-sensing film based on tara gum incorporating cellulose and extracts from grape skins. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 235, p. 401–407, 2016.

MACAGNANO, A.; ZAMPETTI, E.; KNY, E. Electrospinning for high performance sensors. **Springer**, 2015.

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

MACINTYRE, H. L.; KANA, T. M.; ANNING, T.; GEIDER, R. J. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. **Journal of Phycology**, v. 38, p. 17–38, 2002.

MAFTOONAZAD, N.; RAMASWAMY, H. Design and testing of an electrospun nanofiber mat as a pH biosensor and monitor the pH associated quality in fresh date fruit (*Rutab*). **Polymer Testing**, v. 75, p. 76–84, 2019.

MAHDAVI, S. A.; JAFARI, S. M.; GHORBANI, M.; ASSADPOOR, E. Spray-Drying microencapsulation of Anthocyanins by natural biopolymers: A review. **Drying Technology**, v. 32, p. 509–518, 2014.

MAI, N. T. T.; GUDJÓNSDÓTTIR, M.; LAUZON, H. L.; SVEINSDÓTTIR, K.; MARTINSDÓTTIR, E.; AUDORFF, H.; REICHSTEIN, W.; HAARER, D.; BOGASON, S. G.; ARASON, S. Continuous quality and shelf life monitoring of retail-packed fresh cod loins in comparison with conventional methods. **Food Control**, v. 22, p. 1000–1007, 2011.

MARKOU, G.; NERANTZIS, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1532–1542, 2013.

MARQUEZ, U. M. L.; SINNECKER, P. **Chlorophylls in foods: Sources and stability**. Oxfordshire: Taylor & Francis Group, 2007.

MARTINO, V. P.; JIMENEZ, A.; RUSECKAITE, R. A.; AVEROUS, L. Structure and properties of clay nano-biocomposites based on poly(lactic acid) plasticized with polyadipates, **Polymers for Advanced Technologies**, v. 22, p. 2206–2213, 2011.

MEDINA-JARAMILLO, C.; OCHOA-YEPES, O.; BERNAL, C.; FAMÁ, L. Active and smart biodegradable packaging based on starch and natural extracts. **Carbohydrate Polymers**, v. 176, p. 187–194, 2017.

MEGELSKI, S.; STEPHENS, J. S.; CHASE, D. B.; RABOLT, J. F. Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers. **Macromolecules**, v. 35, p. 8456–8466, 2002.

MEHAUDEN, K.; COX, P. W.; BAKALIS, S.; SIMMONS, M. J. H.; TUCKER, G. S.; FRYER, P. J. A novel method to evaluate the applicability of time temperature integrators to different temperature profiles. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 507–514, 2007.

MERCANTE, L. A.; SCAGION, V. P.; MIGLIORINI, F. L.; MATTOSO, L. H. C.; CORREA, D. S. Electrospinning-based (bio)sensors for food and agricultural applications: A review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 91, p. 91–103, 2017.

MOHAMMADALINEJHAD, S.; ALMASI, H.; MORADI, M. Immobilization of *Echium amoenum* anthocyanins into bacterial cellulose film: A novel colorimetric pH indicator for freshness/spoilage monitoring of shrimp. **Food Control**, v. 113, p. 107169, 2020.

MOHAMMADI, M.A.; HOSSEINI, S. M.; YOUSEFI, M. Application of electrospinning technique in development of intelligent food packaging: A short review of recent trends. **Food Science & Nutrition**, v. 8, p. 4656–4665, 2020.

MOHEBI, E.; MARQUEZ, L. Intelligent packaging in meat industry: An overview of existing solutions. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 3947–3964, 2015.

MOLINO, A.; IOVINE, A.; CASELLA, P.; MEHARIYA, S.; CHIANESE, S.; CERBONE, A.; RIMAURO, J.; MUSMARRA, D. Microalgae Characterization for Consolidated and New Application in Human Food, Animal Feed and Nutraceuticals. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 150, n. 11, p. 2436, 2018.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in Southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, n. 1–2, p. 60–64, 2009.

MORAIS, M. G.; VAZ, B. S.; MORAIS, E. G.; COSTA, J. A.V. Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

MOREIRA, J. B.; KUNTZLER, S. G.; TERRA, A. L. M.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. **Electrospun nanofibers: Fundamentals, food packaging technology, and safety**. In Rangappa, S. M.; Parameswaranpillai, J.; Thiagamani, S. M. K.; Krishnasamy, S.; Siengchin S. (Eds.), *Food packaging advanced materials, technologies, and innovations* (p. 223–254). United Kingdom: Taylor Francis, 2020.

MOREIRA, J. B.; LIM, L.-T.; ZAVAREZE, E. R.; DIAS, A. R. G.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Antioxidant ultrafine fibers developed with microalga compounds using a free surface electrospinning. **Food Hydrocolloids**, v. 93, p. 131–136, 2019.

MOREIRA, J. B.; TERRA, A. L. M.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Development of pH indicator from PLA/PEO ultrafine fibers containing pigment of microalgae origin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1855–1862, 2018.

MORENO-GARRIDO, I. Microalgae immobilization: current techniques and uses. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 3949–3964, 2008.

MORTENSEN, A.; SKIBSTED, L. H. Kinetics and mechanism of the primary steps of degradation of carotenoids by acid in homogeneous solution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 279–286, 2000.

MÜLLER, P.; SCHMID, M. Intelligent packaging in the food sector: A brief overview. **Foods**, v. 8, p. 16, 2019.

MUNAWAROH, H. S. H.; GUMILAR, G. G.; ALIFIA, C. R.; MARTHANIA, M.; STELLASARY, B.; YULIANI, G.; WULANDARI, A. P.; KURNIAWAN, I.; HIDAYAT, R.; NINGRUM, A.; KOYANDE, A. K.; SHOW, P.-L. Photostabilization of phycocyanin from *Spirulina platensis* modified by formaldehyde. **Process Biochemistry**, v. 94, p. 297–304, 2020.

MUSHTAQ, M.; GANI, A.; GANI, A.; PUNOO, H. A.; MASOODI, F. A. Use of pomegranate peel extract incorporated zein film with improved properties for prolonged shelf life of fresh Himalayan cheese (Kalari/kradi). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 48, p. 25–32, 2018.

NABAVI, S. M.; SILVA, A. S. **Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements**. London: Elsevier, 2019.

NIU, B.; ZHAN, L.; SHAO, P.; XIANG, N.; SUN, P.; CHEN, H.; GAO, H. Electrospinning of zein-ethyl cellulose hybrid nanofibers with improved water resistance for food preservation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 142, p. 592–599, 2020.

NUIN, M.; ALFARO, B.; CRUZ, Z.; ARGARATE, N.; GEORGE, S.; LE MARC, Y.; OLLEY, J.; PIN, C. Modelling spoilage of fresh turbot and evaluation of a time–temperature integrator (TTI) label under fluctuating temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 27, p. 193–199, 2008.

NYCHAS, G. J. E.; SKANDAMIS, P. N.; TASSOU, C. C.; KOUTSOUMANIS, K. P. Meat spoilage during distribution. **Meat Science**, v. 78, p. 77–89, 2008.

ODEYEMI, O. A.; ALEGBELEYE, O. O.; STRATEVA, M.; STRATEV, D. Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, p. 311–331, 2020.

ODJADJARE, E.C.; MUTANDA, T.; OLANIRAN, A.O. Potential biotechnological application of microalgae: a critical review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 370, n. 1, p. 37–52, 2017.

PAI, A. J.; SAROJINI, B. K.; HARSHITH, K. R.; HOLLA, B. S.; LOBO, A. G. Spectral, morphological and optical studies on bischalcone doped polylactic acid (PLA) thin films as

luminescent and UV radiation blocking materials. **Optical Materials**, v. 90, p. 145–151, 2019.

PATEL, H. M.; ROSZAK, A. W.; MADAMWAR, D.; COGDELL, R. J. Crystal structure of phycocyanin from heterocyst-forming filamentous cyanobacterium *Nostoc* sp. WR13. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 135, p. 62–68, 2019.

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

PÉREZ-PÉREZ, M. E.; COUSO, I.; JOSÉ, L.; CRESPO, J. L. Carotenoid deficiency triggers autophagy in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Autophagy**, v. 8, p. 376–388, 2012.

PERSANO, L.; CAMPOSEO, A.; TEKMEEN, C.; PISIGNANO, D. Industrial upscaling of electrospinning and applications of polymer nanofibers: A review. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 298, p. 504–520, 2013.

PHAM, Q. P.; SHARMA, U.; MIKOS, A. G. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: A review. **Tissue Engineering**, v. 12, p. 1197–1211, 2006.

PHUKAN, M. M.; CHUTIA, R. S.; KONWAR, B. K.; KATAKI, R. Microalgae *Chlorella* as an potential bio-energy feedstock. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3307–3312, 2011.

POURJAVAHHER, S.; ALMASI, H.; MESHKINI, S.; PIRSA, S.; PARANDI, E. Development of a colorimetric pH indicator based on bacterial cellulose nanofibers and red cabbage (*Brassica oleraceae*) extract. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 193–201, 2017.

POYATOS-RACIONERO, E.; ROS-LIS, J. V.; VIVANCOS, J. L.; MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R. Recent advances on intelligent packaging as tools to reduce food waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, p. 3398–3409, 2018.

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

PRIETTO, L.; PINTO, V. Z.; EL HALAL, S. L. M.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; LIM, L.-T.; DIAS, A. R. G.; ZAVAREZE, E. R. Ultrafine fibers of zein and anthocyanins as natural pH indicator. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 7, p. 2735–2741, 2018.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of micro algae: a review. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 3, n. 4, p. 89–100, 2012.

PULIGUNDLA, P.; JUNG, J.; KO, S. Carbon dioxide sensors for intelligent food packaging applications. **Food Control**, v. 25, p. 328–333, 2012.

QU, F.; GONG, N.; WANG, S.; GAO, Y.; SUN, C.; FANG, W.; MEN, Z. Effect of pH on fluorescence and absorption of aggregates of chlorophyll a and carotenoids. **Dyes and Pigments**, v. 173, p. 107975, 2020.

RAMAKRISHNA, S.; FUJUHARA, K.; TEO, W. E.; LIM, T. C.; MA, Z. **An introduction to electrospinning and nanofibers**. Singapore: World Scientific Publishing Company, 2005.

RANJBARYAN, S.; POURFATHI, B.; ALMASI, H. Reinforcing and release controlling effect of cellulose nanofiber in sodium caseinate films activated by nanoemulsified cinnamon essential oil. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 21, p. 100341, 2019.

RAO, B. N.; SUVARNA, R. P. A study on optical properties of poly (ethylene oxide) based polymer electrolyte with different alkali metal iodides. **AIP Conference Proceedings**, v. 1728, p. 020076, 2016.

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

ROBERTSON, G.L. **Food Packaging**. In Van Alfen, N. K. (Ed.), *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*. Academic Press, Oxford, p. 232-249, 2014.

ROBERTSON, G.L. **Food packaging: principles and practice**. 3 ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, pp 414-420, 2013.

ROMANO, I.; BELLITTI, M. R.; NICOLAUS, B.; LAMA, L.; MANCA, M. C.; PAGNOTTA, E.; GAMBACORTA, A. Lipid profile: a useful chemotaxonomic marker for classification of a new cyanobacterium in *Spirulina* genus. **Phytochemistry**, v. 54, n. 3, p. 289–294, 2000.

RUKCHON, C.; NOPWINYUWONG, A.; TREVANICH, S.; JINKARN, T.; SUPPAKUL, P. Development of a food spoilage indicator for monitoring freshness of skinless chicken breast. **Talanta**, v. 130, p. 547–554, 2014.

SAFI, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P.-Y., VACA-GARCIA, C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 265-278, 2014.

SAFI, S.; MORSHED, M.; RAVANDI, S. A. H.; GHIACI, M. Study of electrospinning of sodium alginate, blended solutions of sodium alginate/poly(vinyl alcohol) and sodium alginate/poly(ethylene oxide). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 104, n. 5, p. 3245-3255, 2007.

SALIU, F.; DELLA-PERGOLA, R. Carbon dioxide colorimetric indicators for food packaging application: Applicability of anthocyanin and poly-lysine mixtures. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 258, p. 1117–1124, 2018.

SANFELICE, C., MENDES, A. A., KOMIYAMA, C. M., CAÑIZARES, M. C., RODRIGUES, L., CAÑIZARES, G. I., ROÇA, R. O., ALMEIDA, I. C. L. P., BALOG, A., MILBRADT, E. L., CARDOSO, K. F. G. Evaluation and characterization of breast quality of broiler breeder hen in the end of productive cycle. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 166-170, 2010.

SANI, M. A.; TAVASSOLI, M.; HAMISHEHKAR, H.; MCCLEMENTS, D. J. Carbohydrate-based films containing pH-sensitive red barberry anthocyanins: Application as

biodegradable smart food packaging materials. **Carbohydrate Polymers**, v. 255, 1p. 17488, 2021.

SCAMPICCHIO, M.; BULBARELLO, A.; ARECCHI, A.; COSIO, M. S.; BENEDETTI, S.; MANNINO, S. Electrospun nonwoven nanofibrous membranes for sensors and biosensors. **Electroanalysis**, v. 24, p. 719-725, 2012.

SCHMATZ, D. A.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. A novel nanocomposite for food packaging developed by electrospinning and electrospraying. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 20, p. 100314, 2019.

SCHMATZ, D. A.; UEBEL, L. S.; KUNTZLER, S. G.; DORA, C. L.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Scaffolds containing *Spirulina* sp. LEB 18 biomass: Development, characterization and evaluation of in vitro biodegradation. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 1050-1059, 2016.

ŞENGÜL, B.; DILSİZ, N. Barrier properties of polylactic acid/layered silicate nanocomposites for food contact applications. **Polymer Science**, v. 56, p. 896-906, 2014.

SHEN, G.; SCHLUCHTER, W. M.; BRYANT, D. A. Biogenesis of phycobiliproteins: I. cpcS-I and cpcU mutants of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 define a heterodimeric phycocyanobilin lyase specific for beta-phycocyanin and allophycocyanin subunits. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 12, p. 7503–7512, 2008.

SHI, C.; ZHANG, J.; JIA, Z.; YANG, X.; ZHOU, Z. Intelligent pH indicator films containing anthocyanins extracted from blueberry peel for monitoring tilapia fillet freshness. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, p. 1800-1811, 2021.

SILVA, C. K.; MASTRANTONIO, D. J. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Innovative pH sensors developed from ultrafine fibers containing açai (*Euterpe oleracea*) extract. **Food Chemistry**, v. 294, p. 397–404, 2019.

SINGH, S.; NWABOR, O. F.; SYUKRI, D. M.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Chitosan-poly(vinyl alcohol) intelligent films fortified with anthocyanins isolated from *Clitoria ternatea* and *Carissa carandas* for monitoring beverage freshness. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 1015-1025, 2021.

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

SMOLANDER, M. The use of freshness indicators in packaging. In Ahvenainen, R. **Novel food packaging techniques**, Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd., p. 128-143, 2003.

SPOLAORE, P.; CASSAN, C. J.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial application of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, p. 87–96, 2006.

SUNDARAY, B.; SUBRAMANIAN, V.; NATARAJAN, T.S.; XIANG, R.-Z.; CHANG, C.-C.; FANN, W.-S. Electrospinning of continuous aligned polymer fibers. **Applied Physics Letters**, v. 84, n. 7, p. 1222-1224, 2004.

SURENDRHIRAN, D.; LI, C.; CUI, H.; LIN, L. Fabrication of high stability active nanofibers encapsulated with pomegranate peel extract using chitosan/PEO for meat preservation. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 23, p. 100439, 2020.

TAOUKIS, P. S. **Application of time-temperature integrators for monitoring and management of perishable product quality in the cold chain, in smart packaging technologies for fast moving consumer goods**. John Wiley & Sons, p. 61-74, 2008.

TASSANAWAT, S.; PHANDEE, A.; MAGARAPHAN, R.; NITHITANAKUL, M.; MANUSPIYA, H. pHsensitive PP/clay nanocomposites for beverage smart packaging, in: Proceedings of the 2nd IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, INSPEC: 9539713, IEEE Publisher, Thailand, p. 16–99, 2007.

TERRA, A. L. M.; MOREIRA, J. B.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Development of time-pH indicator nanofibers from natural pigments: An emerging processing technology to monitor the quality of foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 142, p. 111020, 2021.

THENMOZHI, S.; DHARMARAJ, N.; KADIRVELU, K.; KIM, H. Y. Electrospun nanofibers: new generation materials for advanced applications. **Materials Science and Engineering: B**, v. 217, p. 36-48, 2017.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TIRTASHI, F.E.; MORADI, M.; TAJIK, H.; FOROUGH, M.; EZATI, P.; KUSWANDI, B. Cellulose/chitosan pH-responsive indicator incorporated with carrot anthocyanins for intelligent food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 920–926, 2019.

TONG, X.; PRASANNA, G.; ZHANG, N.; JING, P. Spectroscopic and molecular docking studies on the interaction of phycocyanobilin with peptide moieties of C-phycocyanin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 236, p. 118316, 2020.

TOPUZ, F.; UYAR, T. Antioxidant, antibacterial and antifungal electrospun nanofibers for food packaging applications. **Food Research International**, v. 130, p. 108927, 2020.

TORO-MÁRQUEZ, L. A.; MERINO, D.; GUTIÉRREZ, T. J. Bionanocomposite films prepared from corn starch with and without nanopackaged Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) flower extract. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, p. 1955–1973, 2018.

TRIBESS, T. B.; TADINI, C. C. Inactivation kinetics of pectin methylesterase in orange juice as a function of pH and temperature/time process conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1328-1335, 2006.

TRIPATANASUWAN, S.; ZHONG, Z.; RENEKER, D. Effect of evaporation and solidification of the charged jet in electrospinning of poly (ethylene oxide) aqueous solution. **Polymer**, v. 48, n. 19, p. 5742-5746, 2007.

TRIPATHY, S.; REDDY, M. S.; VANJARI, S. R. K.; JANA, S.; SINGH, S. G. A step towards miniaturized milk adulteration detection system: Smartphone-based accurate pH

sensing using electrospun halochromic nanofibers. **Food Analytical Methods**, v. 12, p. 612–624, 2019.

TSIRONI, T.; STAMATIOU, A.; GIANNOGLOU, M.; VELLIU, E.; TAOUKIS, P. S. Predictive modelling and selection of time temperature integrators for monitoring the shelf life of modified atmosphere packed gilthead seabream fillets. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 1156–1163, 2011.

TUCKER, G. S.; BROWN, H. M.; FRYER, P. J.; COX, P. W.; POOLE, F. L.; LEE, H. S. A sterilization time–temperature integrator based on amylase from the hyperthermophilic organism *Pyrococcus furiosus*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 63–72, 2007.

TUCKER, G.; HANBY, E.; BROWN, H. Development and application of a new time–temperature integrator for the measurement of P-values in mild pasteurization processes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, p.23–33, 2009.

VAIKOUSI, H.; BILIADERIS, C. G.; KOUTSOUMANIS, K. P. Applicability of a microbial time–temperature indicator (TTI) for monitoring spoilage of modified atmosphere packed minced meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, n. 3, p. 272–278, 2009.

VANDERROOST, M.; RAGAERT, P.; DEVLIEGHERE, F.; MEULENAER, B. Intelligent food packaging: The next generation. **Trends in Food Science and Technology**, v. 39, n.1, p. 47–62, 2014.

VARELA, J. C.; PEREIRA, H.; VILA, M.; LEÓN, R. Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. **Photosynthesis Research**, v. 125, p. 423–436, 2015.

VASS, P.; SZABÓ, E.; DOMOKOS, A.; HIRSCH, E.; GALATA, D.; FARKAS, B.; DÉMUTH, B.; ANDERSEN, S. K.; VIGH, T.; VERRECK, G.; MAROSI, G.; NAGY, Z. K. Scale-up of electrospinning technology: Applications in the pharmaceutical industry. **WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 12, p. 1611, 2020.

VAZ, B. S.; MOREIRA, J. B.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 73–77, 2016.

VEGA-LUGO, A. C.; LIM, L. T. Controlled release of allyl isothiocyanate using soy protein and poly (lactic acid) electrospun fibers. **Food Research International**, v. 42, p. 933–940, 2009.

VEGARA, S.; MARTI, N.; LORENTE, J.; COLL, L.; STREITENBERGER, S.; VALERO, M.; SAURA, D. Chemical guide parameters for *Punica granatum* cv. ‘Mollar’ fruit juices processed at industrial scale. **Food Chemistry**, v. 147, p. 203–208, 2014.

VOLK, R. B. A newly developed assay for the quantitative determination of antimicrobial (anticyanobacterial) activity of both hydrophilic and lipophilic test compounds without any restriction. **Microbiological Research**, v. 163, n. 2, p. 161–167, 2008.

VOLK, R. B.; FURKERT, F. H. Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. **Microbiological Research**, v. 161, n. 2, p. 180–186, 2006.

VOS, P.; FAAS, M. M.; SPASOJEVIC, M.; SIKKEMA, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 4, p. 292-302, 2010.

VRIEZE, S.; CAMP, T. V.; NELVIG, A.; HAGSTRÖM, B.; WESTBROEK, P.; CLERCK, K. The effect of temperature and humidity on electrospinning. **Journal of Materials Science**, v. 44, n. 5, 2009.

WANG, D.; CHENG, W.; WANG, Q.; ZANG, J.; ZHANG, Y.; HAN, G. Preparation of electrospun chitosan/poly(ethylene oxide) composite nanofibers reinforced with cellulose nanocrystals: Structure, morphology, and mechanical behavior. **Composites Science and Technology**, v. 182, p. 107774, 2019.

WANG, K.; WU, K.; XIAO, M.; KUANG, Y.; CORKE, H.; NI, X.; JIANG, F. Structural characterization and properties of konjac glucomannan and zein blend films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, n. 1, p. 1096-1104, 2017.

WANG, N.; XU, Z.; QU, Y.; ZHENG, G.; DAI, K.; LIU, C.; SHEN, C. Liquid sensing behaviors of carbon black/polyamide 6/high-density polyethylene composite containing ultrafine conductive electrospun fibrous network. **Colloid and Polymer Science**, v. 294, n. 8, p. 1343-1350, 2016a.

WANG, T.; GUO, Y.; WAN, P.; ZHANG, H.; CHEN, X.; SUN, X. Flexible transparent electronic gas sensors. **Small**, v. 12, n. 28, p. 3748-3756, 2016b.

WEI, Y.-C.; CHENG, C.-H.; HO, Y.-C.; TSAI, M.-L.; MI, F.-L. Active gellan gum/purple sweet potato composite films capable of monitoring pH variations. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 491-502, 2017.

WELLS, 'N.; YUSUFU, D.; MILLS, A. Colourimetric plastic film indicator for the detection of the volatile basic nitrogen compounds associated with fish spoilage. **Talanta**, v. 194, p. 830-83, 2019.

WU, H. L.; WANG, G. H.; XIANG, W. Z.; LI, T.; HE, H. Stability and antioxidant activity of food-grade phycocyanin isolated from *Spirulina platensis*. **International Journal of Food Properties**, v. 19, n. 10, p. 2349–2362, 2016.

XIAO, Y.; LIU, Y.; KANG, S.; CUI, M.; XU, H. Development of pH-responsive antioxidant soy protein isolate films incorporated with cellulose nanocrystals and curcumin nanocapsules to monitor shrimp freshness. **Food Hydrocolloids**, v. 120, p. 106893, 2021.

XUE, J.; WU, T.; DAI, Y.; XIA, Y. Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 8, p. 5298-5415, 2019.

YAAKOB, Z.; ALI, E.; ZAINAL, A.; MOHAMAD, M.; TAKRIFF, M.S. An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. **Journal of Biological Research-Thessaloniki**, v. 210, n. 1, p. 6, 2014.

- YAM, K. L.; TAKHISTOV, P. T.; MILTZ, J. Intelligent packaging: Concepts and Applications. **Journal of Food Science**, v. 70, p. R1-R10, 2005.
- YAMAMOTO, M.; FUJISHITA, M.; HIRATA, A.; KAWANO, S. Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). **Journal of Plant Research**, v. 117, p. 257–64, 2004.
- YAMAMOTO, M.; KURIHARA, I.; KAWANO, S. Late type of daughter cell wall synthesis in one of the *Chlorellaceae*, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). **Planta**, v. 221, p. 766–75, 2005.
- YANG, T.; ZHAN, L.; HUANG, C. Z. Recent insights into functionalized electrospun nanofibrous films for chemo-/bio-sensors. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 124, p. 115813, 2020.
- YAO, X.; QIN, Y.; ZHANG, M.; ZHANG, J.; QIAN, C.; LIU, J. Development of active and smart packaging films based on starch, polyvinyl alcohol and betacyanins from different plant sources. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 358-368, 2021.
- YARIN, A.; KOOMBHONGSE, S.; RENEKER, D. Bending instability in electrospinning of nanofibers. **Journal Applied Physics**, v. 89, n. 5, 2001.
- YILDIZ, E.; SUMNU, G.; KAHYAOGU, L. N. Monitoring freshness of chicken breast by using natural halochromic curcumin loaded chitosan/PEO nanofibers as an intelligent package. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 170, p. 437–446, 2021.
- YONG, H.; WANG, X.; ZHANG, X.; LIU, Y.; QIN, Y.; LIU, J. Effects of anthocyanin rich purple and black eggplant extracts on the physical, antioxidant and pH-sensitive properties of chitosan film. **Food Hydrocolloids**, v. 94, p. 93–104, 2019.
- YUAN, Y.; LEE, T. R. **Contact Angle and Wetting Properties**, p. 3–34, 2013.
- YUSUFU, D.; WANG, C.; MILLS, A. Evaluation of an ‘After Opening Freshness (AOF)’ label for packaged ham. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 17, p. 107-113, 2018.
- ZAJKO, S.; KLIMANT, I. The effects of different sterilization procedures on the optical polymer oxygen sensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 177, p. 86–93, 2013.
- ZHAI, X.; LI, Z.; ZHANG, J.; SHI, J.; ZOU, X.; HUANG, X.; ZHANG, D.; SUN, Y.; YANG, Z.; HOLMES, M.; GONG, Y.; POVEY, M. Natural biomaterial-based edible and pH-sensitive films combined with electrochemical writing for intelligent food packaging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 12836-12846, 2018.
- ZHAI, X.; SHI, J.; ZOU, X.; WANG, S.; JIANG, C.; ZHANG, J.; HOLMES, M. Novel colorimetric films based on starch/polyvinyl alcohol incorporated with roselle anthocyanins for fish freshness monitoring. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 308–317, 2017.
- ZHANG, J.; HUANG, X.; ZOU, X.; SHI, J.; ZHAI, X.; LIU, L.; LI, Z.; HOLMES, M.; GONG, Y.; POVEY, M.; XIAO, J. A visual indicator based on curcumin with high stability for monitoring the freshness of freshwater shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. **Journal of Food Engineering**, v. 292, p. 110290, 2021a.

ZHANG, J.; ZOU, X.; ZHAI, X.; HUANG, X.; JIANG, C.; HOLMES, M. Preparation of an intelligent pH film based on biodegradable polymers and roselle anthocyanins for monitoring pork freshness. **Food Chemistry**, v. 272, p. 306–312, 2019.

ZHANG, M.; ZHAO, X.; ZHANG, G.; WEI, G.; SU, Z. Electrospinning design of functional nanostructures for biosensor applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, p. 1699–1711, 2017.

ZHANG, T.; GU, J.; LIU, X.; WEI, D.; ZHOU, H.; XIAO, H.; ZHANG, Z.; YU, H.; CHEN, S. Bactericidal and antifouling electrospun PVA nanofibers modified with a quaternary ammonium salt and zwitterionic sulfopropylbetaine. **Materials Science & Engineering C**, v. 111, p. 110855, 2020.

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

ZHANG, Z.; CHO, S.; DADMOHAMMADI, Y.; LI, Y.; ABBASPOURRAD, A. Improvement of the storage stability of C-phycocyanin in beverages by high-pressure processing. **Food Hydrocolloids**, v. 110, p. 106055, 2021.

ZHANG, Z.; CHO, S.; DADMOHAMMADI, Y.; LI, Y.; ABBASPOURRAD, A. Improvement of the storage stability of C-phycocyanin in beverages by high-pressure processing. **Food Hydrocolloids**, v. 110, p. 106055, 2021b.

ZHAO, L.; DUAN, G.; ZHANG, G.; YANG, H.; HE, S.; JIANG, S. Electrospun functional materials toward food packaging applications: A review. **Nanomaterials**, v. 10, n. 1, p. 150, 2020.

ZHOU, X.; YU, X.; XIE, F.; FAN, Y.; XU, X.; QI, J. XIONG, G.; GAO, X.; ZHANG, F. pH-responsive double-layer indicator films based on konjac glucomannan/camellia oil and carrageenan/anthocyanin/curcumin for monitoring meat freshness. **Food Hydrocolloids**, v. 118, p. 106695, 2021.

ZHU, W.; MASOOD, F.; O'BRIEN, J.; ZHANG, L. G. Highly aligned nanocomposite scaffolds by electrospinning and electrospraying for neural tissue regeneration. **Regenerative Nanomedicine**, v. 11, p. 693–704, 2015.

ANEXOS

ANEXO 1 – Comprovante de depósito de patente.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

EXAME PRELIMINAR

N.º do Pedido: BR102020023135-9 N.º de Depósito PCT:
Data de Depósito: 12/11/2020

O pedido atende formalmente as disposições legais, especialmente quanto ao Art. 19 da LPI e o Instrução Normativa nº 31/2013, estando apto a ser protocolado.

Condições do Pedido	S	N
Requerimento de depósito com os campos obrigatórios preenchidos	X	
Idioma Português	X	
Relatório Descritivo	X	
Reivindicações	X	
PI e C – Apresenta desenhos citados ou não cita nem apresenta desenhos. MU – Apresenta desenhos.	X	
Resumo	X	
Formatado no padrão exigido	X	
Valor correto de Recolhimento	X	

Rio de Janeiro, 15 de janeiro de 2021.

Aline Aimée Cameiro de Oliveira
Mat. Nº 1326227
DIRPA / COSAP/SEFOR