

Sensores de pH baseados em antocianinas para aplicação em embalagens alimentares

Ana Sofia dos Santos Pires

Mestrado em Química

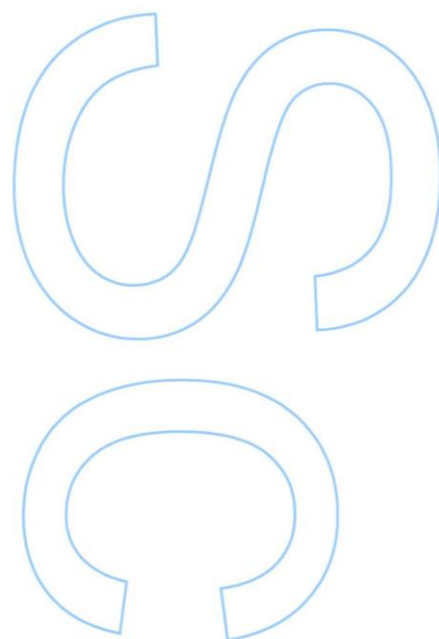
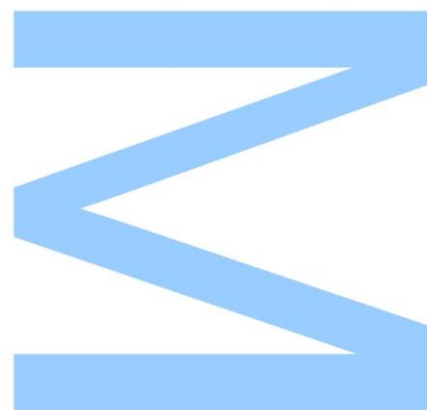
Departamento de Química e Bioquímica
2020

Orientador

Víctor de Freitas, Professor catedrático, Faculdade de Ciências

Coorientador

Luís Cruz, Investigador Pós-Doc, Faculdade de Ciências

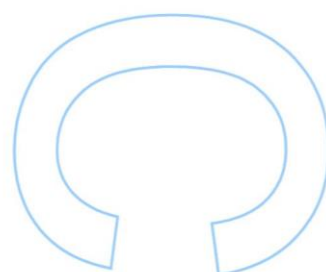
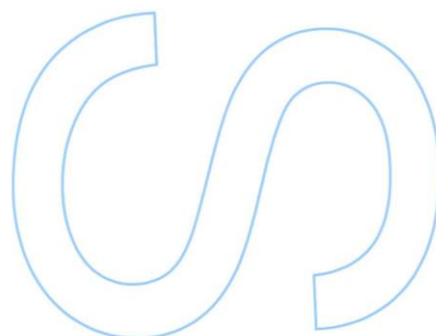
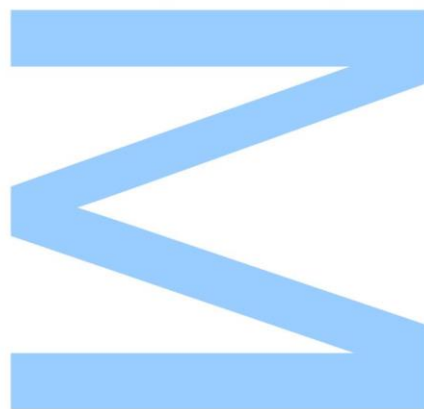




Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer a todos que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para o desenvolvimento deste trabalho:

Ao Doutor Luís Cruz, o meu co-orientador, por toda a atenção, conhecimento, paciência e disponibilidade que tiveram comigo ao longo deste percurso.

Ao Professor Victor de Freitas, orientador deste trabalho, agradeço pela confiança depositada em mim, necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

À Vânia agradeço todo o apoio laboratorial, a ajuda, orientação e paciência ao longo deste ano.

À Doutora Zélia, agradeço pela assistência durante as análises de espetrometria de massa.

À Mariana, agradeço por todas as análises de RMN que realizou, indispensáveis para esta tese.

À Cláudia, agradeço por toda a ajuda e disponibilidade na realização das análises de FTIR e TG-DSC.

À Andreia, minha irmã do coração, agradeço estes 10 anos de uma amizade incrível em que sempre me apoiou e ajudou e este ano não foi exceção.

Ao Sérgio agradeço pela amizade, força e boa disposição sempre presente na minha vida.

À Xana agradeço pela amizade incrível que foi crescendo ao longo de toda a minha vida académica, sempre com as nossas gargalhadas.

À Marta, parceira de bancada, agradeço toda a amizade apoio e força no decorrer deste ano.

À Dina, agradeço o companheirismo e apoio no decorrer deste trabalho.

À Alexandra, agradeço todos os nossos desabafos, conselhos e principalmente gargalhadas que deram força ao longo deste percurso que partilhamos.

À Mónica, agradeço toda a boa disposição contagiante, força e amizade ao longo deste ano.

Ao Telmo, agradeço toda a amizade, apoio e companhia até às tantas da tarde.

Gostaria também, de agradecer a todos os amigos que me acompanharam desde a licenciatura.

Ao meu namorado, por toda a força e confiança que sempre me transmitiu e principalmente toda a paciência e apoio.

E por último, mas não menos importante, agradeço à minha família por todo o carinho e força presentes em toda a minha vida.

Resumo

Atualmente, a qualidade e segurança alimentar são das maiores preocupações dos consumidores. Assim, de modo a responder a esta necessidade, a comunidade científica tem desenvolvido uma nova geração de embalagens com a capacidade de informar o consumidor, em tempo real, do estado físico-químico e microbiológico do produto. Esta informação pode ser obtida através da incorporação de moléculas (sensores) que podem ser ativadas por um estímulo externo, como pH, água ou O₂. Alterações de pH têm-se revelado ser um foco de um número elevado de estudos devido à sua importância na avaliação do grau de deterioração de muitos produtos alimentares. As antocianinas são pigmentos naturais, bastante conhecidos pela sua capacidade de mudar de cor com variações de pH, tendo-se tornado por isso muito estudadas para aplicações em (bio)sensores.

Este trabalho teve como objetivo, numa primeira fase, a síntese e caracterização de novos pigmentos derivados das antocianinas, nomeadamente, pirano-3,7-desoxiantocianinas. Estes pigmentos apresentam modificações estruturais que lhes confere maior estabilidade e os torna mais promissores como sensores de pH comparativamente às antocianinas. Estes pigmentos foram caracterizados por HPLC, LC-DAD/ESI-MS e RMN (1D e 2D) e estudados relativamente aos seus equilíbrios químicos através de espectroscopia de UV-Vis.

A segunda fase teve como objetivo o desenvolvimento de filmes para a imobilização dos pigmentos sintetizados pela técnica de *Layer-by-Layer* (LbL), com sistemas de polímeros naturais e sintéticos. Inicialmente foram estudadas as melhores condições para a obtenção do substrato composto por um filme de acetato de celulose, que serviu de suporte sólido para a técnica de LbL. A funcionalização deste substrato foi otimizada recorrendo a soluções de KOH e confirmada por FTIR. Os tempos das deposições e número de ciclos do LbL foram estudados, inicialmente, apenas com os sistemas de polímeros naturais (CHT e ALG) e sintéticos (PAH e PSS). Este estudo e caracterização foi feito por técnicas de análise térmica (TG-DSC), microscopia de varrimento eletrónico acoplada a análise elementar (SEM-EDS) e por *swelling*. Esta caracterização apresentou evidências de que a deposição de polieletrólitos foi alcançada com sucesso. Posteriormente, um dos pigmentos sintetizados foi imobilizado nos filmes por LbL segundo diferentes procedimentos e analisado através de uma sonda de refletância.

O estudo da síntese dos diversos pigmentos foi elaborado com sucesso assim como a imobilização do pigmento, no entanto a técnica utilizada resultou numa baixa eficiência, uma vez que a cor dos filmes produzidos foi pouco intensa.

Palavras chave: pirano-3,7-desoxiantocianinas, antocianinas, pigmentos, equilíbrios químicos, sensor pH, *Layer-by-Layer*, filmes poliméricos, embalagens inteligentes

Abstract

Nowadays, food safety and quality are the main concern of consumers. Therefore, in response to this demand, the scientific community has developed a new generation of packaging that can inform customers of the physical, chemical, and microbiological status of the product in real-time. This information can be obtained by incorporating molecules (sensors) that can be triggered by external stimuli such as pH, water, or O₂. Since pH change is very important for evaluating the deterioration of many foods, pH changes have become the focus of many studies. Anthocyanins are natural pigments and well known for their ability to color changing with the pH, becoming widely studied in (bio)sensing applications.

The first stage of this work aims to synthesize and characterize new pigments derived from anthocyanins, namely pyrano-3,7-deoxyanthocyanins. These pigments have structural changes that make them more stable than anthocyanins and make them more promising as pH sensors. These pigments were characterized by HPLC, LC/ESI-MS, and NMR (1D and 2D), and their chemical equilibrium was studied by UV-Vis spectroscopy.

The second phase aims to develop biofilms for fixing pigments synthesized by Layer-by-Layer (LbL) technology using natural and synthetic polymer systems. Initially, the optimal conditions for obtaining a substrate composed of cellulose acetate film were studied, which were crucial to set the conditions for the assembly technique. The substrate functionalization was optimized by using KOH solution and confirmed by FTIR. Initially, only natural (CHT and ALG) and synthetic (PAH and PSS) polymer systems were used to study the deposition time and number of cycles of LbL. This research and characterization were done by thermal analysis technique (TG-DSC), scanning electronic microscopy coupled to energy dispersive spectroscopy (SEM-EDS) and swelling. This characterization shows evidence of successful polyelectrolyte deposition. Subsequently, according to different methods, a pigment synthesized within the scope of the project was fixed with LbL and analyzed using reflection probes.

The study of the synthesis of the various pigments was successfully developed as well as the immobilization of the pigment, however the LbL technique had low efficiency, since the color of the acquired films was not very intense.

Key words: Pyrano-3-deoxyanthocyanins, anthocyanin, dyes, chemical equilibria, pH sensor, layer-by-layer, polymeric films, intelligent packaging

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract	V
Índice	VII
Índice de figuras	XI
Índice de tabelas.....	XIV
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	XV
I. Introdução.....	1
1. Polifenóis	2
1.1 Flavonóides	3
1.2 Antocianinas	4
1.2.1 Estabilidade das antocianinas	6
1.2.2 Estudo dos equilíbrios das espécies antociânicas	8
1.2.3 Outros fatores que influenciam a estabilidade	9
1.2.4 Reatividade das antocianinas	10
1.3 Piranoantocianinas	11
2. Embalagens Alimentares	13
2.1 Embalagens alimentares ativas e inteligentes	13
2.1.1 Embalagens inteligentes: pH como estímulo sensorial	14
2.2 Construção de filmes	14
2.2.1 Celulose	15
2.2.2 Layer-by-Layer (LbL)	15
2.2.3 Polieletrólitos	16
2.2.3.1 Quitosano	16
2.2.3.2 Alginato.....	17
2.2.3.3 Hidroclorato de polialilamina (PAH)	18
2.2.3.4 Poli(estirenosulfonato) (PSS).....	19

3. Objetivos.....	20
Parte A – Síntese e Caraterização de Pigmentos Derivados de Antocianinas	21
4. Material e Métodos	22
4.1 Reagentes	22
4.2 Técnicas cromatográficas e de identificação estrutural.....	22
4.2.1 Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC-DAD)	22
4.2.2 Cromatografia líquida em coluna de vidro (CC) (flash)	23
4.2.3 Espectrometria de massa, LC-DAD/ESI-MS.....	24
4.2.4 Ressonância Magnética Nuclear, RMN	24
4.2.5 Espectroscopia UV-Vis	24
4.2.6 Medições de pH.....	24
4.3 Síntese de pigmentos	25
4.3.1 Síntese de 4',5-dihidroxiavilíio (3)	25
4.3.2 Síntese do 2,10-bis-(4',4''-hidroxifenil) piranobenzopirílio (4)	25
4.3.2.1 Método 1:.....	25
4.3.2.2 Método 2:.....	26
4.3.2.3 Método 3:.....	26
4.3.2.4 Purificação e isolamento do pigmento 4.....	27
4.3.3 Síntese da 10-carboxipirano-4'-hidroxiflavílio (7)	27
4.3.4 Síntese da 10-(4''-aminofenil)pirano-4'-hidroxiflavílio (9)	28
4.4 Determinação da constante de acidez, pK_a	29
5. Resultados e Discussão	32
5.1 Síntese	32
5.2 Síntese de 4',5-dihidroxiavilíio (3)	32
5.3 Síntese de piranoflavílios.....	33
5.3.1 Síntese do 2,10-bis-(4',4''-hidroxifenil) piranobenzopirílio (4).....	33
5.3.2 Purificação e isolamento do pigmento	35
5.3.2.1 Caraterização estrutural.....	37
5.3.3 Síntese de 10-carboxipirano-4'-hidroxiflavílio (7)	38

5.3.3.1	Caraterização estrutural.....	39
5.3.4	Síntese do 10-(4-aminofenil)pirano-4'-hidroxiflavílio (9).....	39
5.3.4.1	Caraterização estrutural.....	41
5.4	Determinação da constante de acidez, pK_a	42
5.4.1	2,10-bis-(4',4''-hidroxifenil)piranobenzopirílio (4).....	42
5.4.2	10-carboxipirano-4'-hidroxiflavílio (7)	43
5.4.3	10-(4''-aminofenil)pirano-4'-hidroxiflavílio (9)	44
Parte B – Estudo da Imobilização de Pigmentos em Filmes de Acetato de Celulose		47
6.	Material e Métodos	48
6.1	Materiais.....	48
6.2	Preparação do substrato	48
6.3	Funcionalização dos filmes.....	48
6.4	Layer-by-layer (LbL)	48
6.5	FTIR	49
6.6	TG-DSC.....	49
6.7	Swelling	49
6.8	Potencial zeta.....	49
6.9	Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM) / EDS	50
6.10	Sonda de Refletância.....	50
7.	Resultados e Discussão	51
7.1	Substrato	51
7.2	Funcionalização dos filmes.....	52
7.3	Layer-by-layer (LbL)	55
7.4	TG-DSC.....	57
7.4.1	Filmes CHT / ALG	58
7.4.2	Filmes PAH/PSS	60
7.5	Swelling	61
7.6	Potencial zeta.....	63
7.7	SEM-EDS.....	64

7.8	LbL com imobilização de pigmento	67
8.	Conclusões	73
9.	Perspetivas Futuras	75
10.	Referências Bibliográficas	76

Índice de figuras

Figura 1: Estrutura base dos compostos flavonóides (2-fenilbenzopirano).....	3
Figura 2: Classes de flavonoides e suas estruturas.	4
Figura 3: Exemplo de uma reação de glicosilação.	5
Figura 4: Diferenças na estrutura química das antocianinas mais abundantes na natureza e seu $\lambda_{\text{máx}}$	6
Figura 5: Espécies em equilíbrio das antocianinas em meio aquoso e suas respectivas reações.....	7
Figura 6: Diagrama dos níveis de energia e passos cinéticos da malvidina-3-glucósido.	9
Figura 7: Reatividade geral das antocianinas.	10
Figura 8: Reatividade da forma de catião flavílio das antocianinas: reação de hidratação e de adição do bissulfito.	11
Figura 9: Estrutura base das piranoantocianinas.	12
Figura 10: Espécies em equilíbrio das piranoantocianinas em meio aquoso e suas respectivas equações.	12
Figura 11: Estrutura química da celulose.	15
Figura 12: Estrutura química do quitosano.....	17
Figura 13: Estrutura química do alginato.....	18
Figura 14: Estrutura química do PAH.....	18
Figura 15: Estrutura química do PSS.....	19
Figura 16: Reação de síntese de 4', 5-dihidroxiavílio.....	25
Figura 17: Reação de síntese do 2,10-bis-(4',4''-hidroxifenil) piranobenzopirílio, pelo método 1.....	26
Figura 18: Reação de síntese do 2,10-bis-(4',4''-hidroxifenil)piranobenzopirílio, pelo método 2.....	26
Figura 19: Reação de síntese do 2,10-bis-(4',4''-hidroxifenil)piranobenzopirílio, pelo método 3.....	27
Figura 20: Reação de síntese de cloreto de 10-carboxipirano-4'-hidroxiflavílio.	28
Figura 21: Reação de síntese 10-(4-aminofenil)pirano-4'-hidroxiflavílio.	28
Figura 22: Mecanismo da reação da condensação aldólica catalisada por ácido sugerido para a síntese do pigmento 4',5-dihidroxiavílio.	32
Figura 23: Cromatograma de HPLC-DAD do precipitado obtido do pigmento 4', 5-dihidroxiavílio.	33
Figura 24: Mecanismo geral para a formação de piranoflavílios.	33

Figura 25: Cromatogramas de HPLC-DAD da reação de síntese 2,10-bis-(4',4'-hidroxifenil) piranobenzopirílio, pelo método1, após 2 horas (A) e após 50 horas (B).	34
Figura 26: Cromatogramas de HPLC-DAD da reação de síntese de cloreto de 2,10-bis-(4',4''-hidroxifenil) piranobenzopirílio, pelo método 2, após 2 horas (A), após 22 horas (B;1), após 46 horas (B; 2) e após 60 horas (B; 3).	34
Figura 27: Cromatograma de HPLC-DAD da reação de síntese do 2,10-bis-(4', 4'-hidroxifenil) piranobenzopirílio, pelo método 3, após 2 horas.	35
Figura 28: Isolamento do pigmento 2,10-bis-(4',4''-hidroxifenil)piranobenzopirílio por cromatografia flash com sílica de fase reversa C18.	36
Figura 29: Estrutura química do pigmento 2,10-bis-(4',4''-hidroxifenil)piranobenzopirílio.....	37
Figura 30: Espectro ^1H do 2,10-bis-(4', 4'-hidroxifenil) piranobenzopirílio.....	37
Figura 31: Cromatograma de HPLC-DAD da reação de síntese da 10-carboxipirano-4'-hidroxiflavílio após 2 horas (A) e após 14 horas (B).	38
Figura 32: Isolamento do pigmento 10-carboxipirano-4'-hidroxiflavílio por cromatografia flash com sílica de fase reversa C18.	38
Figura 33: Estrutura química da 10-carboxipirano-4'-hidroxiflavílio.	39
Figura 34: Espectro de protão da 10-carboxipirano-4'-hidroxiflavílio.	39
Figura 35: Cromatograma de HPLC-DAD da reação de síntese do10-(4-aminobenzeno)pirano-4'-hidroxiflavílio após 2 horas (A) e após 23 horas (B).	40
Figura 36: Isolamento do pigmento 10-(4-aminobenzeno)pirano-4'-hidroxiflavílio (9) por cromatografia flash com sílica de fase reversa C18.	40
Figura 37: Estrutura química do 10-(4-aminofenil)pirano-4'-hidroxiflavílio.	41
Figura 38: Espectro de protão do 10-(4-aminofenil)pirano-4'-hidroxiflavílio.....	41
Figura 39: Variações espectroscópicas em função do pH do pigmento 2,10-bis-(4', 4'-hidroxifenil)piranobenzopirílio no intervalo de $1 < \text{pH} < 6,85$ (A), $6,85 < \text{pH} < 12$ (B), ajuste alcançado para $\text{pK}_{\text{a}1} = 6,5 \pm 0,1$ e $\text{pK}_{\text{a}2} = 8,9 \pm 0,1$ (C) e equilíbrios químicos do pigmento em água/etanol (75:25) (v/v).	43
Figura 40: Variações espectroscópicas em função do pH do (A), ajuste alcançado para $\text{pK}_{\text{a}1} = 0,86 \pm 0,2$ e $\text{pK}_{\text{a}2} = 6,20 \pm 0,2$ (B) e equilíbrios químicos do pigmento em água/etanol (75:25) (v/v) (C).	44
Figura 41: Variações espectroscópicas em função do pH do (A), ajuste alcançado para $\text{pK}_{\text{a}1} < 1$ e $\text{pK}_{\text{a}2} = 7,24 \pm 0,06$ (B) e equilíbrios químicos do pigmento em água/etanol (75:25) (v/v) (C).	45
Figura 42: A) Espetro de FTIR do substrato acetato de celulose (9% 2g) após funcionalização com uma solução de 0,1M KOH; B) imagens do substrato após funcionalização com B1) 0,1M KOH 2h, B2) 0,1M KOH 3h e B3) 0,1M KOH 3,5h.	53

Figura 43: A) Espectro de FTIR do substrato (9% 2g) após funcionalização com uma solução de 0,2M KOH; B) imagens do substrato após funcionalização com B ₁) 0,2M KOH 30 min, B ₂) 0,2M KOH 1h, B ₃) 0,2M KOH 2h e B ₄) 0,2M KOH 3h.....	54
Figura 44: A) Espectro de FTIR do substrato(9% 2g) após funcionalização com uma solução de 0,5M KOH; B) imagens dos filmes após funcionalização com B ₁) 0,5M KOH 30 min, B ₂) 0,5M KOH 1h e B ₃) 0,5M KOH 2h.	55
Figura 45: Esquema do procedimento experimental de LbL.	56
Figura 46: Espectro de FTIR dos filmes após LbL e dos polímeros utilizados.	56
Figura 47: Curva TG-DSC do Quitosano, Alginato e Acetato de Celulose.	58
Figura 48: Gráficos de TG-DSC para acetato de celulose e filmes com tempos de deposição de 20 min e 1 hora.	59
Figura 49: Gráficos TG-DSC dos filmes funcionalizados com PAH e PSS.....	60
Figura 50: Gráficos de TG-DSC de filmes funcionalizados com PAH com diferentes tempos de funcionalização.....	61
Figura 51: Resultados dos ensaios de <i>swelling</i>	63
Figura 52: Valores de potencial zeta das soluções de alginato após funcionalização dos filmes.	64
Figura 53: Imagens de SEM e correspondentes análises de EDS, de um filme funcionalizado e após deposição de 1 hora (5 ciclos) em CHT/ALG.	66
Figura 54: Imagens de SEM e correspondentes análises de EDS, de um filme após deposição de 1 hora (5 ciclos) em PAH/PSS, em diferentes zonas.	67
Figura 55: Procedimento experimental para funcionalização dos filmes.	68
Figura 56: Aspeto dos filmes após funcionalização com pigmento	69
Figura 57: Estrutura do pigmento 4 e cor das soluções com variação de pH.	69
Figura 58: Procedimento experimental para a funcionalização dos filmes com pigmento.....	70
Figura 59: Aspeto dos filmes após deposição de pigmento e serem mergulhados numa solução de 0,1 M HCl.	70
Figura 60: Aspeto dos filmes após funcionalização com pigmento.	71
Figura 61: Espectro de absorvância, obtido pela sonda de refletência, após 7 deposições de pigmento, utilizando polímeros naturais (A) e sintéticos (B).	71

Índice de tabelas

Tabela 1: Concentração de antocianinas de diversas de fontes alimentares.....	5
Tabela 2: Reagentes e marcas correspondentes.	22
Tabela 3: Gradiente utilizado para análise de HPLC-DAD.	23
Tabela 4: Valores de p _{ka} obtidos para os pigmentos 4, 7 e 9.	45
Tabela 5: Reagentes e marcas correspondentes.	48
Tabela 6: Valores potencial zeta das soluções de polímero após funcionalização dos filmes.	64

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Abs - Absorvância

AC – Acetato de celulose

ALG – Alginato

CHT - Quitosano

COSY - Correlation Spectroscopy

DMSO - Dimetilsufóxido

EDS – Espectroscopia de raios X por dispersão em energia

ESI-MS - Eltrospray Ionization–Mass Spectrometry

FTIR - Espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier

HMBC - Heteronuclear Multiple Bond Connectivity

HPLC-DAD – High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector

HSQC - Heteronuclear Single Quantum Connectivity

J - Constante de acoplamento

LbL – Layer-by-Layer

LC-MS - Liquid Chromatography – Mass Spectrometry Detector

λ_{max} - Comprimento de onda de absorção máxima

m/z - Relação massa/carga (espectrometria de massa)

PAH – Hidrocloro de polialilamina

PSS - Poli(estirenosulfonato)

RMN - Espectroscopia por ressonância magnética nuclear

SEM – Microscopia eletrônica de varrimento

TFA – Ácido trifluoroacético

TG-DSC – Termogravimetria / Calorimetria diferencial de varrimento

TMS - Tetrametilsilano

UV-Vis - Ultravioleta-visível

δ - Desvio químico em relação ao tetrametilsilano (em ppm)

ζ – Potencial zeta

I. Introdução

1. Polifenóis

Os polifenóis são um grupo numeroso e heterogéneo de fitoquímicos diversos e bioativos, amplamente encontrados no reino vegetal. Estes compostos integram o grupo de metabolitos secundários das plantas, tendo uma distribuição taxonómica muito mais limitada. Nas plantas, estes compostos desempenham funções na defesa contra a radiação ultravioleta e também no combate contra agressão de agentes patogénicos[1].

Durante as últimas décadas, os polifenóis foram alvo de diversos estudos principalmente no que diz respeito aos seus benefícios para a saúde humana. Vários estudos levam a crer que o consumo de alimentos ricos em polifenóis está relacionado com a prevenção de diversas doenças, desempenhando funções como a regulação ou inibição de vias de sinalização celular, redução na agregação de plaquetas, de colesterol, regulação da pressão sanguínea, do metabolismo hormonal. Estes compostos bioativos são bastante conhecidos também pela sua característica de serem antioxidantes muito importante na defesa contra o stress oxidativo provocado pelo excesso de espécies reativas de oxigénio. De um modo generalista, os compostos fenólicos desempenham uma função importante na prevenção de diversas patologias, nomeadamente cancro[2], doenças cardiovasculares[3], diabetes[4], obesidade[5], doenças infecciosas e neurodegenerativas[6, 7].

Os compostos fenólicos são quimicamente caracterizados pelo seu monómero, o anel fenólico, com a possibilidade de conter diversos subgrupos de compostos fenólicos, razão essa pela qual é um grupo bastante diversificado. Podem ser divididos, baseados na sua estrutura química, em duas classes: flavonoides e não flavonoides[8].

A indústria farmacêutica tem revelado bastante interesse na potencialidade de utilização dos polifenóis como agentes terapêuticos devidos aos seus benefícios já mencionados. Para além dos efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes largamente conhecidos, estas moléculas possuem igualmente propriedades de transdução de sinal por meio da interação com os recetores ou enzimas. Um exemplo é o resveratrol, encontrado maioritariamente nas sementes das uvas, demonstrou a capacidade de modular a via de sinalização do Akt/GSK3 β , na região do hipocampo do cérebro de ratos. Desta forma conseguiria regular a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias e fatores apoptóticos, demonstrando um efeito na prevenção de comportamentos depressivos induzidos por stress crónico[9]. O resveratrol pode também modular vias de sinalização que podem ser uteis na promoção da cicatrização de feridas diabéticas através da ativação do mecanismo de angiogénese (crescimento de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes)[10].

Vários estudos realizados afirmam que uma alimentação saudável, nomeadamente a ingestão de polifenóis, é um fator importante no combate de diversas doenças crónicas. Para alcançar essa alimentação saudável é crucial a ingestão de alimentos ricos em polifenóis. Alimentos como frutas, especialmente maçãs, peras e uvas e vegetais como tomate, cebola, cenoura contêm entre 200 a 300 mg de compostos fenólicos por 100 g de alimento, podendo ser usados como suplementos alimentares[11].

1.1 Flavonóides

Os flavonóides são a maior classe de compostos fenólicos presentes em frutas e vegetais, uma vez que desempenham um papel importante na cor e no sabor, na síntese de enzimas e vitaminas e na minimização dos efeitos da peroxidação lipídica[12]. No entanto, o seu teor nas matrizes vegetais é dependente de vários fatores como a variedade genética das espécies, condições de crescimento, grau de maturação e a parte da planta em questão[13].

A estrutura base dos flavonoides é do tipo C6-C3-C6 (2-fenilbenzopirano) em que as duas unidades C6 (anel aromático A e B) ligados a um anel pirânico (C) como representado na figura 1.

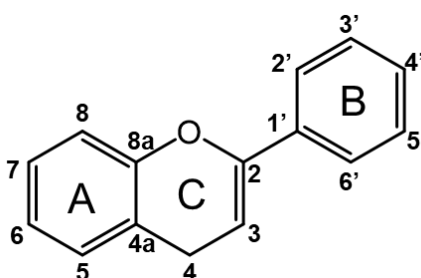


Figura 1: Estrutura base dos compostos flavonóides (2-fenilbenzopirano).

Em consequência de diferentes padrões de hidroxilação e metilação dos anéis A e B é possível classificar os flavonóides em seis diferentes grupos: flavonas, as flavanonas, os flavonóis, os flavononóis, os flavan-3-óis e as antocianidinas, figura 2[14]. Apesar de, na maioria dos flavonoides o anel B estar ligado à posição C2 do anel C, nas isoflavonas e neoflavonóides, o anel B está conectado à posição C3 e C4 do anel C, respetivamente. Ainda existe mais um grupo de flavonoides, as chalconas, que, embora não apresentem o anel C, ainda são categorizadas como flavonoides[15].

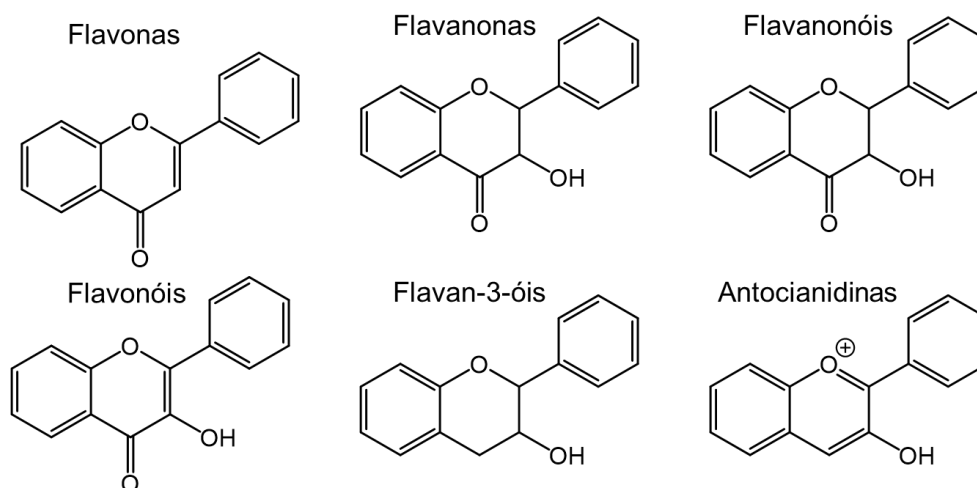


Figura 2: Classes de flavonoides e suas estruturas.

A estrutura base dos flavonóides apresenta-se sob a forma de agliconas, no entanto, estão presentes nas plantas maioritariamente na forma glicosilada. As diferenças estruturais e de padrão de glicosilação são fatores importantes no desempenho da atividade biológica e antioxidante destes compostos[16].

O consumo a longo prazo de alimentos ricos em flavonóides revela diversos efeitos benéficos para a saúde nomeadamente a indivíduos com fatores de risco de uma morte precoce[17]. Em estudos recentes, a ingestão de flavonóides é referida com um elevado poder de melhoria em comportamentos cognitivos, diminuição de neuroinflamação e atenuação do stress oxidativo e desta forma revelando uma atenuação de sintomas associados ao Alzheimer[18].

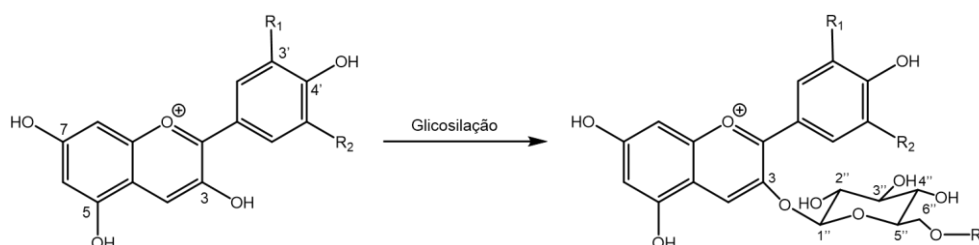
1.2 Antocianinas

As antocianinas (do grego *antho*, que significa flor, e *kianos*, significando azul), pertencentes à classe dos flavonóides, são pigmentos solúveis em água, presentes principalmente em frutas e flores, mas também em órgãos de alguns vegetais[19]. A presença destes compostos em diversos alimentos tem um forte impacto nas propriedades sensoriais dos mesmos, pois são responsáveis pelas cores desde o vermelho ao azul, características de frutas e vegetais. Nas plantas, desempenham um papel fundamental na polinização e na capacidade de absorver a luz de modo a proteger as plantas de danos induzidos pelos raios UV. Estes compostos apresentam diferentes cores e intensidades, como mencionado anteriormente, dependendo da sua concentração e também da absorbância de luz complementar da clorofila, sendo esta combinação a responsável por algumas cores especialmente de frutas, flores e alguns vegetais como referido na tabela 1[16, 20]. A capacidade de “camuflar” o típico pigmento verde pode funcionar como um mecanismo de defesa de algumas plantas de perdedores herbívoros[21, 22].

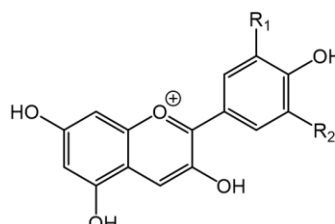
Tabela 1: Concentração de antocianinas de diversas de fontes alimentares.

Origem	Concentração de antocianinas (mg/100 g)
Mirtilo	300 - 698
Rabanete	100 – 154
Romã (sumo)	600 – 765
Framboesas	20 – 687
Amoras	82,5 – 325,9
Ruibarbo	4 – 200
Uvas vermelhas	30 – 750

Estruturalmente, as antocianinas são derivadas do catião flavílio (2-fenilbenzopirílio) hidroxilado em diferentes posições (geralmente em carbonos C3, C5, C6, C7 e C3', C4', C5') para dar origem a diferentes antocianidinas. A glicosilação de antocianidinas para formar as respectivas antocianinas, figura 3, pode ocorrer em diferentes posições que contenham o grupo hidroxilo sendo a posição 3-OH o local de glicosilação mais abundante na natureza[20].

**Figura 3:** Exemplo de uma reação de glicosilação.

Existem aproximadamente 30 antocianidinas diferentes, identificadas na natureza, nas quais podem ocorrer glicosilações. Podem ainda sofrer reações de hidroxilação e metoxilação em diferentes graus e posições nos seus anéis. Mais de 700 antocianinas, de fontes naturais, foram caracterizadas estruturalmente[23]. Apesar deste elevado número de antocianinas, apenas seis são comumente encontrados na natureza, representados na figura 4. As antocianidinas (agliconas) mais comuns e mais importantes para a nutrição humana são a cianidina, delphinidina, pelargonidina, peonidina, petunidina e malvidina, cujas estruturas podem variar em substituição nas posições 3' e 5'[16].



	R ₁	R ₂	Cor*	λ _{max} (nm)
Cianidina	OH	H	Rosa	535
Peonidina	OCH ₃	H	Rosa	532
Pelargonina	H	H	Vermelho	520
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	Roxo	542
Delfinidina	OH	OH	Roxo	546
Petunidina	OCH ₃	OH	Roxo	543

*Observável em meio aquoso com 0,01% HCl

Figura 4: Diferenças na estrutura química das antocianinas mais abundantes na natureza e seu λ_{máx}.

O número e a posição de açúcares ligados (glicosilação) bem como a possibilidade de ocorrer reações de acilação por ácidos aromáticos, como o ácido cafeico, ferúlico, gálico, ou por ácidos alifáticos como o ácido malónico, acético, málico, leva à multiplicidade de antocianinas hoje conhecida[24]. Todas estas variáveis influenciam as propriedades físico-químicas destes compostos, nomeadamente o tamanho da molécula, a sua polaridade, reatividade e estabilidade. Do ponto de vista estrutura-atividade, as reações de glicosilação conferem uma maior estabilização e aumento da solubilidade das antocianinas, comparativamente à sua forma aglicona. Por outro lado, a acilação dos resíduos glicosilados causa uma diminuição de polaridade, por consequência diminuindo a solubilidade destes compostos em meios aquosos.

As antocianinas são bastante utilizadas como corantes alimentares apesar das suas limitações relativamente à estabilização de cor ser bastante influenciada por fatores externos como a luz a temperatura e o pH. Além do uso como corantes alimentares, estes compostos são potencialmente úteis como ingredientes nutricionais e terapêuticos, pois fornecem inúmeros benefícios na saúde. Diversos estudos demonstraram o potencial biológico e farmacológico destes compostos, nomeadamente na capacidade de diminuir o stress oxidativo, funções antimicrobianas, neutralizar o aparecimento e progressão de inúmeras doenças não transmissíveis, como doenças neurodegenerativas[6, 25], cardiovasculares[3], diabetes[4] e cancro[2]. Nenhum efeito nefasto, dos derivados de antocianinas, foi relatado mesmo após a ingestão de elevadas doses o que revela que o uso destes compostos na prevenção ou tratamento de várias doenças é uma boa possibilidade[26].

1.2.1 Estabilidade das antocianinas

A estabilidade das antocianinas é determinada maioritariamente pela sua estrutura química, mas também depende da combinação de diversos fatores como a temperatura, a luz, o pH, presença de outros compostos fenólicos, iões metálicos, oxigénio, copigmentos,

entre outros. Estes compostos fenólicos são bastante instáveis em matrizes alimentares sendo muito suscetíveis à degradação.

As antocianinas existem sob várias formas em equilíbrio, dependendo do pH da solução, devido à sua estrutura molecular ser de natureza iónica. Em condições ácidas, $\text{pH} \leq 1$, a espécie predominante é o catião flavílio (AH^+) responsável pelo aparecimento de uma cor vermelho-púrpura em solução. Esta espécie permite que a antocianina seja altamente solúvel em água[27]. Em condições crescentes de pH, ocorre a rápida desprotonação do catião flavílio (AH^+) originando a base quinoidal neutra (A) de cor violeta, e simultaneamente, ocorre a reação de hidratação do catião flavílio, mais lentamente, dando origem à forma hemicetal (B). Por sua vez, a base hemicetal está envolvida numa tautomerização ceto-enólica, transformando-se parcialmente em *cis*-chalcona (Cc) de cor amarela, que pode ainda sofrer a isomerização da espécie Cc, dando origem à *trans*-chalcona (Ct), sendo que a sua formação ocorre muito lentamente e em pequenas quantidades. Posteriormente, a valores de pH mais elevados, $\text{pH} > 7$, a base quinoidal neutra pode dar origem à base aniónica (A^-) de cor azul[28]. Estes equilíbrios estão representados na figura 5.

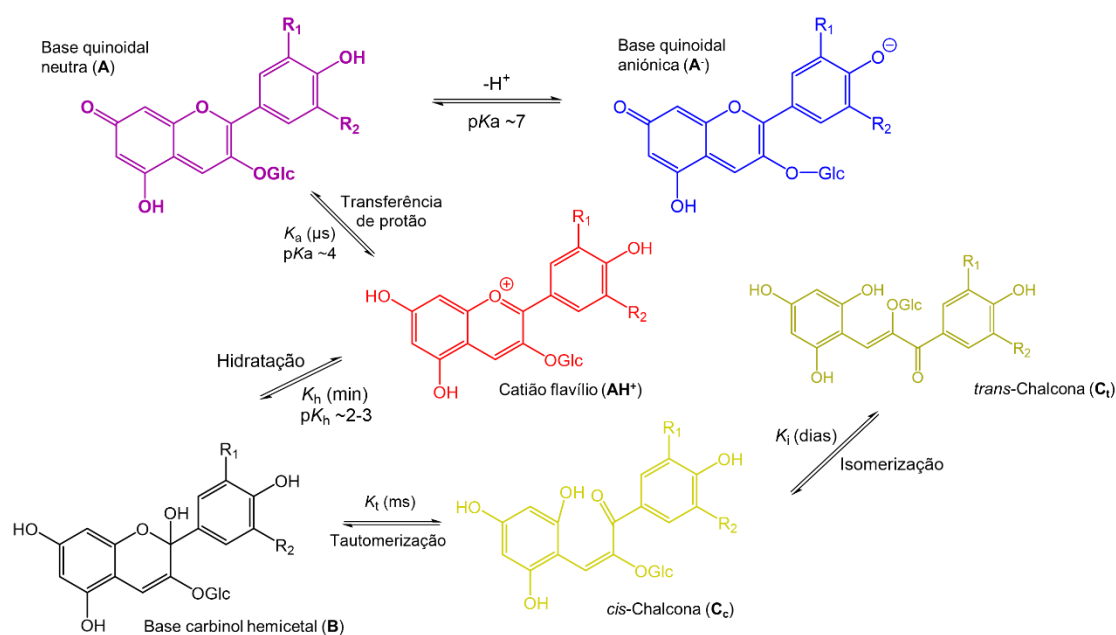
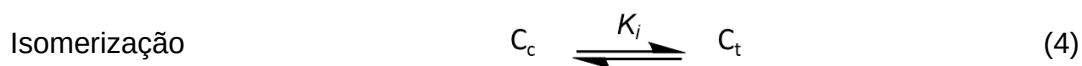
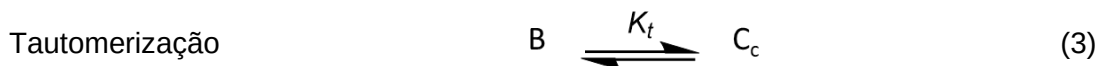
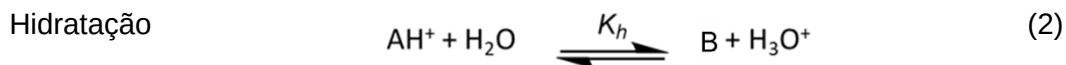
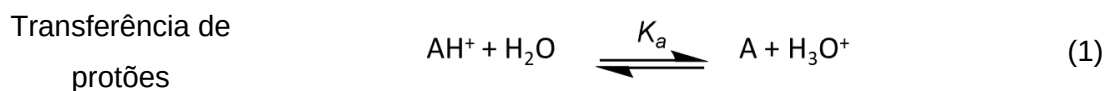


Figura 5: Espécies em equilíbrio das antocianinas em meio aquoso e suas respectivas reações.



1.2.2 Estudo dos equilíbrios das espécies antociânicas

O estudo dos equilíbrios químicos das antocianinas por aumento de pH é uma forma simples e eficaz de obter as constantes termodinâmicas e cinéticas considerando uma reação global ácido-base. Esta metodologia é definida pela adição de uma solução básica a uma solução de antocianina, $\text{pH} \leq 1$, em que apenas temos a presença do catião flavílio. Esta adição tem como objetivo a perturbação do equilíbrio da espécie em solução permitindo a observação dos processos até ser atingido um novo equilíbrio. No decorrer das adições de base à solução é possível detetar a transferência de prótons originando a base quinoidal neutra (escala dos microssegundos), em competição com a formação da espécie hemiacetal que rapidamente dá origem à cis-chalcona. Neste momento o sistema encontra-se em pseudo-equilíbrio (K_a^*), pois a formação da trans-chalcona ocorre muito lentamente (equação 5).



onde $[\text{CB}] = [\text{A}] + [\text{B}] + [\text{C}_c]$

Após a reação de isomerização o sistema é considerado em equilíbrio sendo possível determinar a constante acídica aparente, K_a' , definida pela equação 6[29]:



onde $[\text{CB}] = [\text{A}] + [\text{B}] + [\text{C}_c] + [\text{C}_t]$

Um exemplo de um diagrama de níveis energéticos está esquematizado na figura 6, em que mostra que a forma hemiacetal (incolor) da malvidina-3-glucósido é a espécie termodinamicamente mais estável a partir de pH 2,5.

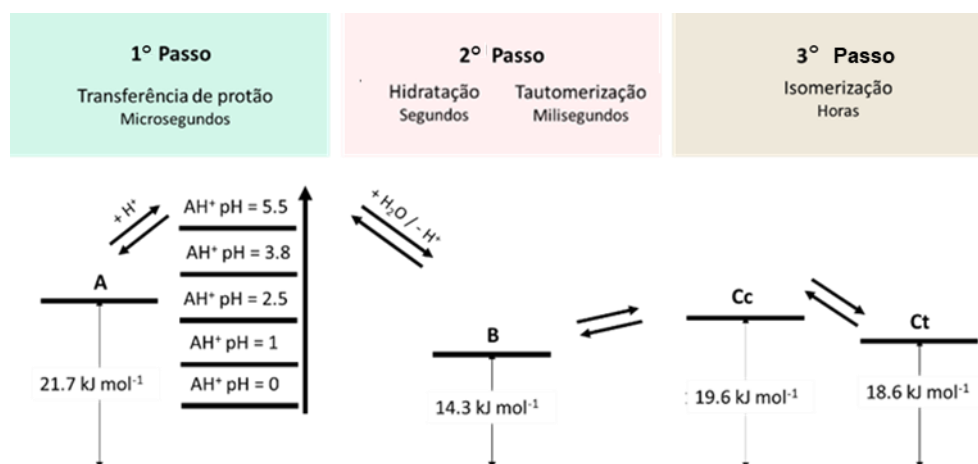


Figura 6: Diagrama dos níveis de energia e passos cinéticos da malvidina-3-glucósido.

A maioria das antocianinas têm uma elevada estabilidade em condições ácidas, como por exemplo a cianidina e a delphinidina, sendo que a sua degradação acontece de uma forma geral a pH mais elevado[30]. No entanto existem exceções como é o caso da petanina, uma antocianina acilada resistente à degradação até pH 8[28]. A acilação da antocianina tem como consequência o aumento do valor de pK'_a e por conseguinte a fração molar é superior em valores de pH mais elevados.

1.2.3 Outros fatores que influenciam a estabilidade

A estabilidade das antocianinas é bastante influenciada por fatores externos para além do pH, como é o caso da luz, do oxigénio e da temperatura e também por fatores estruturais[19]. O oxigénio é um fator importante devido a possíveis reações de oxidação destes pigmentos, dando origem a produtos incolores ou acastanhados. O aumento da temperatura revela uma diminuição da estabilidade das antocianinas explicado pela deslocalização do equilíbrio destes pigmentos para a forma de hemicetal, devido ao aumento das reações de hidratação. Por outro lado, a degradação fotoquímica também é relevante sendo os produtos de degradação iguais aos da degradação térmica, mas obtidos por diferentes vias[31].

Na natureza observamos diferentes matrizes em que estes compostos estão presentes, com diferentes cores que não seriam possíveis de obter apenas com a influência do pH[32]. Estes pigmentos têm a capacidade de estabilizar a sua cor, em condições básicas, através de diferentes mecanismos como a complexação com metais, auto-associação[33], copigmentação intermolecular ou de copigmentação intramolecular[34] e acilação[35]. A acilação é o método de estabilização mais comum, sendo que a adição de um grupo acilado fornece à antocianina a proteção de ataques nucleofílicos provocados pela água, resultando numa maior estabilidade. Para além da

melhoria na estabilidade também ocorre um deslocamento batocrômico do $\lambda_{\max}$ de vermelho-laranja para violeta, sendo esta uma possível explicação para a coloração de muitas flores e frutos. A presença de grupos acilo intensifica a auto-associação das antocianinas, fornecendo ainda maior estabilidade à molécula, no entanto, depende do tipo de dador acilo e do local a que se encontra ligado[33].

1.2.4 Reatividade das antocianinas

Os compostos polifenólicos, particularmente as antocianinas, são compostos instáveis e muito reativos nas suas diversas espécies, figura 7. A diferença da reatividade dos três anéis (A, B e C) é um fator importante no que diz respeito a potenciais reações e consecutivamente produtos formados em matrizes complexas como é o caso do vinho.

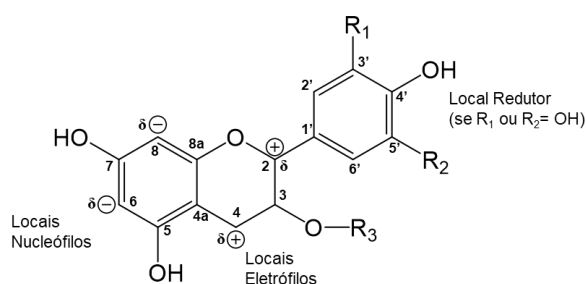


Figura 7: Reatividade geral das antocianinas.

Quando as antocianinas estão sob a forma de catião flavílio, forma iónica, o anel C possui carga positiva, deslocalizada sobretudo nos carbonos C2 e C4, sendo considerado um eletrófilo. Por esta razão é bastante suscetível a ataques nucleofílicos pela água e pelo bissulfito[36], dando origem à sua forma de aducto incolor, como representado na figura 8. Já sob a forma de hemicetal, as antocianinas podem reagir com compostos eletrófilos através dos carbonos 6 e 8 do anel A. No entanto, as antocianinas são também capazes de reagir com compostos eletrófilos através dos seus grupos hidroxilo nomeadamente através de reações de cicloadição envolvendo simultaneamente o grupo OH (nucleófilo) do C-5 e o C-4 (eletrófilo), dando origem a piranoantocianinas[37]. Relativamente ao anel B, este pode atuar como um agente redutor, dependendo do número de substituintes hidroxilados presentes. Após a oxidação, pode sofrer oxidações acopladas ou adições de Michael atuando como um poderoso eletrófilo.

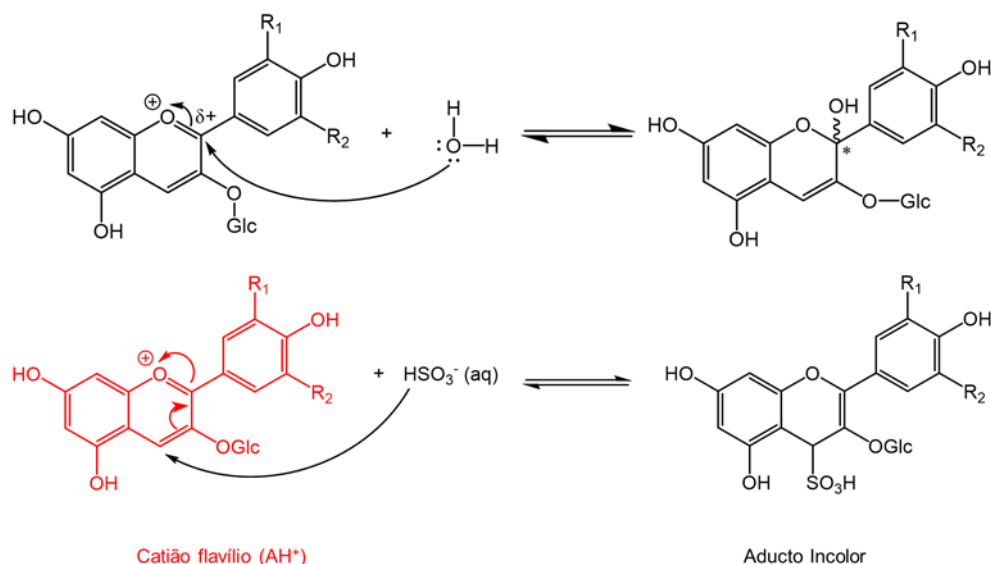


Figura 8: Reatividade da forma de catião flavílio das antocianinas: reação de hidratação e de adição do bissulfito.

1.3 Piranoantocianinas

As piranoantocianinas, figura 9, integram um grupo importante de pigmentos derivados de antocianinas, presentes essencialmente em alimentos processados como sumos de fruta ou vegetais e vinho tinto[37]. Estes pigmentos são particularmente interessantes devido ao seu contributo ao nível do sabor (como a adstringência), da capacidade cromática e antioxidante e representam o maior responsável, no que diz respeito aos efeitos benéficos para a saúde, do consumo moderado de vinho tinto[38].

Em matrizes alimentares complexas como é o caso do vinho tinto ocorrem diversas reações químicas entre os constituintes desta mesma matriz, nomeadamente reações de oxidação-redução, condensação, polimerização, entre outras. Uma dessas reações é a formação de pigmentos monoméricos através de reações entre antocianinas e moléculas de baixo peso molecular, como é o caso das piranoantocianinas. A formação de piranoantocianinas resulta de reações de cicloadição entre C4 e o grupo hidroxilo (C5) das antocianinas e uma ligação dupla de moléculas como o ácido pirúvico[39], vinilcatequina[40] e vinilcatecol[41] resultando na formação de um anel pirânico (anel D). Ao longo dos anos, foram descritas diversas famílias de piranoantocianinas incluindo vitisinas do tipo A e B[42], metilpiranoantocianinas[43], oxovitisinas[44] e acetilpiranoantocianinas[45].

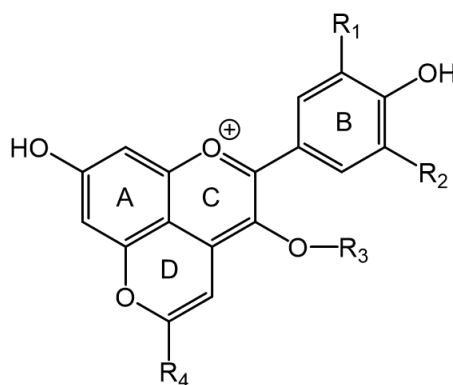


Figura 9: Estrutura base das piranoantocianinas.

As piranoantocianinas apresentam diversas diferenças espectroscópicas em relação às antocianinas precursoras. De uma forma geral, o espectro UV-Vis destes compostos revela um desvio hipsocrómico do λ_{max} (entre 478 e 510 nm) comparativamente à antocianina precursora ($\lambda_{\text{max}} \sim 520\text{-}540$ nm), razão pela qual estes apresentam uma cor mais alaranjada. No entanto, as portisinas representam uma exceção pois demonstram um desvio batocrómico ($\lambda_{\text{max}} = 580$ nm), devido à extensa conjugação dos eletrões π ao longo da molécula, conferindo uma cor azul e uma elevada estabilidade ao pigmento[46].

A formação de um novo anel pirano (anel D) torna estes pigmentos mais estáveis a variações de pH comparativamente às antocianinas. Numa variação de pH de 1 até 5, as antocianinas perdem cerca de 80% da sua intensidade de cor resultado da formação da espécie hemiacetal (incolor), por outro lado as piranoantocianinas não perdem intensidade de cor[47]. Esta estabilidade pode ser explicada pelo facto do anel D conferir uma maior proteção do grupo cromóforo aos ataques nucleófilos da água e do bissulfito, nomeadamente no carbono 4 do anel C, o que impossibilita a formação das espécies hemiacetal (incolor) e chalconas cis e trans (amarelas). Desta forma, numa solução ácida, $\text{pH} \leq 1$, a espécie predominante é o catião flavílio (AH^+) que, com o aumento de pH, pode sofrer reações de transferência de protão, formando a base quinoidal neutra e consecutivamente a base quinoidal aniónica (figura 10).

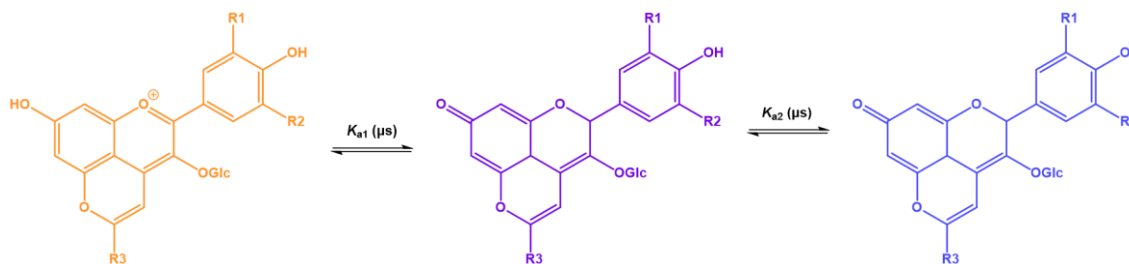


Figura 10: Espécies em equilíbrio das piranoantocianinas em meio aquoso e suas respetivas equações.

Em alimentos ricos em antocianinas, é possível que a formação destes pigmentos aumente com o tempo de armazenamento, como acontece no vinho tinto[37]. As características cromáticas únicas deste tipo de pigmentos, assim como a gama de cores e a sua estabilidade, tornam estes pigmentos bastante promissores no que diz respeito ao seu uso na indústria alimentar.

2. Embalagens Alimentares

As necessidades e preferências dos consumidores estão em constante alteração sendo que se tem vindo a desenvolver uma maior preocupação na qualidade e frescura dos alimentos que consomem, aliado a um estilo de vida mais saudável.

O acondicionamento dos alimentos representa uma elevada importância no que diz respeito à frescura, e conservação da qualidade do alimento no período de armazenamento e distribuição, além de fornecer informação essencial do mesmo. As embalagens alimentares têm diversos objetivos definidos como: a supressão do crescimento de microrganismos, manter a estabilização contra perigos ambientais e processos de oxidação, mascarar odores indesejáveis, permitir a entrega de nutrientes, entre outros.

O setor de embalagens tornou-se uma parte importante do sistema global da indústria constituindo cerca de 2% do Produto Nacional Bruto (PIB) para os países desenvolvidos. Nas últimas décadas, houve um crescimento da preocupação com a extensão do tempo de vida dos alimentos, segurança, problemas ambientais e razão custo-eficiência das embalagens alimentares. Estas razões despoletaram o desenvolvimento e pesquisa de diferentes materiais, e uma fabricação de alta eficiência de embalagens alimentares, nomeadamente no desenvolvimento de embalagens ativas e inteligentes. Estas tecnologias permitem melhorar a segurança alimentar, como detetar agentes patogénicos ou deterioração dos alimentos de uma forma mais eficaz, ou combater agressões externas. De uma forma geral, facilitam a monitorização da qualidade do alimento no decorrer de todo o processo até ao consumidor.

2.1 Embalagens alimentares ativas e inteligentes

As embalagens ativas são desenvolvidas através da incorporação de componentes funcionais (ácidos orgânicos, enzimas, fungicidas, extratos naturais) com a capacidade de serem libertados controladamente para o alimento ou o meio envolvente, mantendo a qualidade e prolongando o tempo de vida do alimento. Estas tecnologias de embalamento aplicam diversos mecanismos como a eliminação de oxigénio[48], absorção de

humidade[49], absorção/ emissão de CO₂[50], absorção de etileno[51], atividade antimicrobiana[52] ou antifúngica[53], entre outros.

As embalagens inteligentes são desenvolvidas através de materiais capazes de monitorizar a condição dos alimentos, fornecendo informações instantaneamente sobre a qualidade dos mesmos durante o armazenamento e o transporte[54]. Ao contrário das embalagens ativas, estas não possuem qualquer componente ativo que envolva a extensão da vida de prateleira dos alimentos, mas contêm elementos sensoriais para monitorizar a qualidade dos alimentos. Os estímulos sensoriais mais aplicado neste tipo de embalagens são a temperatura[55], o pH[56], o índice de O₂[57] ou CO₂[58].

2.1.1 Embalagens inteligentes: pH como estímulo sensorial

O conceito de embalagem inteligente é maioritariamente baseado em estímulos sensoriais como: a temperatura, o pH, a humidade, a percentagem de O₂ ou CO₂ presentes, etc.

Uma vez que as mudanças de pH são um fator importante na deterioração de muitos produtos alimentares[59], inúmeros indicadores visuais de pH têm sido desenvolvidos como sistema inteligente de embalagens alimentares. Estes indicadores apresentam diversas vantagens como a sua elevada sensibilidade, pequeno tamanho e baixo custo[60]. A construção destes sensores é baseada numa matriz sólida que permita a imobilização de um pigmento sensível a variações de pH[61]. Diversos pigmentos sintéticos como o azul bromofenol e o vermelho clorofenol são bastante utilizados como sensores de pH[62], no entanto para fins alimentares o seu uso é desaconselhado devido a potenciais efeitos nefastos para o consumidor. Para ultrapassar essa problemática, tem sido estudado a aplicação de pigmentos naturais[63] visto serem maioritariamente não tóxicos, de fácil obtenção e pouco poluentes[64].

Tendo em consideração pigmentos naturais obtidos através de plantas, as antocianinas têm sido bastante estudadas para este tipo de aplicações[65]. As antocianinas apresentam elevada aplicabilidade neste setor devido ao facto de serem espécies que mudam de cor conforme o pH do meio envolvente, como referido na parte A.

2.2 Construção de filmes

Um dos maiores desafios no fabrico de sensores é a integração de um elemento sensor num substrato. Essa integração deve ser feita de forma a preservar as propriedades do composto sensor que são imprescindíveis para uma resposta analítica de qualidade. O substrato mais utilizado para a incorporação de moléculas sensoras é o vidro, porém numa aplicação como um constituinte de uma embalagem alimentar não é o ideal. Para este tipo

de aplicação o pretendido seria um substrato resistente e maleável. E possa ser compatível para aplicação em embalagens alimentares.

2.2.1 Celulose

A celulose é a matéria-prima natural mais abundante com uma produção de cerca de 10^{11} - 10^{12} toneladas por ano[66], sendo que a celulose comercial é maioritariamente obtida através de madeira[67] e algodão[68]. É um polímero sob a forma de fibras, barato, biodegradável, insolúvel em água e com uma elevada resistência sendo que desempenha um papel importante na sustentação das paredes celulares de plantas e algas. Em comparação com a celulose modificada, a celulose natural mostra menor capacidade de adsorção e sua capacidade geralmente pode ser aumentada por modificação química[69].

A celulose é um homopolímero linear com uma fórmula molecular $C_6H_{10}O_5$ constituído unidades b-D-glicose ligadas covalentemente entre o grupo OH equatorial de C4 e o átomo de carbono C1 da próxima unidade de glicose, representado na figura 11[70].

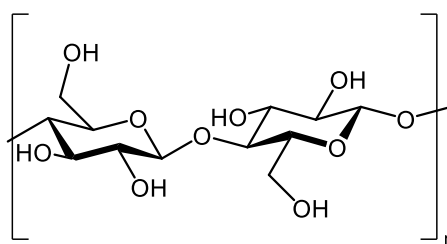


Figura 11: Estrutura química da celulose.

Este polímero apresenta uma ampla aplicabilidade na área farmacêutica[71], tratamento de águas[72], como integrante em sensores[73], agente de reforço[74], material de armazenamento de energia[75], estabilizador de emulsões[76], entre outras.

Neste trabalho, foi escolhido o acetato de celulose como substrato pois apresenta diversas vantagens como o facto de ser mais hidrofóbico e menos higroscópico que a celulose, não tóxico, resistente ao calor e por isso torna-se mais compatível com embalagens alimentares resistentes[77].

2.2.2 Layer-by-Layer (LbL)

A deposição por LbL é baseada na adsorção alternativa de espécies com cargas opostas a partir de soluções de polieletrólitos diluídas. A interação mais comum entre as camadas formadas é por atração eletrostática, desta forma é alcançado um revestimento laminado ou fortemente interpenetrado[78].

Esta técnica representa uma alternativa inovadora no desenvolvimento de filmes ou *coatings* para certas aplicações como retardante de chamas[79], aplicações electrocrómicas[80], médicas e bio aplicações[81].

A construção de filmes por LbL apresenta diversas vantagens como ser um método simples, barato, ecológico (o solvente mais utilizado é água e as concentrações de soluções/dispersões serem menos de 1 % m/m), de fácil integração de materiais funcionais e com uma elevada versatilidade[82]. No entanto, é também caracterizado por algumas limitações, relacionadas com a densidade de carga necessária para a formação e estabilização das multicamadas. As ligações entre as multicamadas são suscetíveis à adição de sais e variações de pH, podendo levar à ruptura destas ligações[83].

2.2.3 Polieletrólitos

Os polieletrólitos (PEs) são macromoléculas que combinam propriedades poliméricas e eletrolíticas, permitindo a sua utilização numa variedade de aplicações, como é o caso na construção de filmes funcionais e nanoestruturados por LbL. A principal propriedade dos PEs é o fato dos seus grupos funcionais sofrerem ionização quando da sua dissolução em solventes polares.

Dependendo da carga do grupo funcional presente na estrutura do polímero após a ionização, estes podem ser classificados como catiónicos, aniónicos (homopolímeros) ou anfifílicos (se estiverem presentes grupos funcionais carregados positiva e negativamente).

2.2.3.1 Quitosano

A quitina existe na forma natural de microfibras cristalinas e é um componente estrutural do exoesqueleto de artrópodes e das paredes celulares de fungos (como *Aspergillus* e leveduras)[84]. A obtenção comercial deste biopolímero é feita a partir da separação de diversos outros componentes da carapaça de crustáceos através da desmineralização e desproteínização com soluções diluídas de HCl e NaOH, seguida de descoloração com KMnO_4 e ácido oxálico[85].

O quitosano (CS) é um polissacarídeo obtido através da desacetilação de quitina, que por sua vez é o segundo biopolímero mais comum na natureza depois da celulose[86]. O quitosano é composto por duas unidades de sacarídeos, N-acetil-D-glucosamina e B-1-4D-glucosamina sendo que durante a reação de desacetilação, parte dos monómeros N-acetil-D-glucosamina são convertidos em D-glucosamina, figura 12.

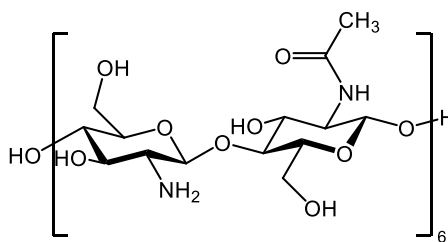


Figura 12: Estrutura química do quitosano.

Este biopolímero possui uma variedade de propriedades, como biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades quase não tóxicas ($LD_{50} = 16 \text{ g / Kg}$), e é amplamente utilizado em aplicações cosméticas, alimentares e farmacêuticas,[87] nomeadamente como integrante em biossensores e em sistemas de entrega de fármacos[88].

As principais propriedades que distinguem diferentes tipos de quitosano são o peso molecular (M_w) e o grau de acetilação (DD), sendo que o primeiro deve ser considerado como um valor médio não só dependente do peso de cada molécula, mas também do número de moléculas presentes[89]. O grau de acetilação (que varia entre 56 % e 99 %)[90] é indicativo da percentagem de grupos amina presentes suscetíveis à protonação, que fornecerá cargas positivas na cadeia polimérica. As cargas positivas associadas às cadeias permitem interações com espécies neutras por meio de interações ião-dipolo ou com espécies carregadas negativamente, como polímeros aniónicos ou lipídios, por forças eletrostáticas[91, 92].

2.2.3.2 Alginato

O ácido algínico é um polissacarídeo natural geralmente encontrado em algas castanhas e também pode ser produzido por fermentação microbiana usando bactérias especializadas[93]. Este biopolímero existe naturalmente no citoplasma e desempenha um papel importante no fortalecimento da parede celular[94]. Em extratos obtidos a partir de algas castanhas este encontra-se sob a forma de alginato de sódio.

O alginato de sódio apresenta-se como um pó branco ou amarelo claro, formando soluções aquosas viscosas com propriedade de espessante, emulsionante, estabilizador e também apresenta a capacidade de formação de géis e filmes. Este biopolímero é composto por dois monómeros (isómeros conformacionais): β -D-manuronila (M) e α -L-guluronila (G)[95]. Estes monómeros estão ligados por uma ligação glicosídica (1-4) homogénea, originando dímeros GG e MM, ou heterogénea originando dímeros GM e MG, representados na figura 13.

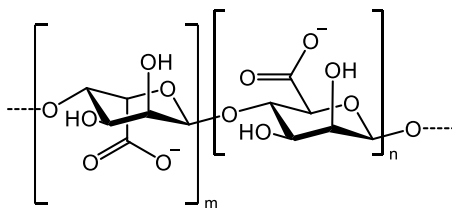


Figura 13: Estrutura química do alginato.

As diferenças estruturais, nomeadamente do rácio dos resíduos G e M, condicionam o comportamento do polímero como por exemplo a presença de um elevado número de dímeros GG confere uma maior solubilidade comparativamente a dímeros MM[96]. Por outro lado, a presença de um elevado número de homodímeros (GG/MM) torna este polímero insolúvel a baixos valores de pH contrariamente à presença heterodímeros (GM/MG). Para além da solubilidade, também a rigidez da cadeia é bastante afetada sendo a presença de resíduos G aumenta a rigidez[97].

O alginato de sódio tem sido descrito em literatura como um biopolímero de alta aplicabilidade em diferentes áreas como a catálise[98], saúde[99], tratamento de águas[100], embalagens[101] e na indústria alimentar[102].

2.2.3.3 Hidrocloreto de polialilamina (PAH)

O hidrocloreto de polialilamina (PAH), figura 14, é um polieletrólito catiónico com aminas primárias protonadas e é obtido através uma reação de polimerização de hidrocloreto de alilamina. No entanto, o monómero apresenta um radical alilo (elevada estabilidade) que confere baixa reatividade à polimerização e à ocorrência de reações de auto-terminação entre os átomos de hidrogénio alílicos e radicais livres.

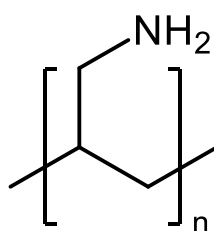


Figura 14: Estrutura química do PAH.

O PAH é um polímero bastante versátil e tem sido usado para remoção de corantes[103] ou metais pesado[104], sistemas de entrega de fármacos[105], transporte de ADN[106], etc.

2.2.3.4 Poli(estirenosulfonato) (PSS)

O poli(estirenosulfonato) (PSS), figura 15, é um polieletrólito aniónico que é obtido através da sulfonação do poliestireno.

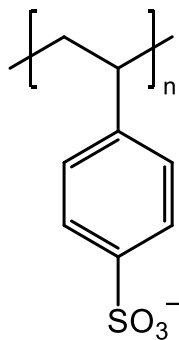


Figura 15: Estrutura química do PSS.

Este polímero revela diversas aplicações como o seu uso no ramo da catálise[107], médico[108], como integrante de materiais condutores[109], na indústria têxtil[110], entre outras.

3. Objetivos

O desenvolvimento desta tese de mestrado tem por base uma fase inicial de síntese e caracterização de pigmentos derivados de antocianinas, nomeadamente de pirano 3, 7-desoxiantocianinas. Após a síntese e isolamento dos pigmentos propostos realizar-se-á a caracterização estrutural (NMR e LC-MS) e físico-química dos mesmos (valor pK_a).

A segunda parte deste trabalho focar-se-á no estudo da imobilização de pigmentos em filmes de acetato de celulose. O primeiro passo passará pela otimização do processo de construção do substrato, seguido da sua funcionalização. De seguida será utilizada a técnica de Layer by Layer para a deposição de polieletrólitos à superfície e posterior imobilização do pigmento (molécula sensora).

Parte A – Síntese e Caraterização de Pigmentos Derivados de Antocianinas

4. Material e Métodos

4.1 Reagentes

Todos os reagentes e solventes utilizados no decorrer deste trabalho estão indicados na tabela 2, tal como a marca.

Tabela 2: Reagentes e marcas correspondentes.

Reagente	Marca
4-hidroxiacetofenona	Sigma-Aldrich®
2,6-dihidroxibenzaldeído	Sigma-Aldrich®
Ácido oxaloacético	Sigma-Aldrich®
Ácido 3-(4-aminofenil)-2-propenóico	Sigma-Aldrich®
Cloreto de sódio	Fluka
Metanol	Merck®
Acetonitrilo	Merck®
Acetato de etilo	Merck®
4-vinilfenol	Sigma-Aldrich®
Ácido fórmico	Merck®
TMSCl	Sigma-Aldrich®
Dimetilsufóxido deuterado	Sigma-Aldrich®
Ácido clorídrico 37 % (v/v)	Sigma-Aldrich®
Ácido acético glacial	Carlo Erba
Gel de sílica de fase reversa C18, Lichroprep (40-63 μm)	Merck®

O tampão universal utilizado em ao longo deste trabalho foi preparado através da dissolução de ácido fosfórico (2,25 mL, 85 % m/m), ácido bórico (3,54 g), ácido cítrico monohidratado (7,00 g) e NaOH (343 mL, 1 M) em água destilada até obter 1 litro.

4.2 Técnicas cromatográficas e de identificação estrutural

4.2.1 Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC-DAD)

As análises por cromatografia líquida de alta pressão foram realizadas num HPLC da marca Merck®, Hitachi L-7100, constituído por um detetor de díodo, DAD Merck L-

7450^a, um forno para colunas Merck L-7360, uma bomba Merck L-7100 e um degaseificador de solventes Merck L-7612.

As reações de síntese e os pigmentos isolados foram analisados por HPLC, injetando 20 µL de amostra, numa coluna de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm i.d., 5 µm, Thermo Scientific), termostaticada a 25 °C. Os solventes de eluição utilizados foram: solvente A - 10% de ácido fórmico em água (v/v) e solvente B - 10% de ácido fórmico em acetonitrilo (v/v), sendo utilizado um fluxo de eluição de 0,5 mL/minuto, segundo o gradiente apresentado na tabela 3.

Tabela 3: Gradiente utilizado para análise de HPLC-DAD.

Tempo (min)	%A	%B
0,0	90,0	10,0
50,0	36,0	64,0
55,0	0,0	100,0
60,0	0,0	100,0
61,0	90,0	10,0
71,0	90,0	10,0

A deteção foi realizada com um varrimento entre os 200 nm e os 600 nm. O software utilizado para a aquisição e tratamento de dados foi HSM D-7000.

4.2.2 Cromatografia líquida em coluna de vidro (CC) (flash)

Os compostos sintetizados foram purificados por cromatografia em coluna (CC), usando como fase estacionária o gel de sílica C18 de fase reversa (Merck 60, 230-240 mesh) tendo sido previamente suspensa no eluente (fase móvel) ou na mistura de eluentes a usar. A eluição foi realizada com o auxílio de uma bomba e recolha de frações de eluato foram realizadas manualmente.

4.2.3 Espetrometria de massa, LC-DAD/ESI-MS

As análises por cromatografia líquida foram realizadas num equipamento da série Finnigan Surveyor, com detecção dupla por fotodíodos e por espectrometria de massa (LC-DAD/ESI-MS), equipado com um detetor de massa LCQ DECA XP MAX (Finnigan Corp., San Jose, Califórnia), uma fonte ionizante à pressão atmosférica (API) usando uma ionização por electrospray, ESI. As voltagens do vaporizador e do capilar foram, respetivamente, 5 kV e 4 V. A temperatura do capilar foi de 325 °C. O gás de arraste e o gás auxiliar utilizado foi o azoto, a um fluxo de 90 e 25, respetivamente.

As amostras foram injetadas numa coluna de fase reversa (150 × 4,6 mm i.d., 5 µm, C18) da Thermo Finnigan (Hypersil Gold) termostatzada a 25 °C, com as mesmas condições referidas anteriormente para as análises de HPLC tais como o volume de injeção, os solventes, o gradiente de eluição e o fluxo. Os espectros foram obtidos em modo positivo com a gama de m/z entre 250 e 1500.

4.2.4 Ressonância Magnética Nuclear, RMN

A caracterização das amostras por ressonância magnética nuclear (RMN) foi realizada num espectrómetro Bruker-Advance 600 sendo obtidos espectros de protão, ^1H (600.13 MHz) e de carbono 13, ^{13}C (125.77 MHz), à temperatura de 303 K em DMSO deuterado/TFA 9:1, usando TMS como padrão interno. Os desvios químicos (δ) foram obtidos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram designadas como singletos (s), dupletos (d), duplos dupletos (dd) e multipletos (m). Os desvios químicos de ^1H e de ^{13}C foram atribuídos usando as diferentes técnicas: RMN 1D e 2D (COSY, gHMBC e gHSQC). O atraso para a constante de acoplamento da correlação C/H a longa distância foi otimizado para 7 Hz.

4.2.5 Espectroscopia UV-Vis

Para a determinação dos valores de pK_a de todos os pigmentos foram realizadas titulações espectrofotométricas. Os espectros do visível foram traçados num espectrofotómetro BIO-TEK Power Wave XS à temperatura constante de 25 °C de 360 a 830 nm (com um intervalo de 1 nm) usando uma célula com 1 cm de percurso ótico.

4.2.6 Medições de pH

Todas as medições de pH foram realizadas num medidor Radiometer Copenhagen PHM240. Os valores obtidos nas medições feitas em soluções hidroalcoólicas são valores aproximados devido à presença de etanol na solução que pode induzir algumas variações, sendo considerados como valores de pH aparentes.

4.3 Síntese de pigmentos

4.3.1 Síntese de 4',5-dihidroxiavilíio (3)

A síntese do pigmento 4',5-dihidroxiavilíio (**3**), esquematizada na figura 16, foi realizada através de uma reação de condensação aldólica catalisada por ácido entre a 4-hidroxiacetofenona **1** e o 2,6-dihidroxiavilaldeído **2**, usando um excesso de TMSCl, para gerar HCl *in situ*. Num balão de fundo redondo, foram adicionados 100 mg de **2** (0,72 mmol) e 1 eq. de **1** em 2:1 AcOEt-MeOH (4 mL) e a solução foi arrefecida e mantida a 0 °C. Foi adicionado TMSCl (20 equiv.), deixando-se a mistura reacional sobre agitação durante 60 min. O produto foi precipitado pela adição de AcOEt obtendo-se, por filtração, um sólido laranja em pó, sendo posteriormente analisado por HPLC-DAD, tendo sido obtido um rendimento de 65 – 70 %.

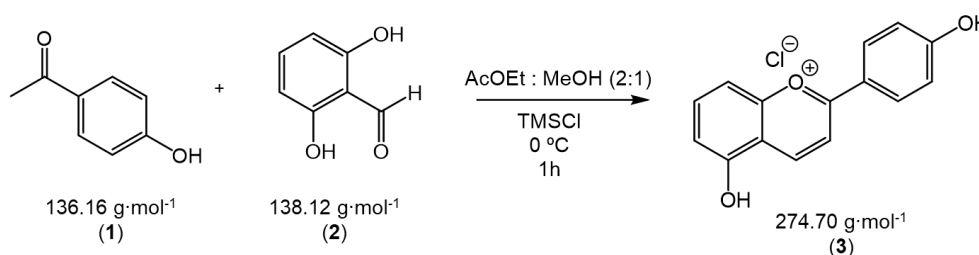


Figura 16: Reação de síntese de 4', 5-dihidroxiavilíio.

4.3.2 Síntese do 2,10-bis-(4',4''-hidroxifenil) piranobenzopirílio (4)

A síntese do piranoflavílio **4** foi realizada por três diferentes metodologias, com o objetivo de estudar qual a melhor via de síntese para a obtenção do produto pretendido com melhor rendimento.

4.3.2.1 Método 1:

Na primeira metodologia, figura 17, dissolveram-se, 4',5-dihidroxiavilíio (**3**; 66,5 mg, 0,18 mmol) e 4-hidroxiacetofenona (**1**; 5 equiv.) em 20% EtOH (50 mL). Esta reação foi estudada a dois valores de pH diferentes: a pH 2,6, descrito como o valor ótimo para a promoção do equilíbrio ceto-enol para a forma enólica[111, 112]; e a pH 3,1, valor após a adição dos reagentes. Esta mistura reacional foi mantida em agitação a 37 °C durante 50 h, em ambas as condições. O processo da reação foi monitorizado por HPLC-DAD e por LC-MS. Após ser atingida a formação máxima do produto, as reações foram terminadas iniciando-se o processo de purificação e isolamento do composto, tendo sido obtido um rendimento de 8%.

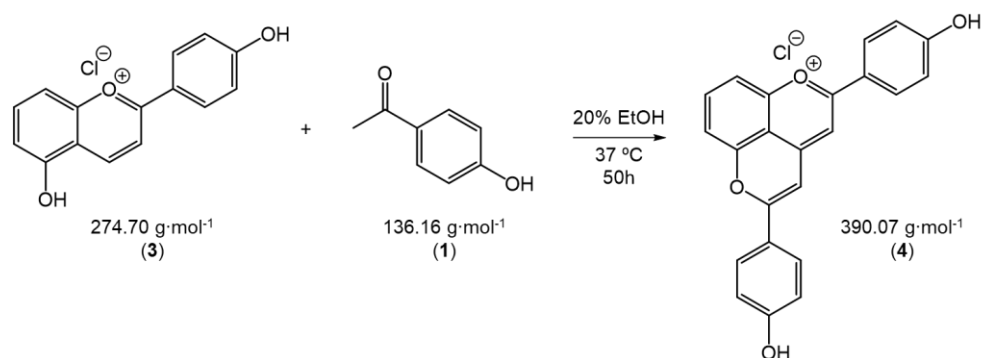


Figura 17: Reação de síntese do 2,10-bis-(4',4''-hidroxifenil) piranobenzopirílio, pelo método 1.

4.3.2.2 Método 2:

A metodologia utilizada nesta síntese, descrita na figura 18, foi idêntica à descrita anteriormente na síntese do 4',5-dihidroxiavilíio (3) mas com a adição de 4 equivalentes de 4-hidroxiacetofenona (1) em vez de apenas 1 equivalente. A reação foi monitorizada por HPLC-DAD o que permitiu que a adição de 4-hidroxiacetofenona fosse feita tendo em conta a razão flavílio – piranoflavílio. A reação foi terminada ao fim de 60 horas. Nesta metodologia, foi adicionado acetato de etilo em excesso com o intuito de provocar a precipitação do pigmento. No entanto, devido à baixa quantidade de precipitado obtido, seguiu-se com o procedimento de purificação que será descrito seguidamente, tendo sido obtido um rendimento de 9%.

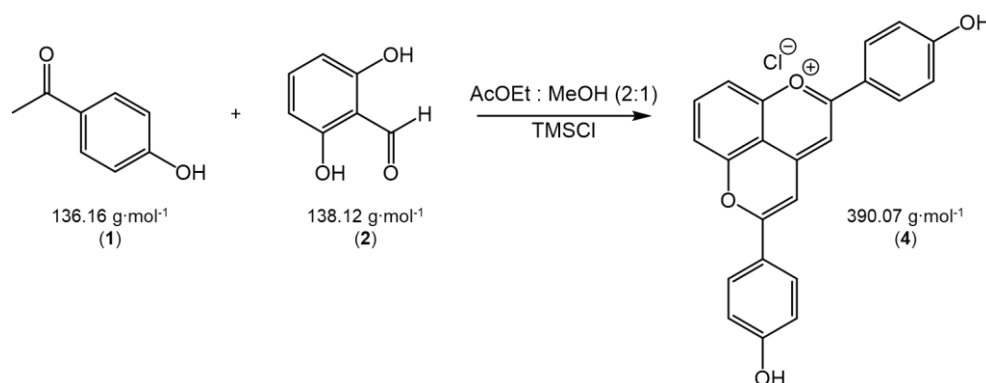


Figura 18: Reação de síntese do 2,10-bis-(4',4''-hidroxifenil)piranobenzopirílio, pelo método 2.

4.3.2.3 Método 3:

A terceira metodologia, descrita na figura 19, foi realizada adicionando 4',5-dihidroxiavilíio (3; 66,5 mg, 0,18 mmol) a 4-vinilfenol (5; 5 equiv) dissolvidos em 20% EtOH (50 mL), num frasco fechado. Esta mistura reacional foi mantida em agitação e a 37 °C e a pH 3,5. O progresso da reação foi monitorizado por HPLC-DAD e por LC-MS. Após ser atingida a formação máxima do produto (2 horas) a reação foi terminada iniciando-se o

processo de purificação e isolamento do composto, tendo sido obtido um rendimento de 15%.

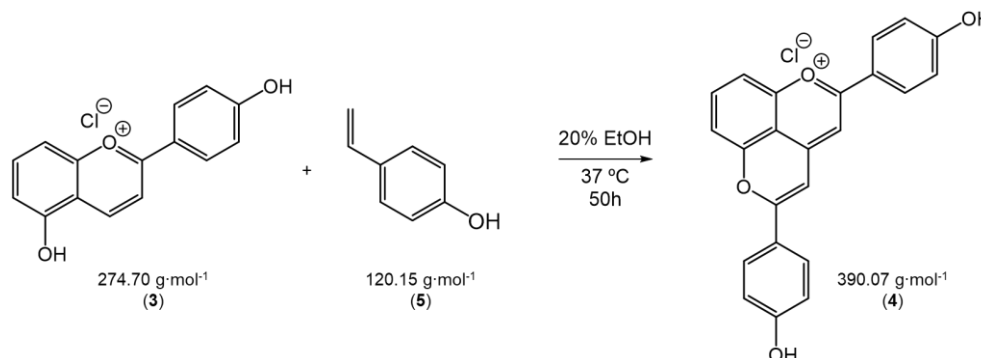


Figura 19: Reação de síntese do 2,10-bis-(4',4''-hidroxifenil)piranobenzopirilio, pelo método 3.

4.3.2.4 Purificação e isolamento do pigmento **4**

O solvente orgânico presente na mistura reacional foi evaporado, seguindo-se a realização de uma extração líquido-líquido com AcOEt (3 × 250 mL) e água (2 × 200 mL). De seguida, a mistura reacional foi submetida a uma cromatografia de fase reversa numa coluna de vidro com gel de sílica C18, após a eliminação do solvente orgânico. A fração contendo o piranoflavílio **4** foi recolhida com 35-45 % de metanol acidificado com HCl. As determinações da pureza das frações recolhidas da coluna foram realizadas por HPLC-DAD e LC-MS. Após a evaporação do metanol, o pigmento de cor laranja foi liofilizado e armazenado a -15 ° C. ¹H RMN (600,13 MHz, DMSO-*d*₆/TFA 9:1) δ (ppm): 8,16 – 8,20 (m, 5H, H7, H2', H6', H2'' e H6''), 7,82 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H6 e H8), 7,75 (s, 2H, H3 e H9), 7,06 (d, J = 8.7 Hz, 4H, H3', H5', H3'' e H5''). ¹³C RMN (125,77 MHz, DMSO-*d*₆/TFA 9:1), δ (ppm): 168,30 (C2 e C10), 164,65 (C4' e C4''), 152,05 (C4), 151,72 (C5 e C8a), 137,27 (C7), 131,07 (C2', C6', C2'' e C6''), 120,47 (C1' e C1''), 117,23 (C3', C5', C3'' e C5''), 112,90 (C4a), 112,81 (C6 e C8), 102,29 (C3 e C9). LC-DAD / ESI-MS: [M]⁺ 355 λ_{max} = 497 nm

4.3.3 Síntese da 10-carboxipirano-4'-hidroxiflavílio (**7**)

Dissolveu-se o 4',5-dihidroxiflavílio (**3**; 50 mg, 0,18mmol) em 20% EtOH/H₂O (50 mL) e adicionou-se o ácido oxaloacético (**6**; 5 equiv), esquematizado na figura 20. A mistura reacional foi mantida em agitação, a 37 °C e a pH 2,6 durante 16 horas. O processo da reação foi monitorizado por HPLC-DAD e por LC-MS. Após ser atingida a formação máxima do produto (16 horas) as reações foram terminadas iniciando-se o processo de purificação e isolamento do composto, idêntico ao da síntese anteriormente descrita. O primeiro passo foi realização de uma extração líquido-líquido com AcOEt (3 × 150 mL) e água (3 × 200 mL) para uma posterior purificação por coluna flash. A fração contendo o pigmento foi

recolhida com 15-20 % de metanol acidificado com HCl, tendo sido obtido um rendimento de 12%.

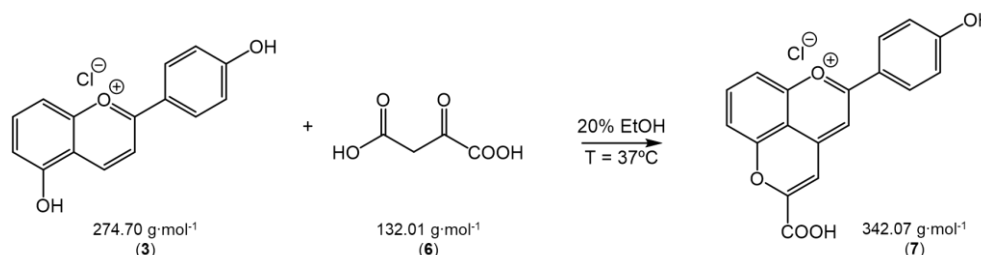


Figura 20: Reação de síntese de cloreto de 10-carboxipirano-4'-hidroxilflavílio.

Por fim, o pigmento que apresentava uma cor laranja foi liofilizado e armazenado a -15 °C. ¹H RMN (600,13 MHz, DMSO-d₆/TFA 9:1) δ (ppm): 8,30 (H7, H2', H4' e H6'), 8,21 (H3), 7,84-7,97 (H6 e H8), 7,78 (H9), 7,11 (H3' e H5'). ¹³C RMN: (125,77 MHz, DMSO-d₆/TFA 9:1), δ = 172,04 (C2), 166,58 (C4'), 155,69-160,36 (C10), 151,57-152,04 (C5 e C8a), 138,56 (C7), 132,68 (C2' e C6'), 119,84 (C1'), 117,65 (C3' e C5'), 114,44 (C4a), 113,19-113,45 (C6 e C8), 109,87 (C9), 105,00 (C3) e C4 não identificado. LC-DAD / ESI-MS: [M]⁺ 307, λ_{max} = 485 nm.

4.3.4 Síntese da 10-(4'-aminofenil)pirano-4'-hidroxilflavílio (9)

Este pigmento foi sintetizado como esquematizado na figura 21. Foi feita a adição de 4',5-dihidroxilflavílio (3; 50 mg, 0,18mmol) a ácido 3-(4-aminofenil)-2-propenóico (ou ácido 4-amino cinâmico) (8, 5 equiv) dissolvidos em 20% EtOH (50 mL). Esta mistura reacional foi mantida em agitação, a 37 ° C e a pH 3,9, durante 24 horas. O processo da reação foi monitorizado por HPLC-DAD e por LC-MS. Após ser atingida a formação máxima do produto (24 horas) a reação foi terminada, iniciando-se o processo de purificação e isolamento do composto, idêntico ao descrito em 1.3.2.4, tendo sido obtido um rendimento de 12%.

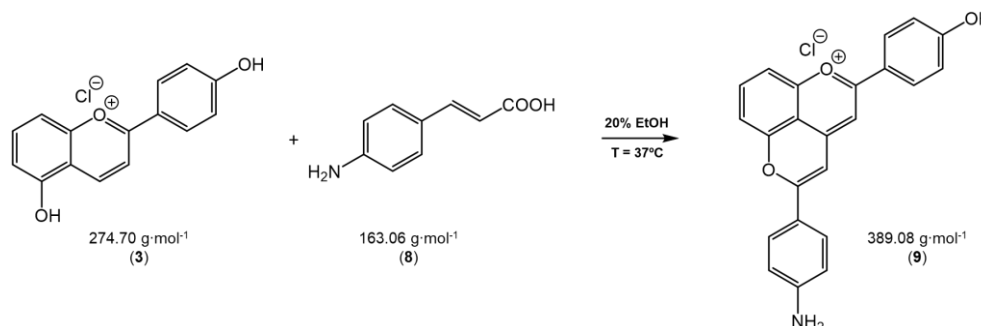


Figura 21: Reação de síntese 10-(4'-aminofenil)pirano-4'-hidroxilflavílio.

A fração contendo o pigmento de cor roxa foi recolhida com 40-45 % de metanol acidificado com HCl, posteriormente liofilizada e armazenada a -15 ° C. ¹H RMN (600,13

MHz, DMSO-*d*₆/TFA 9:1) δ (ppm): 8,09 (H2' e H6'), 8,07 (H7), 8,05 (H2'' e H6''), 7,69-7,71 (H6 e H8), 7,57 (H9), 7,54 (H3), 7,03 (d, J = 9.8 Hz, H3' e H5'), 6,08 (d, J = 8,9 Hz, H3'' e H5''). ¹³C RMN (125,77 MHz, DMSO-*d*₆/TFA 9:1) δ (ppm): 168,56 (C10), 165,75 (C2), 163,88 (C4'), 156,86 (C4''), 156,39 (C7), 151,44 (C4), 151,40 (C5), 131,57 (C2'' e C6''), 129,93 (C2' e C6'), 120,78 (C1'), 116,94 (C3' e C5'), 115,48 (C1''), 114,71 (C3'' e C5''), 112,43 (C6 e C8), 111,97 (C4a), 101,03 (C3), 100,82 (C9). C8a não identificado. LC-DAD / ESI-MS: [M]⁺ 354, λ_{max} = 523 nm.

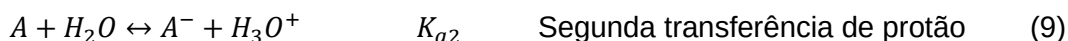
4.4 Determinação da constante de acidez, pK_a

As constantes termodinâmicas de acidez foram determinadas através de titulações espectrofotométricas. As soluções *stock* dos pigmentos foram preparadas com uma concentração de 0,3 mM numa solução de 75 % (v/v) de etanol 0,1 M HCl. Numa célula de quartzo, foram adicionados volumes iguais (1 mL) de solução tampão universal (pH $\approx$ 1), seguido de solução de NaOH aquoso (0,1 M) e da solução *stock* de pigmento. A solução foi agitada, obtendo-se uma concentração final de pigmento de 0,1 mM em 25 % EtOH/H₂O (v/v).

A titulação consistiu em adições sucessivas de uma solução de NaOH 1 M a uma solução de pigmento 25% EtOH de modo a obter uma gama de valores de pH entre 1 e 12. A cada adição de solução de NaOH 1 M, a mistura foi agitada, e de seguida foi traçado o respetivo espectro UV-Vis medindo-se no final o pH da solução. Os espectros de absorbância foram devidamente corrigidos tendo em conta o fator de diluição:

$$A_{\text{corrigida}} = A_{\text{experimental}} \times \frac{V_{\text{ad NaOH 1M}} + V_{\text{inicial}}}{V_{\text{inicial}}} \quad (7)$$

Verifica-se que o processo global deste tipo de pigmentos depende apenas de equilíbrios ácido-base, podendo ser sumarizado pelas seguintes equações:



onde,

$$K_{a1} = \frac{[A] \cdot [H_3O^+]}{[AH^+]} \quad K_{a2} = \frac{[A^-] \cdot [H_3O^+]}{[A]} \quad K_{a3} = \frac{[A^{2-}] \cdot [H_3O^+]}{[A^-]} \quad (11)$$

A concentração total das espécies individuais, C_0 , é dada pela equação (12):

$$C_0 = [AH^+] + [A] + [A^-] + [A^{2-}] \quad (12)$$

E a distribuição das frações molares das diferentes espécies, é calculada pelas equações seguintes:

$$\chi_{AH^+} = \frac{[AH^+]}{C_0} = \frac{[H_3O^+]^3}{[H_3O^+]^3 + K_{a1} \cdot [H_3O^+]^2 + K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot [H_3O^+] + K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}} \quad (13)$$

$$\chi_A = \frac{[A]}{C_0} = \frac{K_{a1} \cdot [H_3O^+]^2}{[H_3O^+]^3 + K_{a1} \cdot [H_3O^+]^2 + K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot [H_3O^+] + K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}} \quad (14)$$

$$\chi_{A^-} = \frac{[A^-]}{C_0} = \frac{K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot [H_3O^+]}{[H_3O^+]^3 + K_{a1} \cdot [H_3O^+]^2 + K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot [H_3O^+] + K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}} \quad (15)$$

$$\chi_{A^{2-}} = \frac{[A^{2-}]}{C_0} = \frac{K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}}{[H_3O^+]^3 + K_{a1} \cdot [H_3O^+]^2 + K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot [H_3O^+] + K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}} \quad (16)$$

A absorvância a um dado comprimento de onda é dependente do pH e é definida pela equação:

$$A_{calc} = \varepsilon_{AH^+} + \chi_{AH^+} + \varepsilon_A \cdot \chi_A + \varepsilon_{A^-} \cdot \chi_{A^-} + \varepsilon_{A^{2-}} \cdot \chi_{A^{2-}} \quad (17)$$

onde ε_{AH^+} , ε_A , ε_{A^-} e $\varepsilon_{A^{2-}}$ são os coeficientes de absorção molares das espécies individuais ao comprimento de onda considerado.

Os valores de pK_a foram determinados efetuando um ajuste dos valores de absorvância calculados pela equação (17) aos obtidos experimentalmente. A soma do método dos mínimos quadrados foi depois minimizada por aplicação da função do solver.

5. Resultados e Discussão

5.1 Síntese

A síntese dos piranoflavílios (**4**, **7** e **9**) seguiu uma metodologia já descrita para este tipo de compostos e divide-se em 2 partes: síntese do 4',5-dihidroxiavilíio e posterior reação com moléculas de baixo peso molecular para a formação dos piranoflavílios.

5.2 Síntese de 4',5-dihidroxiavilíio (**3**)

O composto 4',5-dihidroxiavilíio (**3**), precursor de todas as sínteses de piranoflavílios realizadas neste trabalho, foi sintetizado através de uma reação de condensação aldólica (figura 22) catalisada por ácido entre derivados de benzaldeídos e acetofenonas, usando o TMS-Cl em excesso para criar HCl *in situ*, seguindo um procedimento já descrito [113-116].

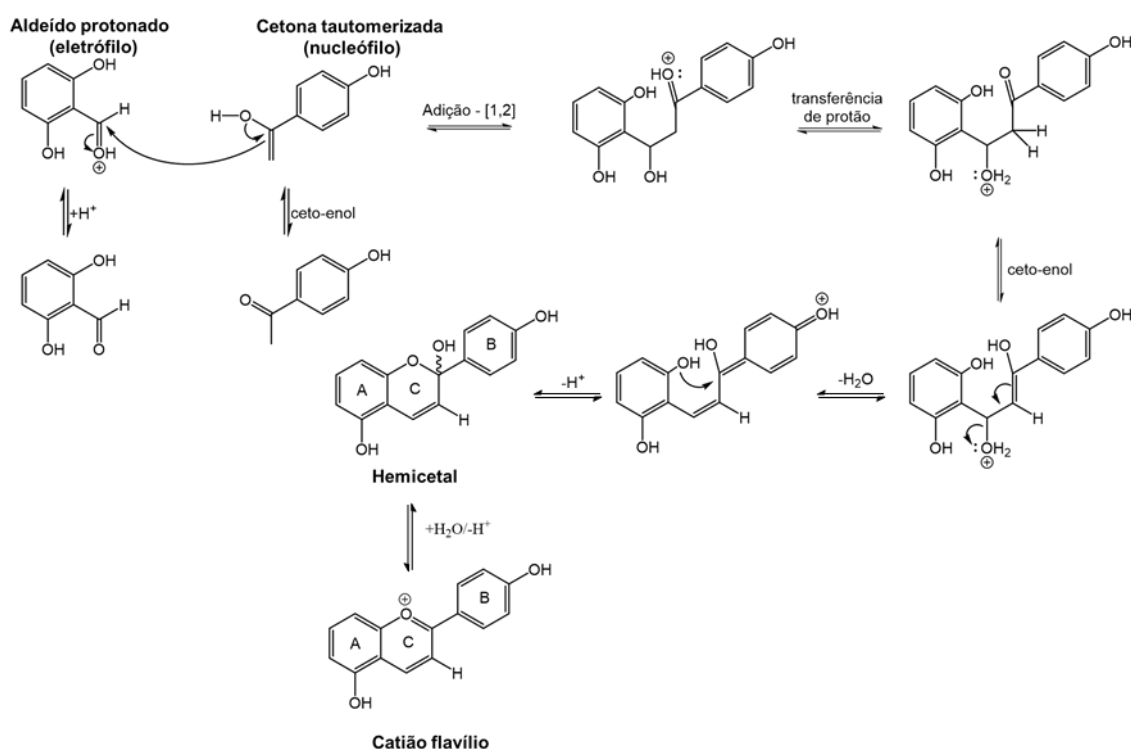


Figura 22: Mecanismo da reação da condensação aldólica catalisada por ácido sugerido para a síntese do pigmento 4',5-dihidroxiavilíio.

A síntese deste pigmento foi monitorizada por HPLC-DAD tendo sido identificado o pico do 4',5-dihidroxiavilíio ($t_{\text{retenção}} = 20$ min) e também outros picos referentes a impurezas com $t_{\text{retenção}} > 35$ min), figura 23, posteriormente confirmado através da análise LC-DAD/ESI-MS: $[M]^+ m/z = 239$.

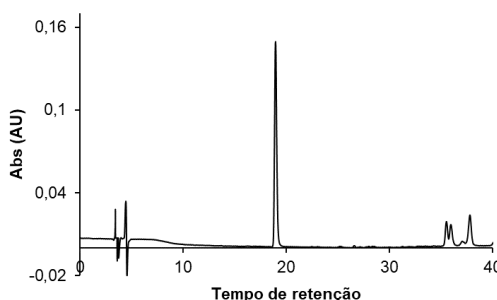


Figura 23: Cromatograma de HPLC-DAD do precipitado obtido do pigmento 4', 5-dihidroxiavilíio.

O rendimento obtido para esta reação foi de 65 - 70 %.

5.3 Síntese de piranoflavílios

Nesta secção vão ser abordadas as reações do sal de flavílio **3**, anteriormente descrito, com p-hidroxiacetofenona ou vinilfenol para dar origem ao composto **4**, com ácido oxaloacético para dar origem ao composto **7** e com ácido 3-(4-aminofenil)-2-propenóico (ou ácido 4-amino cinâmico) para dar origem ao composto **9**. A síntese dos pigmentos **4**, **7** e **9** ocorreu via reação de anelação envolvendo o carbono 4 do catião flavílio, o grupo hidroxilo do C5 e os respetivos reagentes na forma enólica seguindo a via de mecanismo já descrita na literatura (figura 24)[40, 114, 117-120].

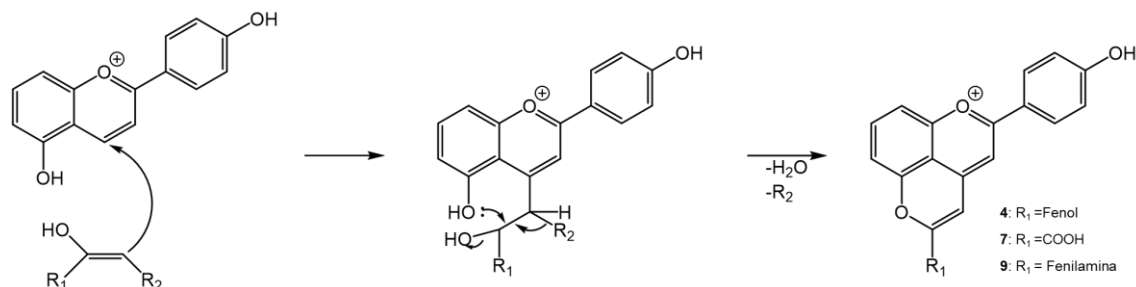


Figura 24: Mecanismo geral para a formação de piranoflavílios.

5.3.1 Síntese do 2,10-bis-(4',4''-hidroxifenil) piranobenzopirílio (**4**)

O método para a síntese destes pigmentos mais utilizado no laboratório onde o desenvolvimento deste projeto se inseriu é executado recorrendo a ácidos cinâmicos. Como tal, começou-se por sintetizar (**4**) através de uma reação de anelação entre 4',5-dihidroxiavilíio e acetofenona numa solução hidroalcoólica, a diferentes valores de pH.

O progresso desta reação, em ambos os valores de pH, foi monitorizado por HPLC-DAD, tendo sido detetada a formação de produto ($t_{\text{retenção}} = 36 \text{ min}$) após 2 horas do início da reação (figura 10) confirmado por LC-MS ($[M]^+ m/z = 477$). Esta reação foi estudada em diferentes valores de pH: a 2,6, descrito como o valor ótimo para a promoção da forma enólica no equilíbrio ceto-enol[111, 112] e a pH 3,1, valor após a adição dos reagentes. Ao

fim de 50 horas, observou-se que o pico referente ao reagente de partida, 4',5-dihidroxi-flavílio (**3**) era praticamente inexistente, em ambos os valores de pH, tendo sido terminadas as reações.

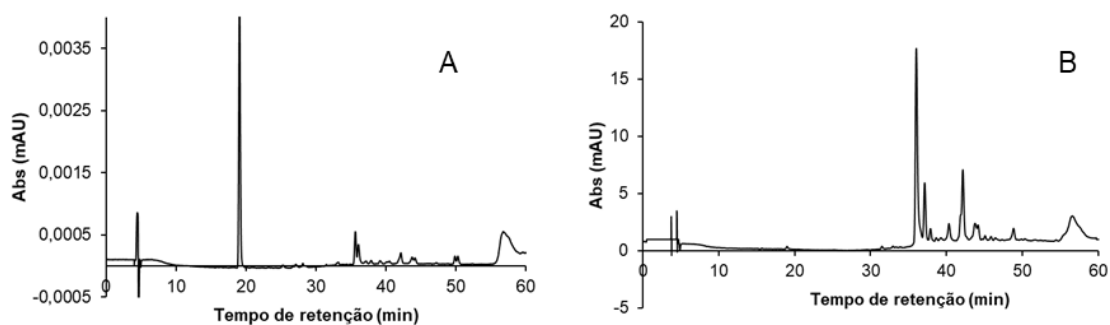


Figura 25: Cromatogramas de HPLC-DAD da reação de síntese 2,10-bis-(4',4''-hidroxifenil) piranobenzopirílio, pelo método 1, após 2 horas (A) e após 50 horas (B).

Aquando da síntese do flavílio (**3**) verificou-se que ocorre a formação do composto (**4**). Por esta razão, optou-se por testar um método de síntese baseada na síntese do 4',5-dihidroxi-flavílio (**3**) descrita anteriormente, com número superior de equivalentes de acetofenona usados.

Esta reação foi monitorizada por HPLC-DAD, sendo que após 2 horas já era possível verificar a presença de produto ($t_{\text{retenção}} = 36 \text{ min}$), (figura 26) confirmado por LC-MS ($[M^+]$ m/z 477) no entanto, apresentava uma elevada percentagem de 4',5-dihidroxi-flavílio. Após 22 horas foi observada a presença de 20% de piranoflavílio e 31% de flavílio, tendo sido adicionado mais um equivalente de 4-hidroxiacetofenona. Ao fim de 46 horas, as percentagens eram de 48% de flavílio e 48% de piranoflavílio, pelo que foi adicionado mais um equivalente de 4-hidroxiacetofenona com o objetivo de aumentar a percentagem de piranoflavílio. O quarto equivalente de 4-hidroxiacetofenona foi adicionado após 54 horas, sendo que a reação foi terminada ao fim de 60 horas.

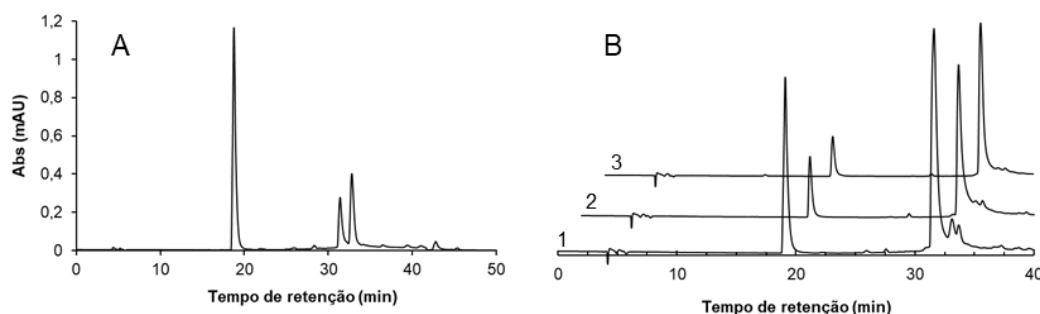


Figura 26: Cromatogramas de HPLC-DAD da reação de síntese de cloreto de 2,10-bis-(4',4''-hidroxifenil) piranobenzopirílio, pelo método 2, após 2 horas (A), após 22 horas (B;1), após 46 horas (B; 2) e após 60 horas (B; 3).

Por último, a síntese do composto (**4**) foi testada com um outro precursor, o 4-vinilfenol. Este método surgiu com o objetivo de avaliar qual a influência que um precursor mais reativo, conferido pelo facto de ser um alceno terminal, teria no tempo e rendimento da reação.

Tal como todas as reações acima mencionadas foi realizado um seguimento por HPLC-DAD em que, neste caso, após 2 horas de reação já apresentava uma quantidade vestigial de reagente de partida e uma elevada percentagem de produto ($t_{\text{retenção}} = 36 \text{ min}$), (figura 27) confirmada por LC-MS ($[M^+] m/z = 477$).

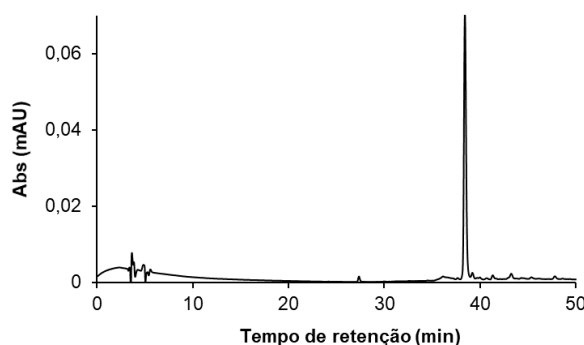


Figura 27: Cromatograma de HPLC-DAD da reação de síntese do 2,10-bis-(4', 4'-hidroxifenil) piranobenzopirílio, pelo método 3, após 2 horas.

5.3.2 Purificação e isolamento do pigmento

Após o término das reações foi iniciado o processo de purificação e isolamento do pigmento. Primeiramente foi realizada uma extração líquido-líquido com acetato de etilo que eliminou maioritariamente as impurezas com $\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$ mas também outras impurezas, na fase orgânica. No entanto, no método 2, antes deste procedimento foi adicionado acetato de etilo em excesso com o objetivo de ser possível a precipitação, tendo sido obtida muito pouca quantidade de tal forma que se optou pela realização da extração líquido-líquido como anteriormente descrita. O facto de a mistura apresentar percentagens muito semelhantes de flavílio e piranoflavílio tornou a extração líquido-líquido bastante ineficiente pois o pigmento estava presente tanto na fase aquosa como na fase orgânica.

De seguida, a mistura reacional foi submetida a uma purificação por coluna de vidro por cromatografia flash, após a eliminação do solvente orgânico. A primeira fração eluída desta coluna, realizada com uma solução aquosa de 20 % de MeOH acidificado, apresentava uma cor amarela que correspondia à eluição do reagente de partida. A fração contendo o piranoflavílio, de cor laranja, foi recolhida com 35-45 % de metanol acidificado com HCl, e foi determinada a sua pureza por HPLC-DAD e LC-MS.

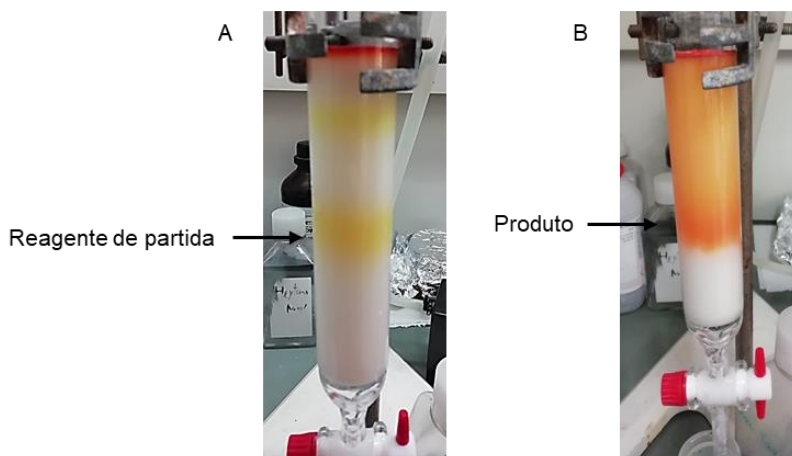


Figura 28: Isolamento do pigmento 2,10-bis-(4',4''-hidroxifenil)piranobenzopirílio por cromatografia flash com sílica de fase reversa C18.

Após a síntese e isolamento do pigmento 2,10-bis-(4',4''-hidroxifenil) piranobenzopirílio (**3**) pelas três vias de síntese, os rendimentos das reações foram calculados e estão apresentados na tabela 4.

Após a purificação do composto obtido pelas três vias de síntese foi possível calcular o rendimento de cada um. O método 1 apresentou um tempo de reação de 50 horas e um rendimento de 8 %, revelando-se o método menos vantajoso de todos. Por outro lado, o método 2 exibiu um tempo reacional de 60 horas e um rendimento de 9 % apresentando a vantagem de o piranoflavílio (**4**) ser sintetizado num único passo reacional. Em contrapartida, o método 3, em que é utilizado um alceno terminal com uma elevada reatividade, revelou-se o mais vantajoso pois revelou um tempo reacional muito curto (2 horas) e o rendimento mais elevado dos 3 métodos, 15 %.

5.3.2.1 Caraterização estrutural

Depois de isolado e purificado, o pigmento **4** (figura 29) foi caraterizado totalmente por LC-MS e por RMN ^1H e ^{13}C , tabela 3.

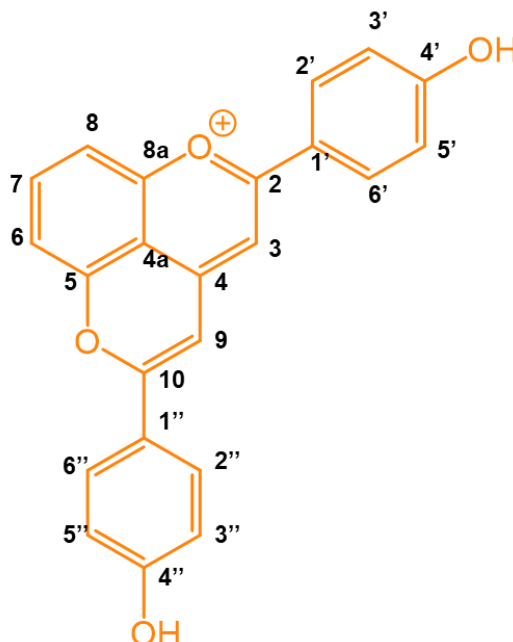


Figura 29: Estrutura química do pigmento 2,10-bis-(4',4''-hidroxifenil)piranobenzopirílio.

Ao observar a análise realizada por RMN de protão (figura 30), a ausência do sinal relativo ao H4 comprova a formação do anel pirano. Por outro lado, temos a presença de diversos sinais equivalentes que comprovam o plano de simetria da molécula como por exemplo o singuleto a $\delta=7,75$ ppm que é devido aos protões H3 e H9. Para além disso, os protões H7, H2', H6', H2'' e H6'' foram identificados pelo mesmo multiplete ($\delta=8,16-8,20$ ppm) e também os protões H3', H5', H3'' e H5'' foram atribuídos ao mesmo duplete ($\delta=7,06$ ppm).

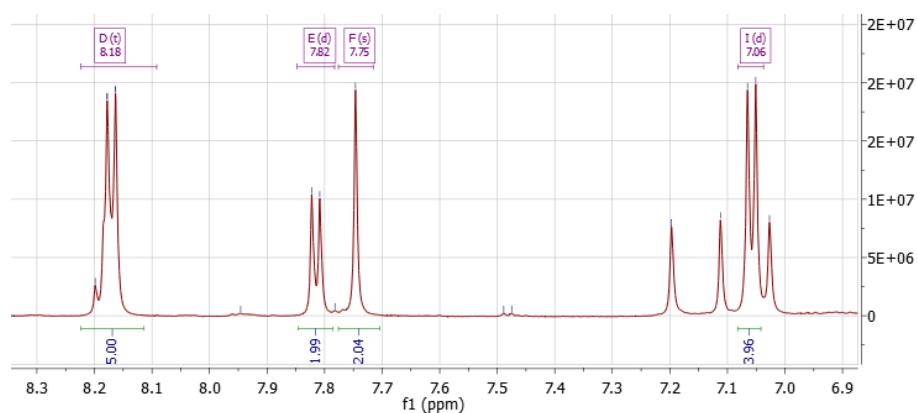


Figura 30: Espectro ^1H do 2,10-bis-(4', 4''-hidroxifenil) piranobenzopirílio.

5.3.3 Síntese de 10-carboxipirano-4'-hidroxiflavílio (7)

Este pigmento foi sintetizado através de uma reação de anelação entre 4',5-dihidroxiflavílio (**3**) e o ácido oxaloacético em solução hidroalcoólica. O progresso desta reação foi monitorizado por HPLC-DAD, tendo sido detetada a formação de produto ($t_{\text{retenção}} = 22 \text{ min}$) após 2 horas do início da reação, confirmado por LC-MS ($[M^+] m/z = 307$). Ao fim de 14 horas, observou-se que o pico referente ao reagente de partida, 4',5-dihidroxiflavílio era praticamente inexistente, (figura 31) tendo sido terminada a reação.

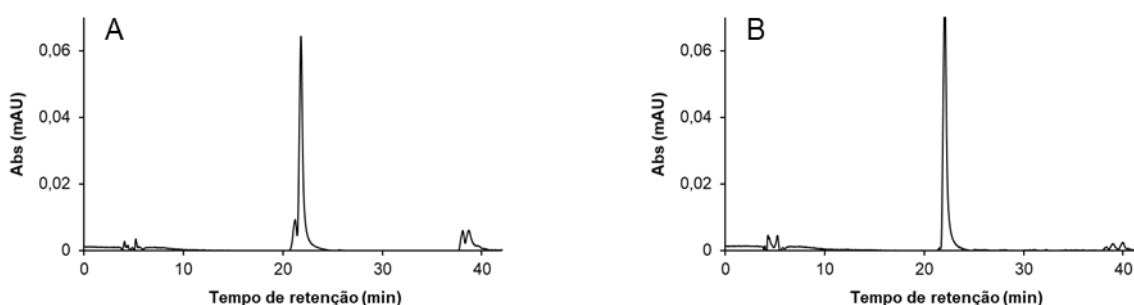


Figura 31: Cromatograma de HPLC-DAD da reação de síntese da 10-carboxipirano-4'-hidroxiflavílio após 2 horas (A) e após 14 horas (B).

De seguida, procedeu-se à purificação e isolamento do pigmento através de uma extração líquido-líquido que eliminou maioritariamente as impurezas a $\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$ mas também outras impurezas, na fase orgânica. Posteriormente foi realizada uma purificação por coluna de vidro por cromatografia flash, após a eliminação do solvente orgânico. A primeira fração eluída desta coluna, foi realizada com uma solução aquosa de 10 % de MeOH acidificado, apresentando uma cor amarela, que correspondia à eluição do reagente de partida. A fração contendo o piranoflavílio, cor laranja, foi recolhida com 15-20 % de metanol acidificado com HCl, e determinada a sua pureza por HPLC-DAD e LC-MS.

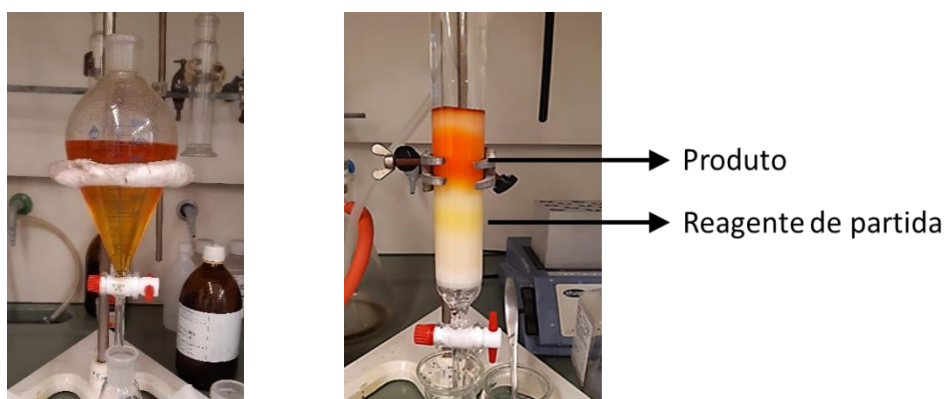


Figura 32: Isolamento do pigmento 10-carboxipirano-4'-hidroxiflavílio por cromatografia flash com sílica de fase reversa C18.

O rendimento da reação foi calculado após o isolamento e liofilização do pigmento, tendo sido obtido um rendimento de 12 %.

5.3.3.1 Caracterização estrutural

Depois de isolado e purificado, o pigmento foi caracterizado totalmente por LC-MS e por RMN ^1H e ^{13}C , figura 33.

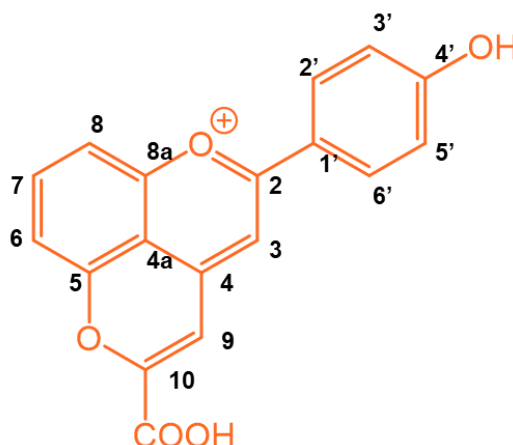


Figura 33: Estrutura química da 10-carboxipirano-4'-hidroxiflavílio.

Na análise dos espectros de ^1H , figura 34, é notório o desaparecimento do sinal devido ao H4, característico dos flavílios o que comprova a formação do anel pirânico. Observou-se também a presença de dois singletos atribuídos ao H3 e H9 com desvios químicos diferentes, 8,21 e 7,78 ppm, respectivamente, comprovando o diferente ambiente químico envolvente.

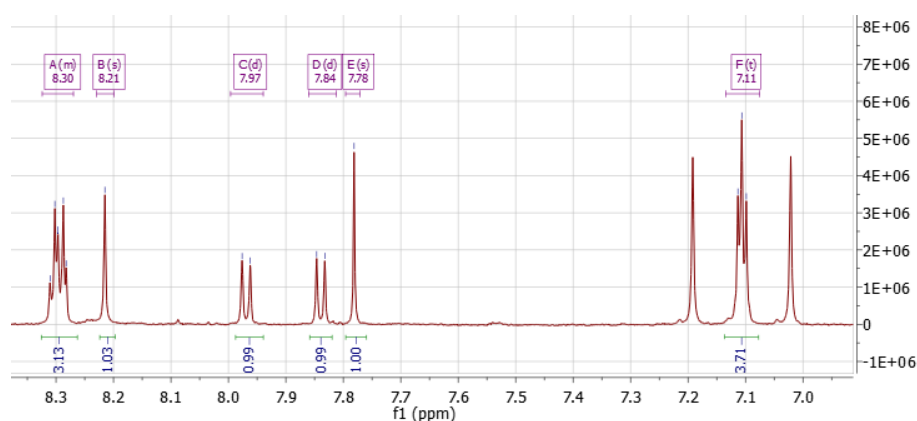


Figura 34: Espectro de protão da 10-carboxipirano-4'-hidroxiflavílio.

5.3.4 Síntese do 10-(4-aminofenil)pirano-4'-hidroxiflavílio (9)

O pigmento **9** foi sintetizado através da reação de anelação entre o 4',5-dihidroxiflavílio **3** e o ácido 3-(4-aminofenil)-2-propenóico dissolvidos numa solução hidroalcoólica. A reação foi monitorizada por HPLC-DAD, tendo sido detetada a formação

de produto ($t_{\text{retenção}} = 43$ min) após 2 horas do início da reação, confirmado por LC-MS ($[M^+]$ $m/z = 354$). Ao fim de 23 horas, observou-se que o pico referente ao reagente de partida, 4', 5-dihidroxi-flavílio era praticamente inexistente (figura 35), tendo-se assim terminado a reação.

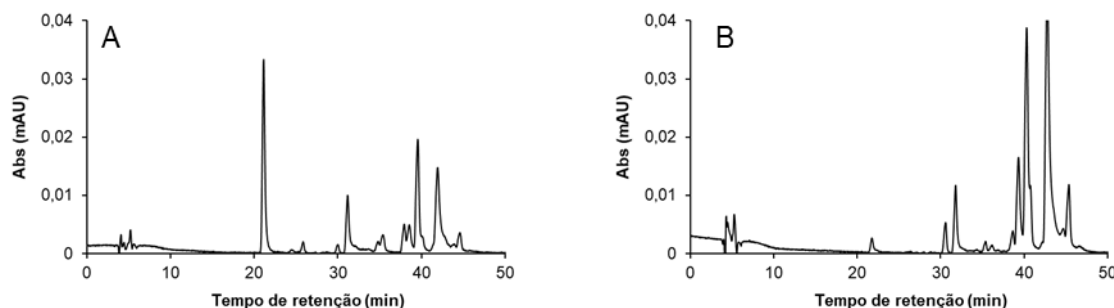


Figura 35: Cromatograma de HPLC-DAD da reação de síntese do 10-(4-aminobenzene)pirano-4'-hidroxiflavílio após 2 horas (A) e após 23 horas (B).

Após a evaporação do solvente orgânico, foi realizada uma extração líquido-líquido com acetato de etilo que eliminou maioritariamente as impurezas a $\lambda_{\text{max}} = 280$ nm mas também outras impurezas, na fase orgânica. Posteriormente foi realizada uma purificação por coluna flash na qual a primeira fração recolhida (10-15% de MeOH/H₂O) correspondia ao reagente de partida. A fração contendo o piranoflavílio, de cor roxa, foi recolhida com 40-45% de metanol acidificado com HCl, e a sua pureza foi determinada por HPLC-DAD e LC-MS.

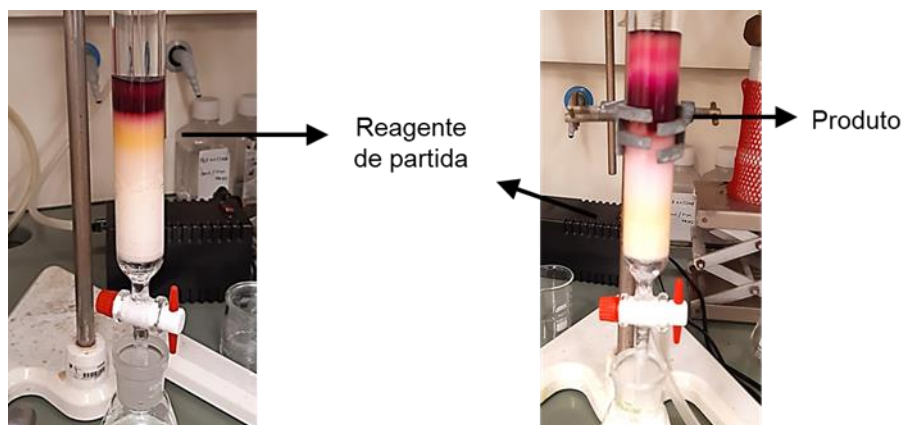


Figura 36: Isolamento do pigmento 10-(4-aminobenzene)pirano-4'-hidroxiflavílio (9) por cromatografia flash com sílica de fase reversa C18.

O rendimento da reação foi calculado após o isolamento e liofilização do pigmento, tendo sido obtido um rendimento de 12 %.

5.3.4.1 Caraterização estrutural

Após o processo de isolamento e purificação, o pigmento (figura 38) foi caraterizado totalmente por LC-MS e por RMN ^1H e ^{13}C , tabela 5.

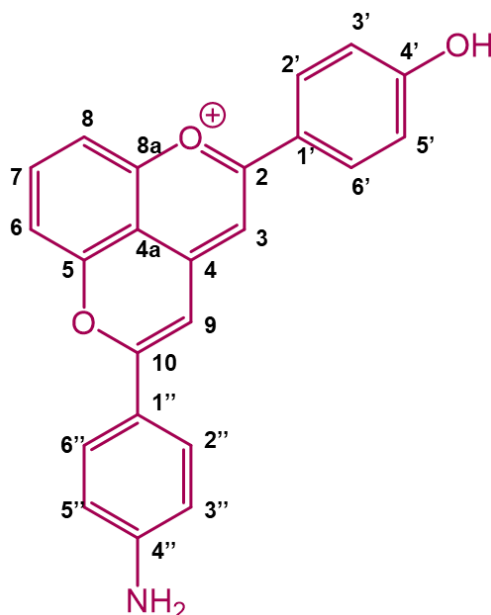


Figura 37: Estrutura química do 10-(4-aminofenil)pirano-4'-hidroxiflavílio.

Tal como nos outros dois pigmentos, também nesta análise de ^1H (figura 39) também é notório o desaparecimento do sinal de H4, comprovando a formação de uma nova ligação, o anel pirânico. Observamos também a presença de dois singuletos atribuídos ao H3 e H9 com desvios químicos diferentes, comprovando que estes estão em diferentes ambientes químicos. A presença de diferentes dupletos atribuídos aos prótons do anel B e aos do anel com o grupo NH_2 comprovam a presença de um grupo diferente no anel. No entanto, não foi possível detetar os hidrogénios do NH_2 por ser um grupo ionizável.

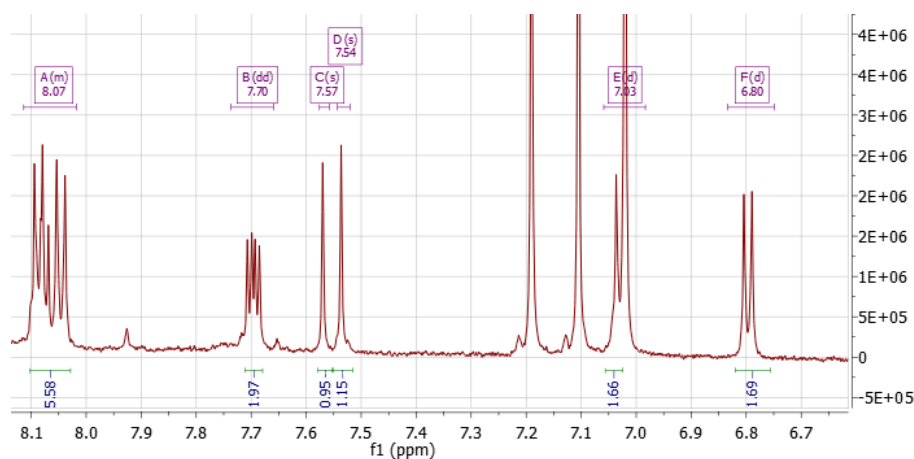


Figura 38: Espectro de protão do 10-(4-aminofenil)pirano-4'-hidroxiflavílio.

5.4 Determinação da constante de acidez, pK_a

As constantes termodinâmicas de acidez foram determinadas através de titulações espectrofotométricas. A titulação consistiu em adições sucessivas de uma solução de NaOH 1M a uma solução de pigmento 25% EtOH de modo a obter uma gama de valores de pH entre 1 e 12. A cada adição de solução de NaOH 1M, a mistura foi agitada, e de seguida foi traçado o respetivo espectro UV-Vis e no final mediu-se o pH. Iniciamos a determinação representando a evolução dos espectros de UV-Vis das soluções de pigmento em diferentes valores de pH, figura 21 A e B. Tal como descrito para piranoantocianinas análogas, não se observou nenhuma evidência das reações de hidratação típicas de flavílios e antocianinas, com o aumento de pH, [121] nomeadamente não foi obtido nenhum aumento espectral a 280 nm, característica da forma hemiacetal.

5.4.1 2,10-bis-(4',4''-hidroxifenil)piranobenzopirílio (4)

Ao medir os espectros UV-Vis com o aumento do pH observou-se a presença de pontos isobésticos (como o assinalado com uma seta na figura 40) que correspondem ao equilíbrio entre as espécies AH^+ e A e entre as espécies A e A^- . Para a obtenção dos valores de pK_a começou-se por representar um gráfico das frações molares e dos valores de absorbância experimentais em três comprimentos de onda, em função do pH, com o *fitting* adequado. Como a molécula tem um eixo de simetria, os dois valores de pK_a correspondem à desprotonação dos grupos OH^- na posição 4' e 4''. Este pigmento quando está na forma de catião flavílio (AH^+) apresenta uma cor amarela com $\lambda_{max} = 495$ nm e na forma de base quinoidal (A) e de base aniónica (A^-) apresenta uma cor roxa com $\lambda_{max} = 563$ nm e $\lambda_{max} = 565$ nm, respetivamente, figura 24.

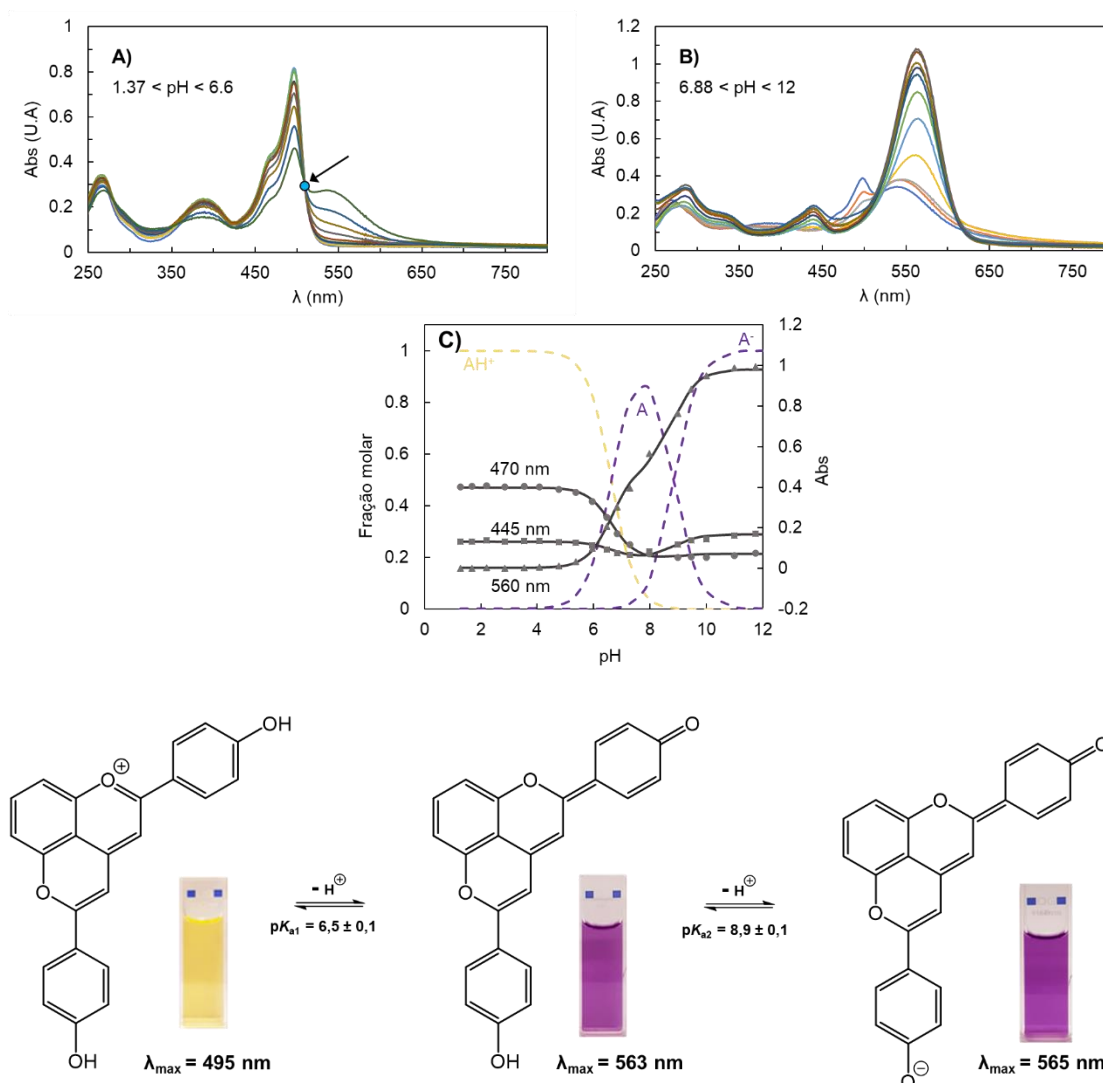


Figura 39: Variações espectroscópicas em função do pH do pigmento 2,10-bis-(4', 4'-hidroxifenil)piranobenzopirílio no intervalo de $1 < \text{pH} < 6,85$ (A), $6,85 < \text{pH} < 12$ (B), ajuste alcançado para $\text{pK}_{a1} = 6,5 \pm 0,1$ e $\text{pK}_{a2} = 8,9 \pm 0,1$ (C) e equilíbrios químicos do pigmento em água/etanol (75:25) (v/v).

5.4.2 10-carboxipirano-4'-hidroxiflavílio (7)

Inicialmente diversos espectros UV-Vis, com o aumento do pH, foram representados na figura 40. De seguida foi traçado um gráfico das frações molares e dos valores de absorbância experimentais em três comprimentos de onda, em função do pH, com o fitting adequado, para a obtenção dos valores de pKa. Tal como era de esperar, a desprotonação do grupo carboxílico dá origem a uma espécie zwitteriônica (AH⁺), de cor amarela ($\lambda_{\max} = 440 \text{ nm}$) tal como o catião flavílio, com um valor de pK_a muito próximo de 1. O segundo valor de pK_a é correspondente à desprotonação do grupo hidroxilo na posição 4', dando origem à espécie base quinoidal (A⁻) de cor roxa ($\lambda_{\max} = 533 \text{ nm}$), figura 26.

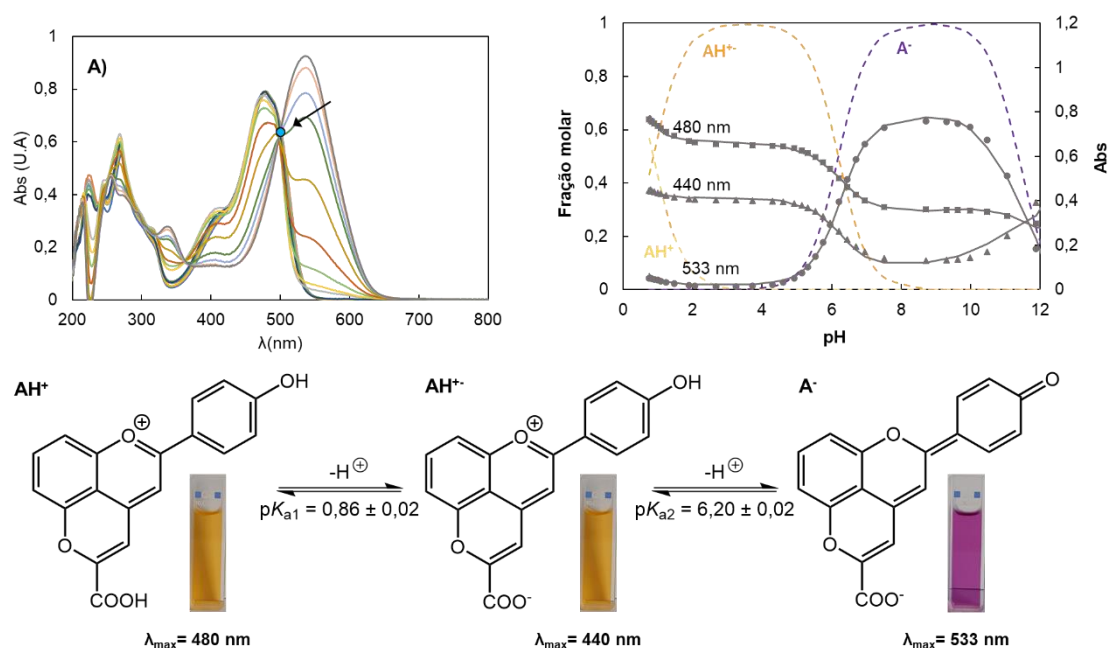


Figura 40: Variações espectroscópicas em função do pH do (A), ajuste alcançado para $pK_{a1} = 0,86 \pm 0,2$ e $pK_{a2} = 6,20 \pm 0,2$ (B) e equilíbrios químicos do pigmento em água/etanol (75:25) (v/v) (C).

5.4.3 10-(4''-aminofenil)pirano-4'-hidroxiflavílio (9)

Começou-se por traçar diversos espectros UV-Vis, com o aumento do pH, foram representados na figura 41. De seguida foi traçado um gráfico das frações molares e dos valores de absorbância experimentais em três comprimentos de onda, em função do pH, com o fitting adequado, para a obtenção dos valores de pKa. Na presença de uma elevada concentração de numa solução de água / etanol 75:25 (v / v), estamos perante uma espécie dicatiónica (AH₂²⁺). O primeiro passo é compatível com a desprotonação da mesma (AH₂²⁺), originando o catião flavílio AH⁺ (λ_{max} = 515 nm) O ajuste aplicado nos dados obtidos não permitiu determinar que o valor do primeiro (pK_{a1}), no entanto, é possível afirmar que é menor que 1. A segunda constante de equilíbrio foi estabelecida entre o catião flavílio, AH⁺ (não protonado na amina) e a base quinóidal, A (λ_{max} = 565 nm).

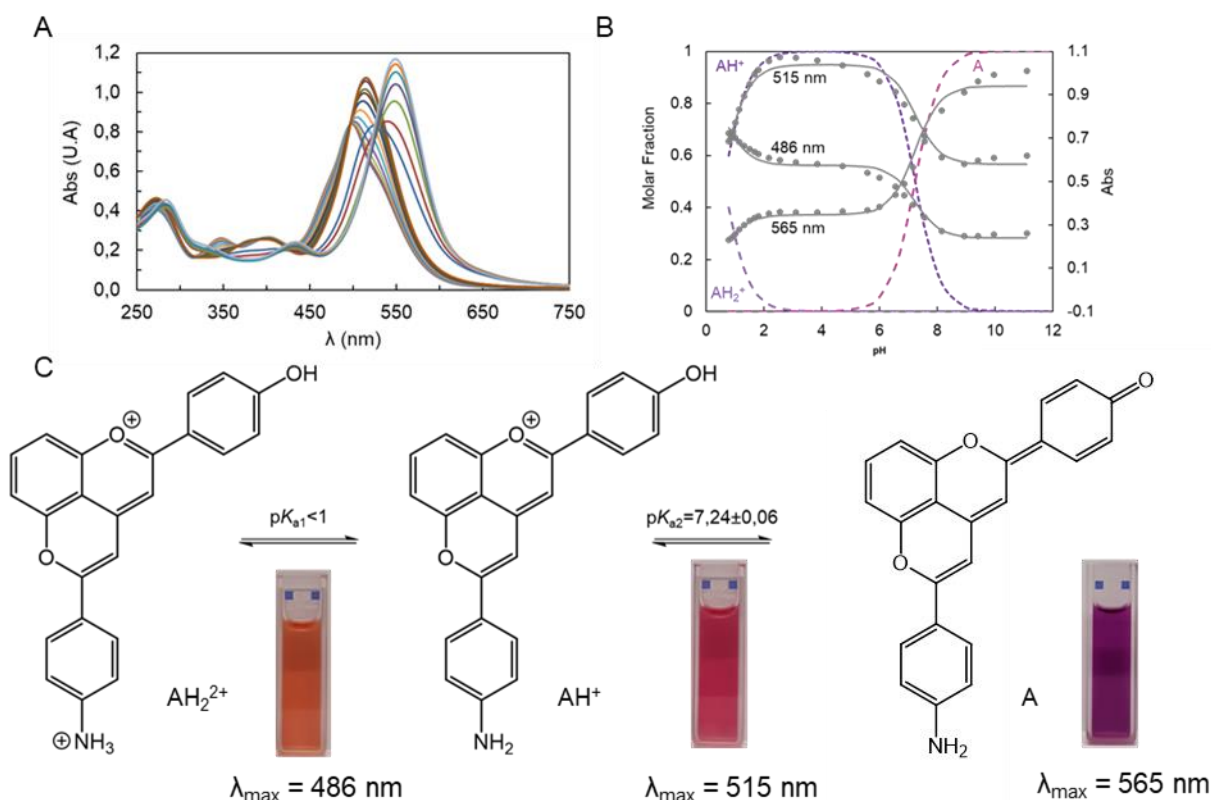


Figura 41: Variações espectroscópicas em função do pH do (A), ajuste alcançado para $pK_{a1} < 1$ e $pK_{a2} = 7,24 \pm 0,06$ (B) e equilíbrios químicos do pigmento em água/etanol (75:25) (v/v) (C).

Os estudos dos equilíbrios ácido-base dos três pigmentos sintetizados foram realizados através de titulações seguidas por espectroscopia de UV-Vis, obtendo os resultados indicados na tabela 5.

Tabela 4: Valores de pK_a obtidos para os pigmentos 4, 7 e 9.

Pigmento	4	7	9
pK_{a1}	$6,5 \pm 0,1$	$0,86 \pm 0,02$	<1
pK_{a2}	$8,9 \pm 0,1$	$6,20 \pm 0,02$	$7,24 \pm 0,06$

De uma forma geral, substituintes no anel D como grupos metilo têm a capacidade de uma maior estabilização do catião flavílio (AH⁺) comparativamente a grupos amina ou ácidos carboxílicos ($pK_{a1} < 1$). Esta característica pode ser explicada pelo facto de o grupo metilo ser um dador de eletrões essencialmente por efeitos indutivos, refletindo-se num valor de pK_a superior[116].

Em relação ao pigmento 4, em que o grupo substituinte do anel D é um fenol, observou-se apenas uma pequena diminuição do valor de pK_{a1} relativamente ao substituinte metilo, tal como era espectável.

Para os pigmentos **7** e **9**, a primeira desprotonação ocorre no substituinte ligado ao anel D em condições muito ácidas ($\text{pH} < 1$). Para o pigmento **9**, o substituinte fenilamina parece estabilizar a base quinoidal neutra (A), o que pode explicar o valor do $\text{pK}_{\text{a}1}$ ser muito baixo e um aumento do $\text{pK}_{\text{a}2}$, comparativamente aos outros pigmentos. Por outro lado, para o pigmento **7** a presença do grupo carboxílico (atraidor de eletrões) ligado diretamente ao anel D dá origem à espécie zwitteriónica (AH^+) na primeira desprotonação, fazendo com que o $\text{pK}_{\text{a}2}$ seja deslocado para um menor valor de pH comparativamente com os pigmentos **4** e **9**.

No estudo dos três pigmentos foi possível observar que todos eles apresentavam uma mudança de cor drástica dentro de um intervalo de pH característico da deterioração de vários produtos alimentícios embalados, como carne ou peixe ($\text{pH } 5,5\text{-}7,5$). A presença de diferentes grupos funcionais nestas moléculas permite a obtenção de diferentes variações cromáticas dentro da janela de pH que se pretende monitorizar. Deste modo, estes pigmentos demonstram ter um elevado potencial para a deteção da deterioração alimentar em tempo real.

Parte B – Estudo da Imobilização de Pigmentos em Filmes de Acetato de Celulose

6. Material e Métodos

6.1 Materiais

Tabela 5: Reagentes e marcas correspondentes.

Reagentes	Marca
Acetato de Celulose	Sigma-Aldrich
Quitosano	Primex
Alginato	Sigma-Aldrich
PAH	Sigma-Aldrich
PSS	Sigma-Aldrich

6.2 Preparação do substrato

O substrato foi obtido através da dissolução de acetato de celulose em acetona, com concentrações de 6 a 15 % (m/m), sob agitação magnética à temperatura ambiente, durante 2 horas. Após dissolução completa, as soluções foram deixadas em repouso durante 30 min para depois se proceder à deposição para a formação do filme. A deposição da solução de acetato de celulose, baseada na técnica de *casting*, foi realizada sob a forma de zigue-zague, recorrendo a uma micropipeta, numa placa de petri de plástico (polipropileno) com um diâmetro de 5 cm. Em seguida as placas foram colocadas numa estufa a uma temperatura de 37 °C até evaporação completa do solvente permitindo o destacamento dos filmes.

6.3 Funcionalização dos filmes

Os filmes foram funcionalizados, após o recorte das bordas dos filmes, através de imersão em soluções de KOH com concentrações entre 0,1 e 1 M, durante diferentes intervalos de tempo e posteriores lavagens com água desionizada. A água em excesso foi removida e os filmes foram colocados novamente numa estufa a uma temperatura de 37 °C até secagem completa.

6.4 Layer-by-layer (LbL)

As soluções de polímeros sintéticos (PAH e PSS) foram preparadas a partir da dissolução em 0,5 M NaCl em água Mili Q, com uma concentração de 2 mg/mL. As soluções de quitosano foram preparadas pela dissolução numa solução de 0,5 % (v/v) de ácido acético / 0,1 mg/mL NaCl em água Milli Q e o pH foi ajustado para 5. O alginato foi dissolvido em 0,1 mg/mL NaCl /água Mili Q e o pH da solução foi ajustado para um 6.

O processo de deposição dos polieletrólitos foi executado pela técnica de LbL que consistiu na imersão do substrato de acetato de celulose com as dimensões de 2×2 cm nas diferentes soluções. A construção dos filmes por LbL consistiu no seguinte design experimental: soluções poliméricas catiónicas, lavagem (água MilliQ), soluções poliméricas aniónicas, lavagem (água MilliQ). Este procedimento foi realizado à temperatura ambiente durante um determinado intervalo de tempo e número de ciclos. Entre as diferentes deposições, os filmes foram secos com papel absorvente de modo a retirar o excesso de solução.

6.5 FTIR

Os espectros de absorção na região do infravermelho das amostras foram obtidos a partir de um espectrofotómetro da marca PerkinElmer, modelo Spectrum Two, na região compreendida entre $4.000 - 500 \text{ cm}^{-1}$, com 4 ou 20 scans, utilizando a técnica de refletância atenuada (ATR) com transformada de Fourier.

6.6 TG-DSC

A análise térmica TG-DSC das amostras foi realizada no equipamento da marca Hitachi; modelo STA7200RV. Foi utilizado um cadinho de alumínio, com um aquecimento de 25 a $500 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a $10 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ em atmosfera de N_2 a um fluxo de $200 \text{ mL}/\text{min}$.

6.7 Swelling

Para a realização dos estudos de *swelling*, os filmes foram secos numa estufa a $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, seguidos de arrefecimento, e posteriormente, foram realizadas diversas pesagens por forma a obter o peso inicial da experiência. O critério usado foi a realização de 3 pesagens consecutivas em que o peso do filme não variasse mais do que 1 mg (o erro da balança utilizada). Após obtenção da massa inicial, os filmes foram mergulhados em 10 mL de água miliQ durante tempos previamente definidos. Após imersão, o filme foi seco com papel absorvente e pesado, de modo a monitorizar o processo de *swelling*, até atingir valor máximo de inchamento.

6.8 Potencial zeta

O potencial zeta, ζ , das soluções dos polieletrólitos antes e após deposição no filme foi medido a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ com um Zeta sizer Nano ZS, ZN 3500 com um laser He-Ne de 4 mW (633 nm) e células descartáveis DTS 1060C. A dispersão foi pipetada com uma pipeta de Pasteur para dentro da célula até ao limite indicado e foi feita a medição. Posteriormente, a célula foi lavada com água Milli-Q três vezes antes de proceder à próxima medição.

6.9 Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM) / EDS

A caracterização da morfologia e composição dos filmes após deposição polimérica por LbL foi realizada através um Microscópio Eletrónico de Varrimento ambiental, de alta resolução (Schottky), com Microanálise por Raios X e Análise de Padrões de Difracção de Electrões Rectrofundidos, FEI Quanta 400FEG ESEM / EDAX Genesis X4M.

6.10 Sonda de Refletância

A imobilização dos pigmentos nos filmes de acetato de celulose foi monitorizada num espectrofotómetro de UV-Vis (Sarspec) acoplado com uma sonda de refletância RP-UV-400-030 e uma fonte de luz LS-DWHP registando a sua absorbância numa gama de comprimentos de onda entre 250 e 800 nm. A medição de refletância dos filmes em estudo foi realizada num ângulo de 45°.

7. Resultados e Discussão

A técnica utilizada para a construção dos filmes e imobilização dos pigmentos foi por LbL. Para o desenvolvimento desta técnica, foi necessário a utilização de um substrato (acetato de celulose), que neste caso não foi removido após a formação das multicamadas. O desenvolvimento de todo o processo para o objetivo final de imobilização do pigmento foi dividido em quatro partes:

- 1) Desenvolvimento/estudo do substrato
- 2) Otimização das condições de funcionalização do substrato
- 3) Construção de camadas de polieletrólitos (apenas com polímeros) por LbL
- 4) Construção de camadas por LbL com polímeros e pigmento

Na etapa referente à construção de camadas de polieletrólito foi, inicialmente, estudado um sistema de biopolímeros usando quitosano e alginato. Após a realização de algumas experiências, foram aplicadas as mesmas técnicas e condições para a construção das multicamadas, mas com polímeros sintéticos, PAH e PSS. Esta abordagem surgiu como forma comparativa e por se tratar de um sistema já estudado por um grupo de investigação incluído no projeto.

7.1 Substrato

O acetato de celulose foi o material escolhido para o substrato por ser biocompatível, não tóxico, e bastante hidrofóbico, que é uma cara

terística importante para uma embalagem alimentar resistente. O primeiro passo passou pela otimização do substrato através de testes com diferentes percentagens (% m/m) e massas de acetato de celulose.

Inicialmente foram preparadas soluções com 6 a 15 % m/m de acetato de celulose em acetona. Diferentes massas destas soluções, nomeadamente entre 0,7 e 3 g, foram depositadas em placas de petri de polipropileno, pelo método de *casting*. O método de deposição mais eficaz foi em zigue-zague com recurso a uma micropipeta.

Após a deposição, a evaporação do solvente e secagem do filme foi feita à temperatura ambiente. No entanto, os filmes obtidos através deste método apresentaram uma cor muito esbranquiçada. De seguida, testou-se uma secagem mais rápida numa estufa a 37 °C, que demonstrou ser mais vantajosa pois os filmes obtidos ficaram completamente translúcidos, tal como era pretendido.

Ao observar e manusear os diversos filmes foram escolhidas quatro composições: a) 2 g de AC a 7 %; b) 2 g de AC a 8%; c) 1 g de AC a 9%; d) 2 g de AC a 9%, para avançar para a fase de funcionalização. Esta escolha foi baseada no aspeto visual e, principalmente, na maleabilidade apresentada pelos filmes.

7.2 Funcionalização dos filmes

A funcionalização de filmes de acetato de celulose foi realizada através da imersão numa solução básica, KOH, como descrito na literatura[122].

A funcionalização consistiu na remoção de grupos acetilo (desacetilação) presentes na superfície dos filmes de acetato de celulose. Consequentemente, os filmes adquiriram carga negativa à superfície, permitindo interações electroestáticas com os polieletrólitos positivos. Esta modificação química foi confirmada por análise de FTIR-ATR que permitiu identificar os grupos funcionais presentes na superfície.

Após diversos testes de funcionalização, foram escolhidas apenas duas composições de filmes: 1 e 2 g de 9% de acetato de celulose. A escolha baseou-se na observação de uma melhor resistência física e maleabilidade dos filmes após a funcionalização. Posto isto, apenas serão apresentados os resultados referentes aos filmes seleccionados.

As condições mais descritas em literatura são com soluções de 0,1 M de KOH com tempos de imersão de 40 a 60 min seguidas de três lavagens de 10 min, no entanto com o substrato que foi produzido o efeito não foi idêntico[122].

Através da caracterização por FTIR-ATR encontrada na literatura REF os filmes de acetato de celulose demonstraram picos característicos relativos a C=O, C-O e C-CH₃ a 1749, 1251 e 1376 cm⁻¹, respetivamente. No caso de filmes de acetato de celulose após funcionalização, está descrito o aparecimento de um pico largo por volta dos 3244 cm⁻¹, que comprova a presença de grupos hidroxilo, e também a diminuição ou mesmo supressão do pico por volta dos 1749 cm⁻¹, relativo ao grupo C=O[123].

Inicialmente testou-se uma funcionalização com uma solução de 0,1 M KOH, com tempos de imersão de 2, 3 e 3,5 horas seguidas de três lavagens de 10 min em imersão em água desionizada. Na funcionalização de 2 e 3 horas foi notória a diminuição da banda do grupo C=O e o aparecimento da banda largo dos grupos hidroxilos, sendo que comportamento revelados pelos filmes de 9% de 1 e 2 g foi idêntico. No entanto, a supressão total do pico a 1749 cm⁻¹ obteve-se apenas com um tempo de imersão de 3,5 horas (figura 42).

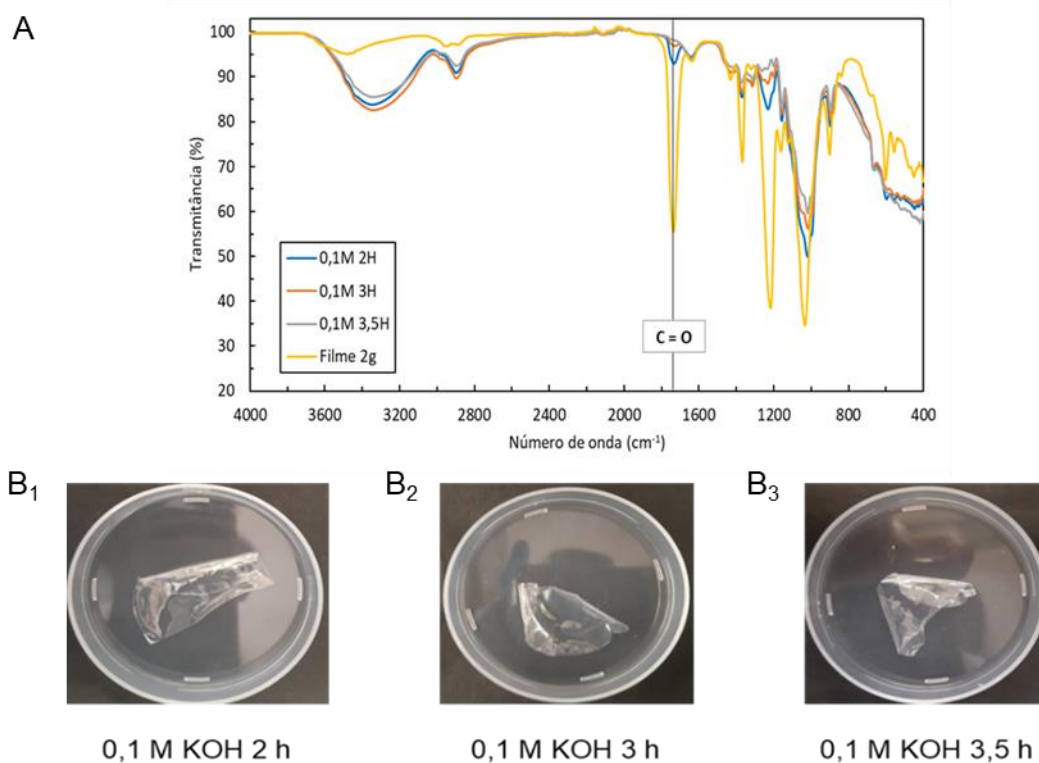


Figura 42: A) Espectro de FTIR do substrato acetato de celulose (9% 2g) após funcionalização com uma solução de 0,1M KOH; B) imagens do substrato após funcionalização com B1) 0,1M KOH 2h, B2) 0,1M KOH 3h e B3) 0,1M KOH 3,5h.

Por forma a otimizar este processo, foram também testadas concentrações mais elevadas de KOH (0,2 M) com tempos de imersão de 0,5, 1, 2 e 3 horas. Após a funcionalização durante 30 min já foi possível observar a diminuição da banda do grupo carbonilo e o aparecimento da banda do grupo hidroxilo. No entanto o desaparecimento total do pico do grupo C=O só foi alcançado após 2 horas de imersão na solução de 0,2 M KOH. Contudo, com o tempo de funcionalização de 1 hora, a área do pico relativo ao grupo hidroxilo já era bastante reduzida. Assim, foi testado um tempo de 1.15h que revelou um espectro de FTIR muito semelhante ao de 2 horas, mas em que o filme apresentava um melhor aspeto visual (figura 43).

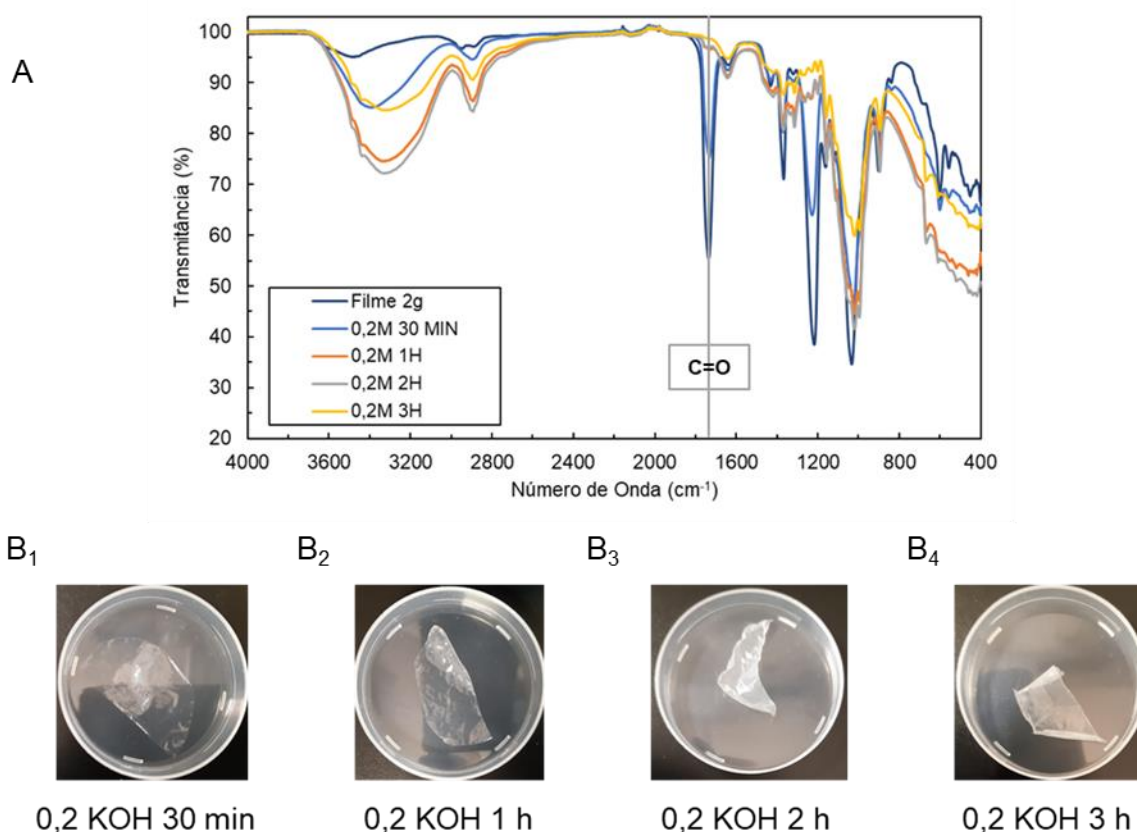


Figura 43: A) Espectro de FTIR do substrato (9% 2g) após funcionalização com uma solução de 0,2M KOH; B) imagens do substrato após funcionalização com B₁) 0,2M KOH 30 min, B₂) 0,2M KOH 1h, B₃) 0,2M KOH 2h e B₄) 0,2M KOH 3h.

De um modo comparativo, foram ainda testadas duas concentrações de KOH mais elevadas: 0,5 M e 1 M. Os testes realizados com soluções de KOH 1 M não demonstraram qualquer viabilidade pois levaram à destruição do filme. Por outro lado, a funcionalização com a solução de KOH 0,5 M revelou resultados interessante pois a funcionalização completa da superfície foi alcançada após 30 min. No entanto, o filme apresentava-se mais quebradiço e esbranquiçado e a solução em que tinha sido imerso apresentava bastantes resíduos (figura 44).

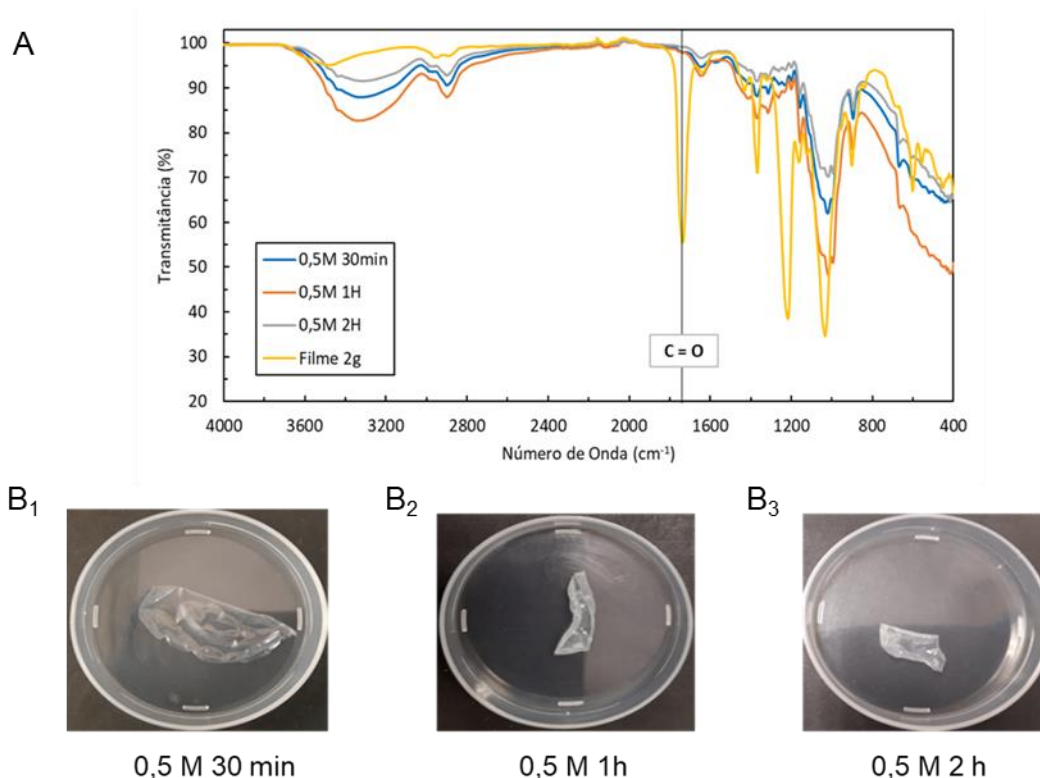


Figura 44: A) Espectro de FTIR do substrato(9% 2g) após funcionalização com uma solução de 0,5M KOH; B) imagens dos filmes após funcionalização com B₁) 0,5M KOH 30 min, B₂) 0,5M KOH 1h e B₃) 0,5M KOH 2h.

Em suma, as melhores condições para a funcionalização testadas foram: KOH 0,1 M durante 3.30h ou KOH 0,2 M durante 1.15h. O aspeto visual e também a resistência do filme após a exposição a ambas as concentrações são muito idênticas e por isso as condições escolhidas para a funcionalização dos filmes foi a imersão numa solução de KOH 0,2 M durante 1.15h, pelo facto de ser realizada em menos tempo, economizando o tempo experimental.

7.3 Layer-by-layer (LbL)

A técnica de LbL foi utilizada para a deposição de polieletrólitos com cargas opostas no substrato de acetato de celulose previamente funcionalizado. Esta deposição foi realizada com diferentes tempos de imersão nas soluções de polieletrólitos e número de ciclos.

Numa primeira abordagem apenas foram utilizados polieletrólitos naturais, o quitosano e o alginato como polieletrólitos catiónico e aniónico, respetivamente. Começaram-se por testar as condições já descritas na literatura[124], com tempos de imersão nas soluções de polieletrólitos (2 mg/mL) de 20 min e três lavagens de 2 min, durante 5 ciclos, como esquematizado na figura 45.

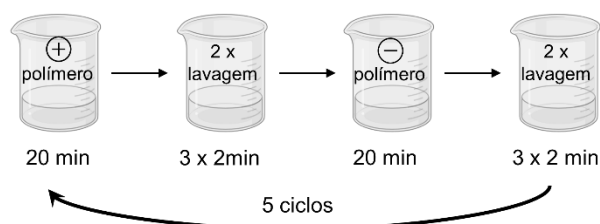


Figura 45: Esquema do procedimento experimental de LbL.

Após os 5 ciclos de deposição realizou-se uma análise de FTIR-ATR com o objetivo de conseguir observar picos característicos dos polímeros. Para tal foi necessário analisar também os biopolímeros individualmente.

Ao observar os espectros de FTIR após a deposição dos biopolímeros, representados na figura 46, não é notório o aparecimento de bandas características. Este resultado pode ser explicado pelo fato de a estrutura do substrato e dos biopolímeros ser bastante semelhante visto que, o único grupo funcional que os distingue é o grupo $-NH_2$ presente no quitosano. Para além desta razão, também o facto de a massa de polímeros presente nas camadas formadas ser de ordem de grandeza muito inferior relativamente ao substrato, dificultando a deteção de novos grupos funcionais. Por esta razão, esta técnica não demonstrou ter sensibilidade suficiente para ser possível a deteção dos biopolímeros na superfície do filme de acetato de celulose.

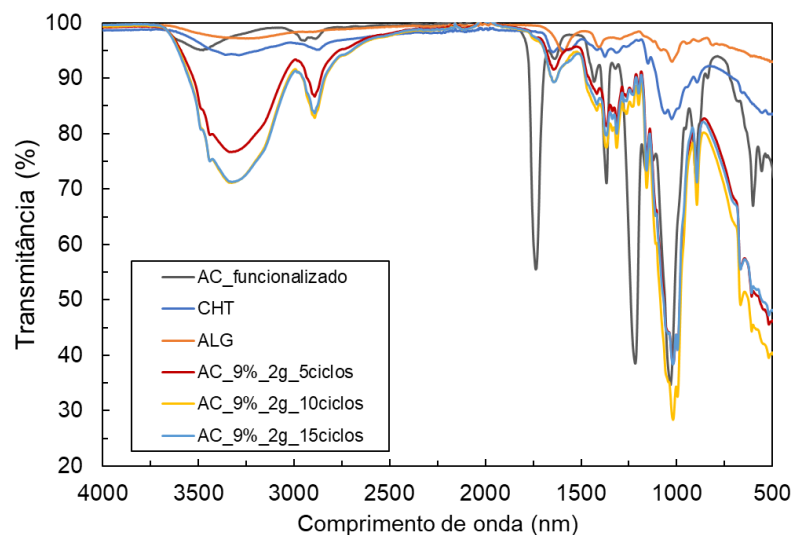


Figura 46: Espectro de FTIR dos filmes após LbL e dos polímeros utilizados.

7.4 TG-DSC

Após alguma pesquisa, optou-se por recorrer à técnica de análise térmica TG-DSC com o objetivo de comprovar a presença de biopolímeros (CHT e ALG) depositados no substrato acetato de celulose (AC). Em primeiro lugar procedeu-se à análise de TG-DSC dos componentes individualmente e posteriormente e, de um modo comparativo, realizaram-se deposições com os tempos de imersão de 20 min (5 ciclos) e 1 hora (2 ciclos) com soluções de biopolímeros de concentração 1 e 2 mg/mL.

Na curva TG-DSC do quitosano (figura 47) observamos perda de massa em 2 etapas consecutivas: a primeira etapa de perda de massa ocorre entre 30 e 100 °C, característica da perda de água superficial do composto[125], com um pico endotérmico a 60 °C; a segunda etapa ocorre entre 270 e 340 °C, com um pico exotérmico aos 290 °C, que corresponde ao início do processo de pirólise, mais concretamente, à desidratação, despolimerização e decomposição dos grupos acetilados e não acetilados do polímero[126]. Para observarmos o processo de decomposição total deste biopolímero era necessário fazer esta análise térmica até atingir os 1000 °C, como já descrito em literatura[127].

Na curva TG-DSC do alginato (figura 47) observamos um comportamento bastante idêntico ao do quitosano, sendo que apresenta duas etapas de perda de massa: a primeira entre 30 e 100 °C, característica da perda de água superficial do composto[128], com um pico endotérmico a 60 °C; a segunda perda de massa ocorre entre 200 e 350 °C, com um pico exotérmico aos 240 °C, que corresponde ao início do processo de pirólise do biopolímero. No entanto, tal como no quitosano, era necessário fazer esta análise térmica até atingir os 1000 °C para conseguirmos observar a decomposição total do alginato[129].

A análise térmica do acetato de celulose (figura 47) revela características semelhantes às dos polímeros acima referidos, apresentando duas etapas de perda de massa: a primeira entre 30 e 100 °C, característica da perda de água superficial do composto; a segunda perda de massa ocorre entre 150 e 400 °C, com um pico endotérmico aos 350 °C, atribuído à quebra de ligações glicosídicas e despolimerização da celulose[130].

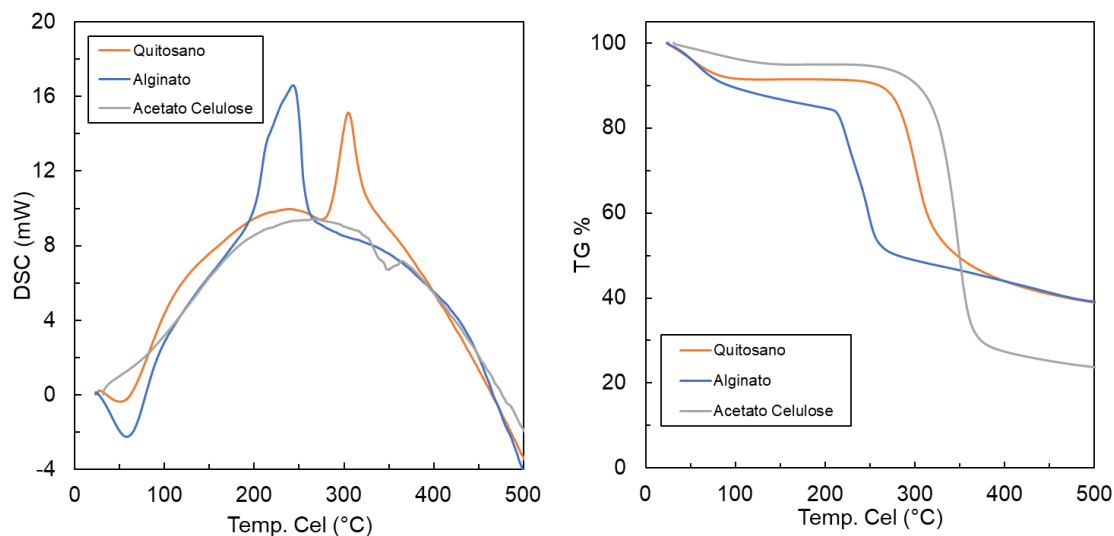


Figura 47: Curva TG-DSC do Quitosano, Alginato e Acetato de Celulose.

7.4.1 Filmes CHT / ALG

No sistema de polieletrólitos naturais foram estudadas diferentes condições (tempo de imersão, ciclos, concentração das soluções):

- 20 min 1 mg/mL 5 ciclos
- 20 min 2 mg/mL 5 ciclos
- 60 min 1 mg/mL 2 ciclos
- 60 min 2 mg/mL 2 ciclos

Ao observar os gráficos obtidos (figura 48) para os filmes que foram obtidos pela técnica de LbL, conseguiram-se identificar duas etapas de perda de massa, tal como nos biopolímeros. A primeira etapa, correspondente à perda da água superficial do filme, é bastante ténue comparativamente aos polímeros, sendo praticamente impercetível no gráfico de DSC. Por outro lado, a segunda etapa, relativa à decomposição do material, apresenta algumas diferenças comparativamente ao substrato, uma vez que se verifica a presença de um patamar até uma temperatura mais elevada antes do decaimento abrupto na perda de massa (gráfico de TG, figura 48). Este resultado permite afirmar que a presença de biopolímeros na superfície do filme aumentam a estabilidade térmica do mesmo. Este resultado é corroborado pelos gráficos de DSC que demonstram que, na presença de biopolímeros, a decomposição da celulose é mais endotérmica, podendo ser explicado pela presença de algum biopolímero na superfície “protegendo” o filme, o que dificultaria a decomposição do substrato. Por outro lado, não é notória qualquer diferença na temperatura de decomposição máxima do filme, que tendo em conta que esta temperatura é diferente nos polímeros e substrato não era o expectável. No entanto, este

resultado pode ser explicado pela quantidade vestigial de polímero presente comparativamente ao substrato e desta forma essa diferença não foi observada.

Comparando as concentrações das soluções de polieletrólitos utilizadas, foram observadas diferenças nos gráficos de TG. A perda de massa do filme com tempo de imersão de 20 min (5 ciclos) em soluções de 2 mg/mL de polieletrólito é de ~65%, e não 75% como no substrato original e na deposição realizada com soluções de 1 mg/mL. Por outro lado, com um tempo de imersão de 1 hora (2 ciclos), os filmes apresentaram uma perda de massa da ordem dos 80% em soluções de 2 mg/mL e de cerca de 85% em soluções de 1 mg/mL. Isto revela que os filmes obtidos após a deposição em soluções de biopolímeros com concentração mais elevada apresentam um valor de perda de massa inferior em relação a concentrações mais baixas, demonstrando uma possível presença dos mesmos em maior quantidade. No entanto, os filmes obtidos após deposições de 1h de polieletrólitos demonstraram uma perda de massa inferior ao filme de acetato de celulose apenas funcionalizado. Este resultado não era expectável visto que, a presença de biopolímeros, que não se decompõem totalmente no intervalo de temperatura estudado, deveria diminuir a perda de massa do filme comparativamente ao filme sem polímeros. Uma explicação para este resultado pode ser a presença de algumas impurezas nos filmes apenas funcionalizados, não permitindo a degradação térmica correta do mesmo, uma vez que em literatura a degradação deste apresenta uma perda de massa superior à observada nesta análise[130].

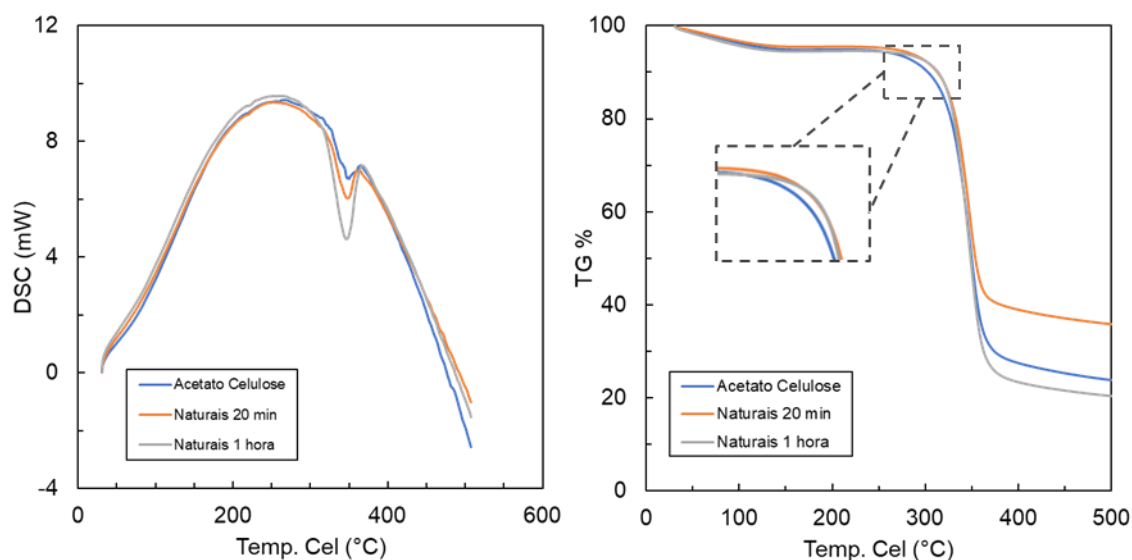


Figura 48: Gráficos de TG-DSC para acetato de celulose e filmes com tempos de deposição de 20 min e 1 hora.

7.4.2 Filmes PAH/PSS

O estudo do sistema de deposição dos polieletrólitos sintéticos foi realizado utilizando as mesmas condições de LbL utilizadas nos polieletrólitos naturais. No entanto, como esta metodologia foi abordada numa fase mais avançada no desenvolvimento experimental deste trabalho, apenas foi testada a concentração de 2 mg/mL com base nos resultados obtidos no estudo dos biopolímeros.

A análise térmica do PAH (figura 49) apresenta três zonas distintas de perda de massa: a primeira até aos 150 °C característica da perda de moléculas de água superficiais do composto; a segunda etapa de 150 a 400 °C, com um pico endotérmico que é atribuído possivelmente à fragmentação das cadeias laterais de amina; por fim, a terceira etapa, também endotérmica, de 400 a 500 °C atribuído à cisão da estrutura do polímero[131].

Ao observar a análise térmica do PSS (figura 49) é possível identificar três etapas de degradação: a primeira perda de massa até 150 °C pode ser explicada como resultado da libertação de moléculas de água à superfície; sendo um pico endotérmico observado a partir de DSC. Na segunda etapa, identificada por um pico endotérmico, de 400 a 480 °C pode ser atribuído à decomposição de segmentos de poliestireno. No entanto, este polímero encontrava-se sob a forma de um óleo o que dificultou a análise, sendo que seria necessária uma secagem prévia por forma a alcançar uma degradação térmica mais fidedigna. Assim, é possível afirmar que este polímero não sofre uma degradação completa neste intervalo de temperatura. Esta afirmação é suportada por dados encontrados na literatura que demonstram a degradação dos grupos sulfonato a ~543 °C (perde de massa ~68 %), mas sem alcançar a degradação térmica total[132].

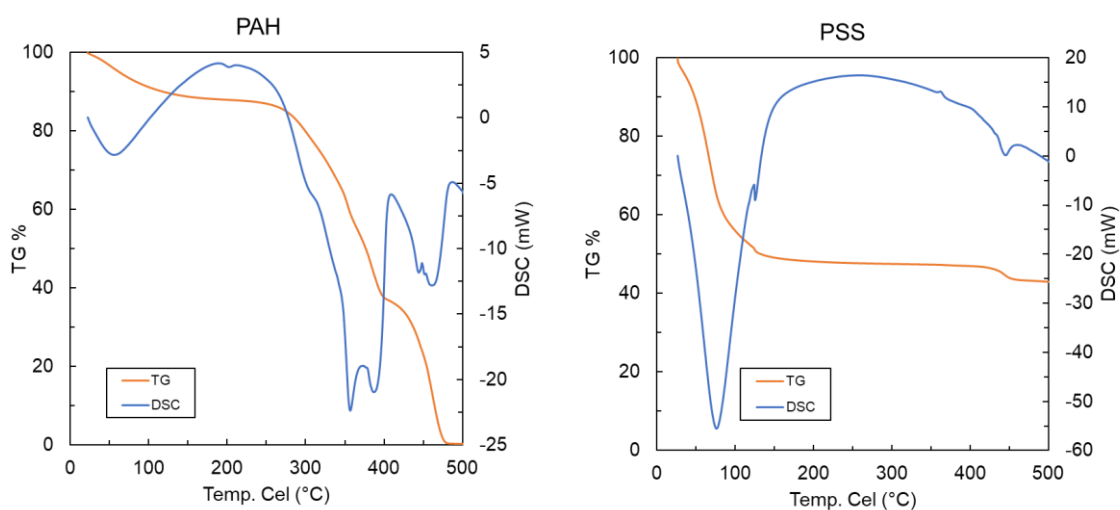


Figura 49: Gráficos TG-DSC dos filmes funcionalizados com PAH e PSS.

Ao observar o gráfico 50 foi possível comparar a degradação térmica dos filmes funcionalizados com os filmes funcionalizados após deposição por LbL em soluções de polímeros sintéticos com uma concentração de 2 mg/mL, com tempos de imersão de 20 min (5 ciclos) e de 1 hora (2 ciclos). Em ambos os filmes obtidos, foi observada uma maior estabilidade térmica comprovada pela extensão do patamar relativo à segunda perda de massa até uma temperatura mais elevada, comparativamente a filmes apenas funcionalizados. Esta observação sugere a presença de polímeros na superfície do filme, corroborando os resultados obtidos por DSC. Estes permitiram observar que, após a deposição polimérica, a degradação do filme se tornou mais endotérmica.

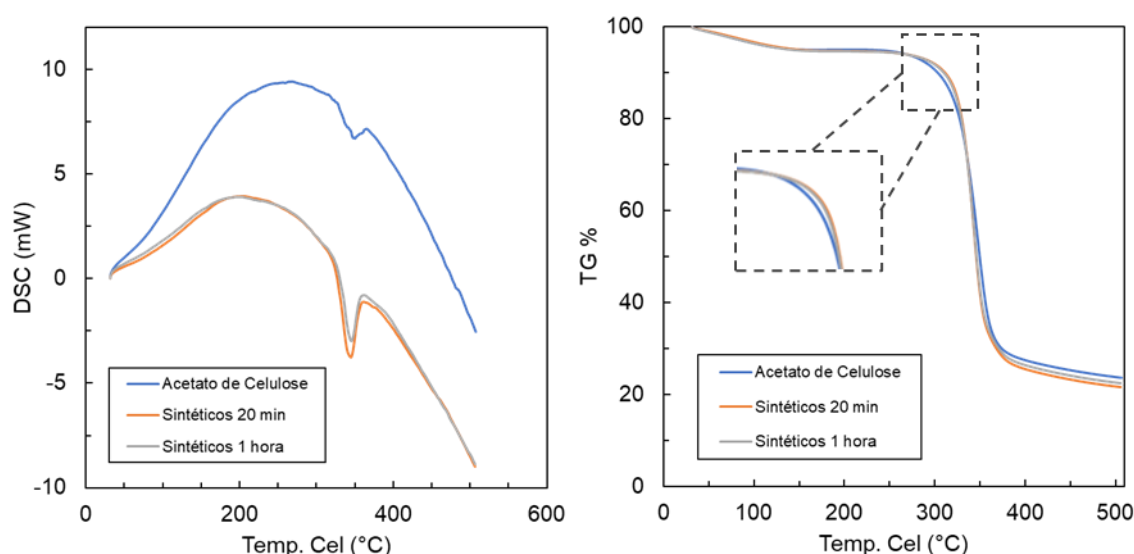


Figura 50: Gráficos de TG-DSC de filmes funcionalizados com PAH com diferentes tempos de funcionalização.

7.5 Swelling

O *swelling* ou inchamento é um parâmetro muito importante para a caracterização dos biomateriais visto que determina a capacidade de retenção de água de um determinado material. Este processo de retenção de água progressivo dos biomateriais leva a mudanças estruturais consideráveis, como a mobilidade das cadeias macromoleculares, relaxamentos macromoleculares e mudanças na estrutura em termos de forma e tamanho[133].

A imersão dos filmes em água MiliQ permitiu a obtenção de dados que possibilitaram o estudo do grau de inchamento dos filmes, com o objetivo final de verificar a influência da adição de polímeros naturais e sintéticos na superfície dos mesmos. A percentagem de *swelling* foi calculada através da seguinte equação:

$$\% \text{ swelling} = \frac{W_w - W_d}{W_d} \times 100 \quad (18)$$

onde, W_w representa o filme após a imersão em água e W_d o peso inicial após a secagem.

Optou-se por realizar a hidratação dos filmes por um somatório de imersões de modo a ser possível a obtenção do valor de *swelling* máximo de cada sistema. Esta técnica foi utilizada para analisar os filmes funcionalizados e também após a deposição por *Layer-by-Layer* com os sistemas de polieletrólitos sintéticos e naturais durante 5 ciclos, com tempos de imersão de 20 minutos e 1 hora, de modo a poder compará-los. O índice inchamento dos diferentes filmes foi monitorizado durante um máximo de 30 horas e os resultados estão representados na Figura 51.

Tal como observado na Figura 51, a evolução da capacidade de retenção de água para todos os sistemas aumenta de forma semelhante. Estes ensaios demonstraram que, apesar das diferenças apresentadas, houve um período de equilíbrio da hidratação semelhante para praticamente todas as composições de 25 min, exceto para os filmes naturais 1h.

No que diz respeito à percentagem de inchamento máxima, observou-se diferenças consoante as condições de LbL utilizadas, como era expectável. O filme funcionalizado apresentou maior índice de inchamento, seguido dos filmes com polímeros sintéticos 20 min e naturais 20 min que mostraram propriedades de inchaço semelhantes entre si.

Por outro lado, os filmes com tempos de imersão de 1h (sintéticos e naturais) apresentam, respetivamente, as menores taxas de inchamento. Isso pode ser atribuído devido ao tempo de imersão excessivo dos filmes em água. A menor capacidade de inchamento destes pode ser explicada pelo aumento da densidade de reticulação e consequentemente um aumento na hidrofobicidade e uma diminuição correspondente na extensibilidade da rede de polímero, fazendo com que absorção de água seja diminuta[134]. Comparando os resultados entre os dois polímeros (naturais e sintéticos-1h) é possível observar que a deposição de polímeros naturais resulta num menor inchamento dos filmes. Esta observação pode ser atribuída pelo facto de apesar de ambos os polímeros serem solúveis em água, a solubilidade do quitosano dependerá do grau de deacetilação, pureza da amostra e pH da solução. De facto, o CHT só é solúvel com pH inferior a 6,5 o que pode fazer com que as camadas formadas pelos biopolímeros sejam menos hidrofílicas do que as formadas pelos sintéticos. Estes resultados indicam que um maior tempo de imersão nas soluções poliméricas resulta numa maior deposição polimérica.

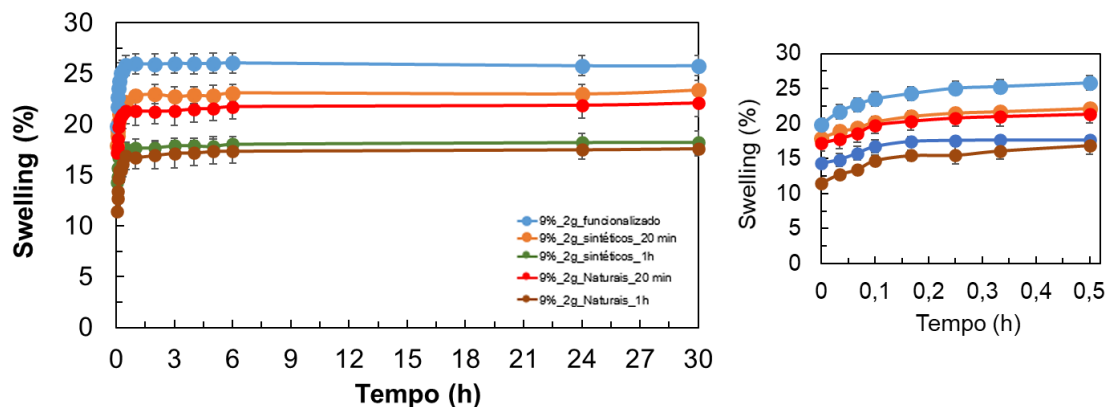


Figura 51: Resultados dos ensaios de swelling.

7.6 Potencial zeta

O potencial zeta baseia-se no facto de uma partícula em suspensão exibir uma diferença de potencial entre a sua superfície e a interface do meio envolvente. Esta diferença de potencial pode ser utilizada como um indicativo da estabilidade das partículas em solução, tal como a sua carga.

O processo normal de medição desta propriedade envolve uma medição indireta da velocidade de movimentação das partículas coloidais em suspensão. Através da aplicação de um campo elétrico na dispersão, as partículas carregadas negativamente vão deslocar-se para o eléctrodo carregado positivamente e vice-versa. Esta deslocação é feita com uma velocidade que é proporcional ao potencial zeta, equação 19:

$$UE = \frac{2\epsilon r \zeta}{3\eta} f(\kappa\alpha) \quad (19)$$

onde UE é a mobilidade eletroforética, ϵr é a constante dielétrica, ζ é o potencial zeta, η a viscosidade do meio e $f(\kappa\alpha)$ é a função de Henry

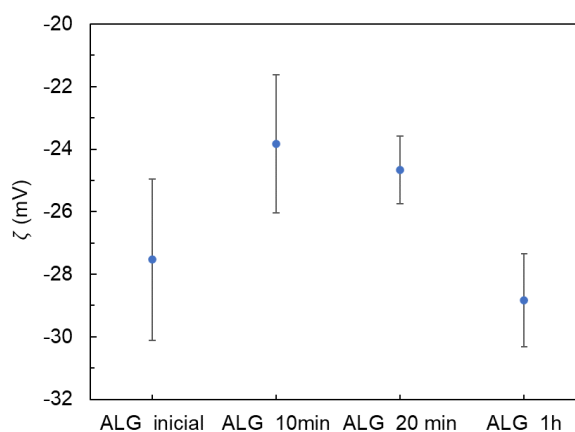
No âmbito deste trabalho, esta técnica foi utilizada com o objetivo de averiguar o valor de potencial zeta (ζ) das soluções de polímero utilizadas para a deposição por LbL e se era observada alguma diferença antes e após a realização das deposições.

Foram analisadas as soluções dos diversos polímeros (CHT, ALG, PAH e PSS) antes da imersão do AC (inicial) e após a realização de 5 ciclos LbL com tempos de imersão de 10 min, 20 min e 1 hora, sendo que os resultados obtidos estão descritos na tabela 6

Tabela 6: Valores potencial zeta das soluções de polímero após funcionalização dos filmes.

	Inicial	10 min	20 min	1 hora
CHT	16,7	17,2	17,6	15,6
ALG	-27,5	-23,8	-34,7	-28,8
PAH	24,4	23,9	25,7	21,3
PSS	-16,5	-17,8	-19,9	-18,2

Estes resultados revelaram-se inconclusivos relativamente à deposição de polímero na superfície do filme pois as diferenças de potencial nas soluções antes e após a realização dos ciclos de LbL não demonstraram um decaimento do valor de potencial, como era esperado. O fator limitante para esta técnica pode estar relacionado ao facto de as camadas de polímero formadas serem da ordem dos nanómetros, não havendo diferenças significativas nas concentrações das soluções dos polímeros após as deposições. No entanto, foi possível comprovar as cargas opostas dos sistemas poliméricos abordados.

**Figura 52:** Valores de potencial zeta das soluções de alginato após funcionalização dos filmes.

7.7 SEM-EDS

A morfologia e a composição dos filmes, após a deposição polimérica, foram analisadas através de análise por SEM e EDS. Começaram-se por realizar as análises em modo de baixo vácuo sendo que neste modo não foi necessário realizar qualquer revestimento na amostra. Após a obtenção de algumas imagens e análises de EDS a todas as amostras, foi realizado um revestimento de Au/Pd para ser possível a observação em modo alto vácuo e assim obter resultados com uma melhor resolução.

Iniciou-se a análise com um filme apenas funcionalizado, em que foi observada uma superfície considerada amorfa, sem presença de qualquer tipo de estruturas fibrosas

(figura 53), o que já era expectável tendo em conta que o método de formação foi por *casting*.

Ambos os sistemas de polímeros utilizados para a realização de LbL foram avaliados em três condições, sendo que a concentração das soluções de polímero utilizadas foi de 2 mg/mL e os tempos de imersão e número de ciclos foram de:

- 10 min, 10 ciclos
- 20 min, 5 ciclos
- 60 min, 5 ciclos

Nos filmes em que a deposição foi realizada com biopolímeros (CHT e ALG) pelas três metodologias, foi possível observar, em modo de baixo vácuo, que se tratava de uma morfologia muito semelhante à do substrato. No entanto, também foi notória a presença de pequenos aglomerados que podiam ser representativos da deposição polimérica. Outra evidência nesta análise, nomeadamente nos filmes com um tempo de imersão de 1 hora durante 5 ciclos, em modo alto vácuo, foi a observação de estruturas que indiciam a presença de microorganismos, figura 53. Esta hipótese pode ser explicada por algum possível descuido no manuseamento do filme. No que diz respeito às análises de EDS realizadas, não foi possível detetar o elemento azoto (N) proveniente do quitosano. Este resultado já era expectável tendo em conta uma das limitações da técnica, pelo facto de este apresentar uma massa muito semelhante ao carbono e ao oxigénio que são os elementos maioritários da matriz em questão, suprimindo o sinal do azoto

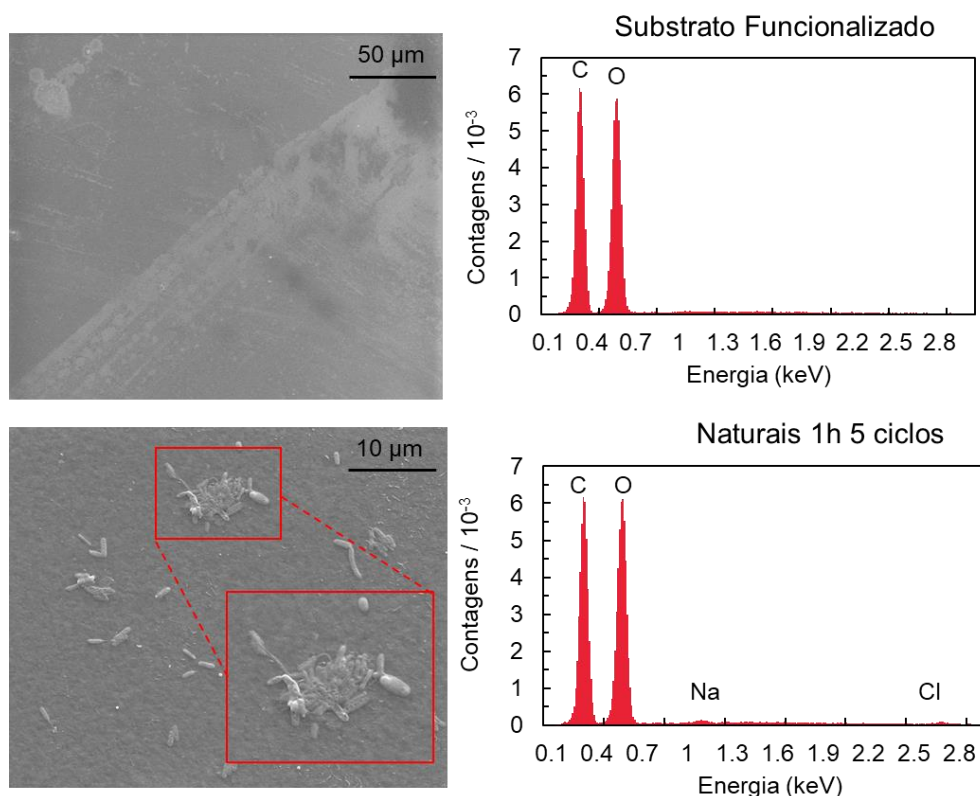


Figura 53: Imagens de SEM e correspondentes análises de EDS, de um filme funcionalizado e após deposição de 1 hora (5 ciclos) em CHT/ALG.

No que diz respeito aos filmes obtidos a partir de LbL com polímeros sintéticos (PAH e PSS), pela análise em modo de baixo vácuo, foi perceptível a presença de algumas irregularidades, figura 54. Após a análise em modo de alto vácuo, foi comprovada a existência de diversas zonas com diferentes espessuras podendo ser um indício de uma deposição polimérica heterogénea. Assim, foram realizadas análises de EDS em diferentes zonas para ser possível averiguar se estas diferenças na morfologia eram provocadas pela deposição polimérica. Na análise das diferentes zonas foi possível identificar a presença do elemento enxofre (S), proveniente do polímero aniónico PSS, confirmando então a presença de camadas poliméricas (figura 54). Ao comparar uma zona com menor espessura (assinalada com Z3 na figura x) com uma zona de maior espessura (Z6), através de análise por EDS, foi possível observar diferenças no rácio C/O, sendo superior na zona Z3. Foi também possível observar um sinal muito mais elevado do elemento enxofre na zona Z6. De um ponto de vista estrutural, a razão C/O (por monómero) do substrato é de 6/5, do PSS 8/3 e o PAH não apresenta oxigénios na sua estrutura, podendo ser a explicação para o aumento deste rácio de Z3 para Z6. A presença de um sinal muito mais intenso do enxofre em Z6 sugere que as estruturas com maior relevo são resultado de uma maior deposição polimérica. Verifica-se, desta forma, que a deposição polimérica não ocorre de forma homogénea. Por outro lado, não foi possível averiguar em que condições

é observada uma maior deposição de polímero pois o aspeto observado para as três condições estudadas era bastante semelhante (resultados não apresentados).

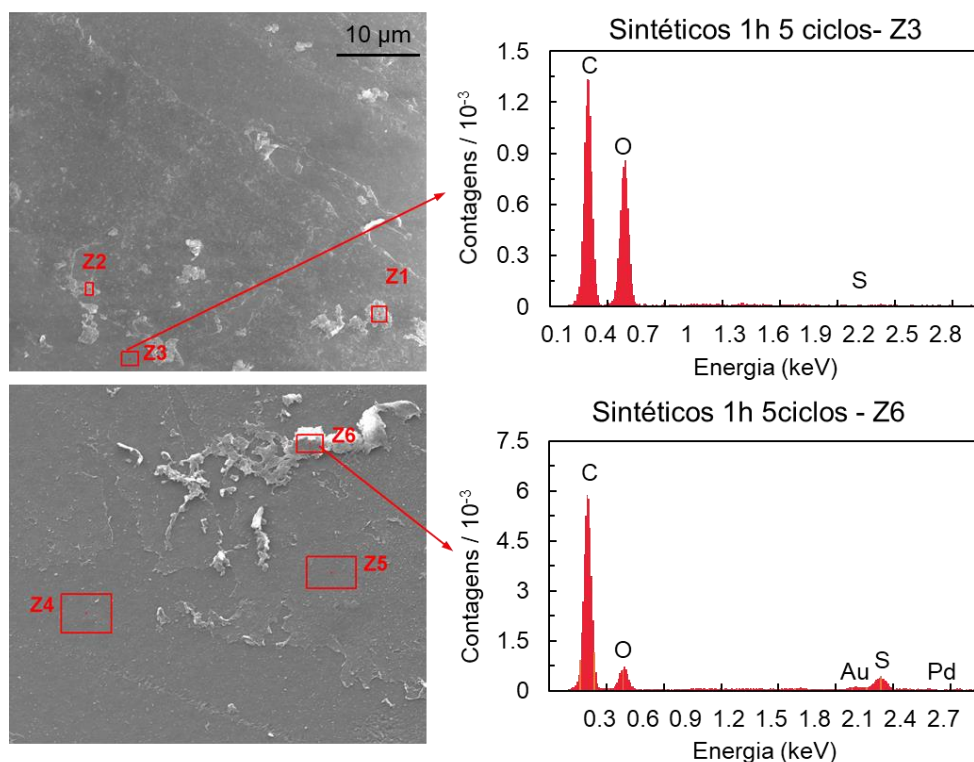


Figura 54: Imagens de SEM e correspondentes análises de EDS, de um filme após deposição de 1 hora (5 ciclos) em PAH/PSS, em diferentes zonas.

7.8 LbL com imobilização de pigmento

O último passo no desenvolvimento destes filmes com possível aplicação sensora em embalagens alimentares inteligentes consistiu na deposição de pigmentos do tipo flavílio entre as camadas poliméricas. O primeiro teste foi realizado com um extrato de amoras, contendo como antocianina maioritária a cianidina-3-glucósido.

Diversas metodologias foram testadas sendo que foi mantido um tempo de imersão de 10 min e duas soluções de lavagem durante 1 min. As condições anteriormente foram escolhidas baseadas no facto de existirem indícios de que os tempos estudados previamente não revelarem diferenças significativas na deposição polimérica. Assim, foi escolhido o tempo mais curto de modo a poder ser realizado um maior número de experiências. Para o estudo deste pigmento foram testadas três metodologias, esquematizadas na figura 55 sendo uma delas apenas a imersão do filme numa solução de pigmento (figura 55 A) que funcionou como um controlo. As outras duas metodologias foram aplicadas tanto no sistema de biopolímeros como de polímeros sintéticos e

basearam-se na deposição do filme em soluções com cargas opostas (figura 54 B) e outra apenas com soluções catiónicas (figura 55 C).

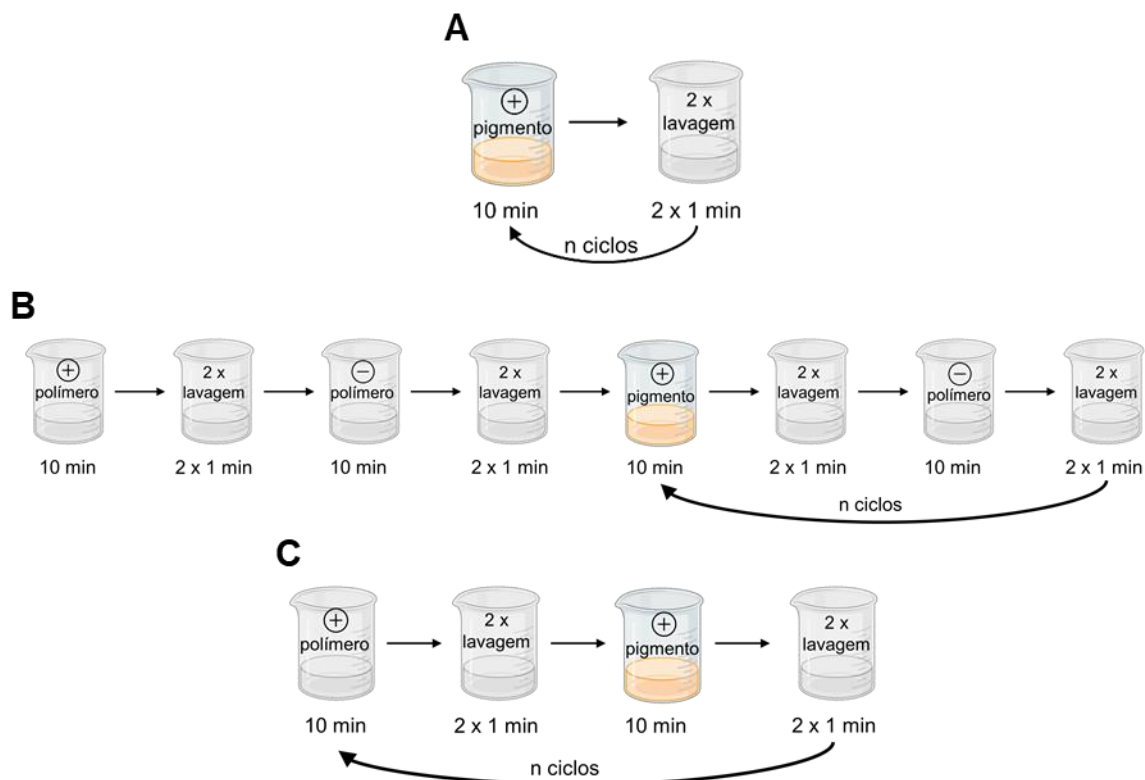


Figura 55: Procedimento experimental para funcionalização dos filmes.

Após a primeira deposição de pigmento em todas as metodologias, foi notório o aparecimento de uma tonalidade arroxeada para todos os filmes. Foram realizadas 6 deposições de pigmento no total, sendo que por inspeção visual não foi perceptível um aumento de cor ao longo das diversas deposições nem entre metodologias, tal como demonstra a figura 56.

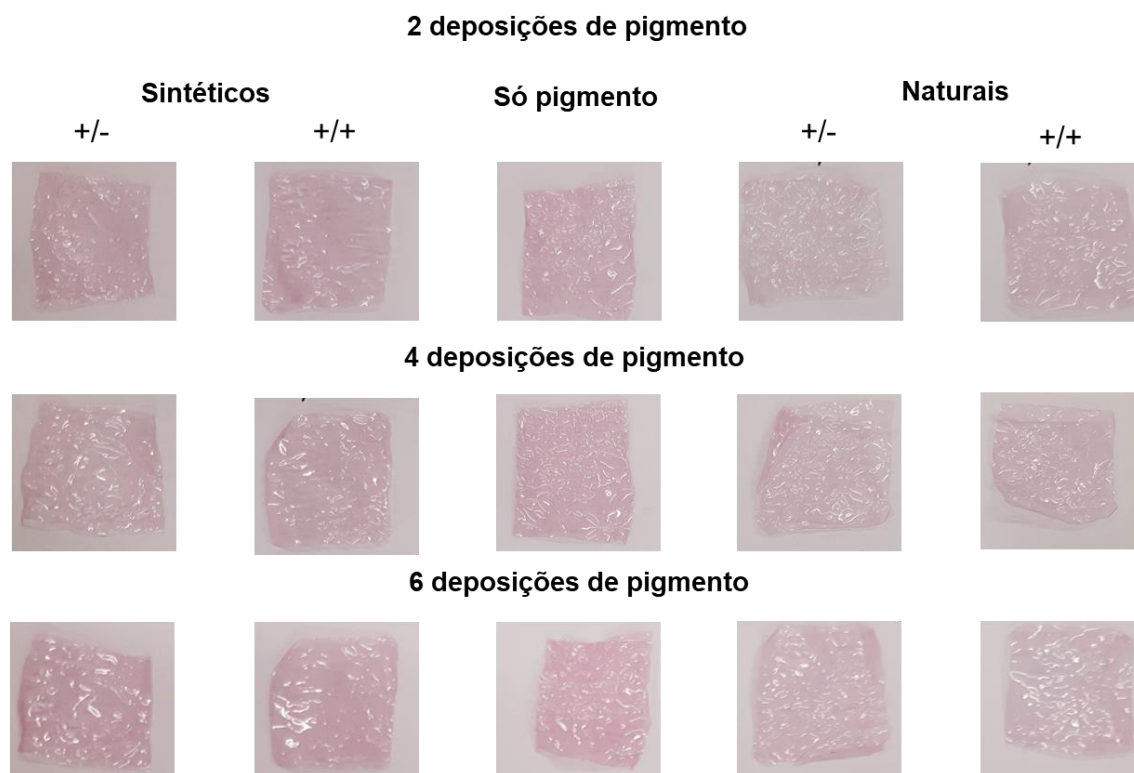


Figura 56: Aspeto dos filmes após funcionalização com pigmento

O pigmento 2,10-bis-(4',4''-hidroxifenil)piranobenzopirílio (**9**), cujo a síntese foi descrita anteriormente, revela uma estrutura e propriedades cromáticas interessantes, nomeadamente uma constante de acidez (pK_a) que coincide com a janela de pH em que ocorre a degradação de alguns alimentos perecíveis (e.g. carne, peixe) (figura 57) tornando-se um excelente sensor promissor para a aplicação em embalagens alimentares. Pelo facto de o pigmento apresentar uma baixa solubilidade em água, a sua dissolução foi efetuada numa solução de 85% EtOH/H₂O com HCl 0,1 M, apresentando-se sob a forma de catião flavílio (cor de laranja).

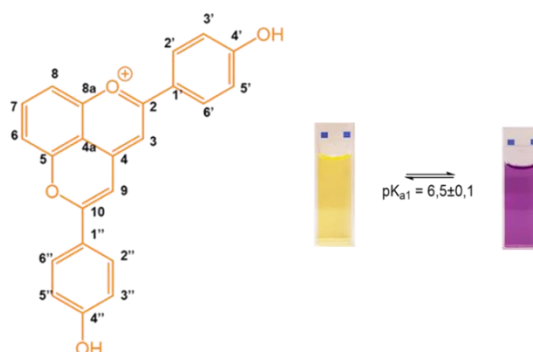


Figura 57: Estrutura do pigmento **4** e cor das soluções com variação de pH.

Para esta experiência foram utilizadas as três metodologias acima referidas, e ainda testada outra metodologia, em que a deposição do pigmento era realizada alternadamente entre o polímero catiónico e aniónico, como esquematizada na figura 58.

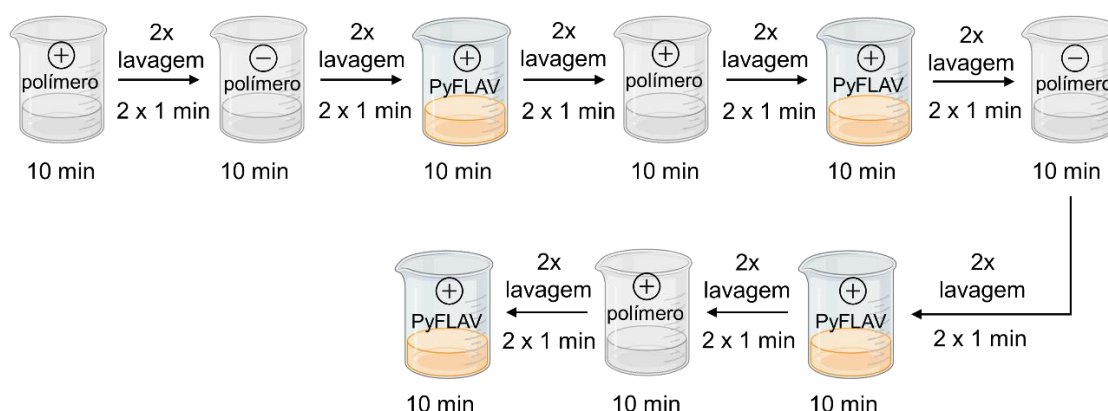


Figura 58: Procedimento experimental para a funcionalização dos filmes com pigmento.

Após a deposição de 7 camadas de pigmento, os filmes foram colocados numa solução de HCl 0,1 M, para uma melhor comparação, apresentando uma tonalidade amarela, figura 59. Recorreu-se a uma sonda de refletância com fibra ótica com o objetivo de monitorizar a cor real do filme. No entanto em nenhum dos filmes foi possível obter qualquer espectro que possibilitasse essa monitorização. Posto isto não foi possível determinar qual a melhor metodologia a adotar.

7 deposições de pigmento – 0,1M HCl

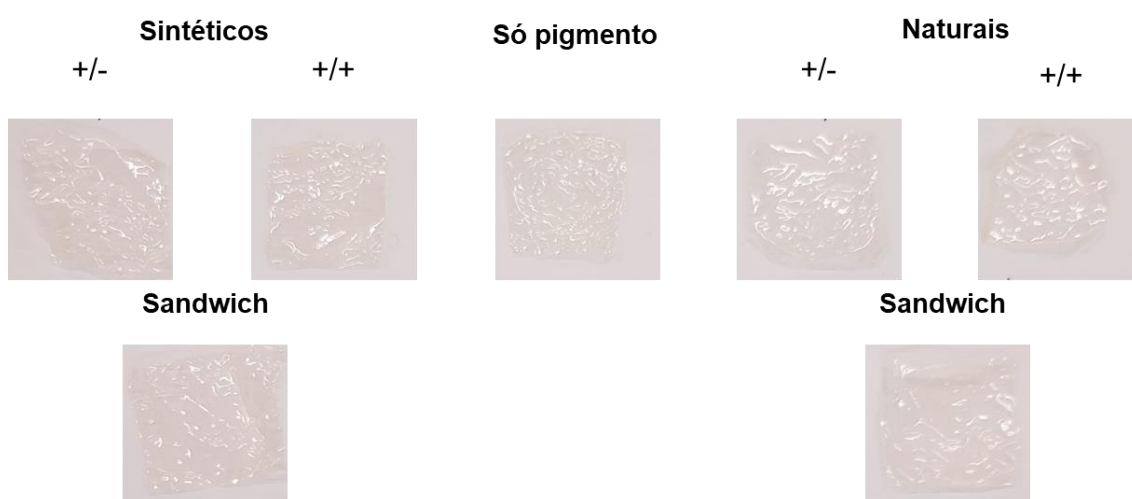


Figura 59: Aspeto dos filmes após deposição de pigmento e serem mergulhados numa solução de 0,1 M HCl.

De seguida, foram colocados numa solução de NaOH 0,1 M para averiguar se este mudava de cor e se esta era mais intensa e possível de detetar. Os filmes adquiriram uma cor azul ténue, em que por inspeção visual não foi possível distinguir o efeito das diferentes

metodologias. No entanto, foi possível a obtenção de um espectro de absorção, pela sonda de refletância, representados na figura 60. Devido à instabilidade da linha de base, a comparação da quantidade de pigmento presente em cada filme foi feita através das áreas do pico detetado, apresentadas na figura 61.

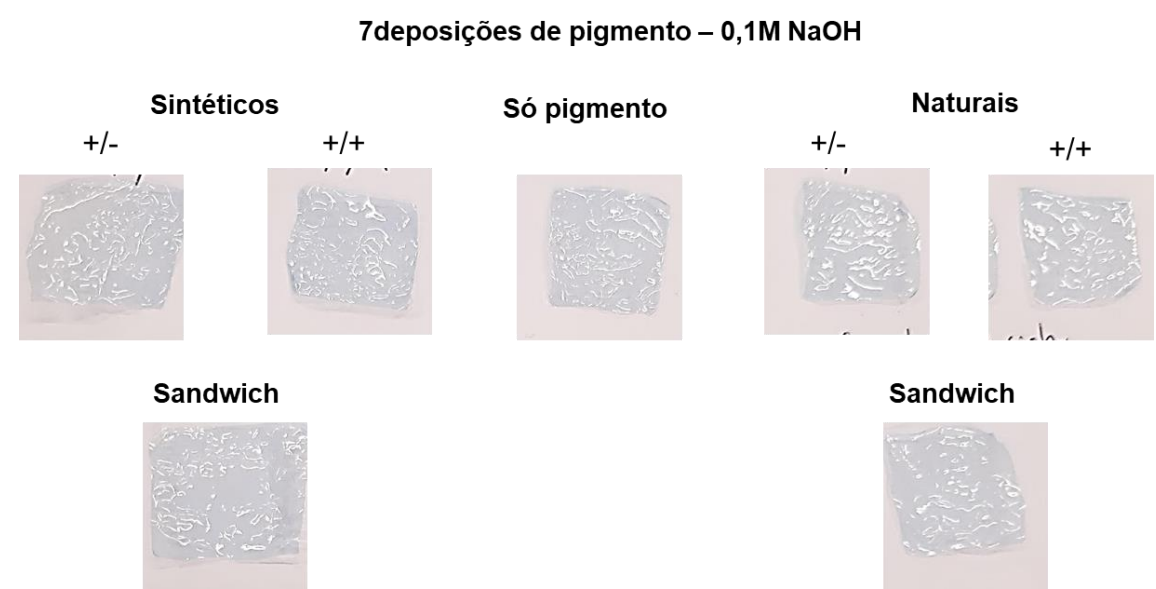


Figura 60: Aspeto dos filmes após funcionalização com pigmento.

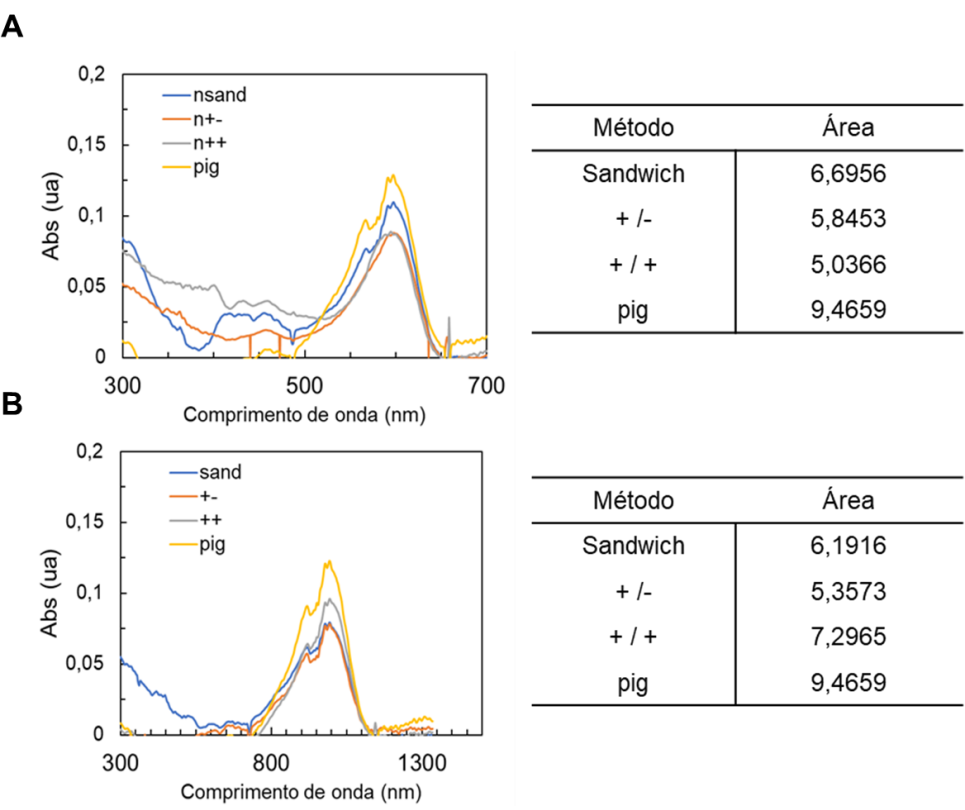


Figura 61: Espectro de absorvância, obtido pela sonda de refletência, após 7 deposições de pigmento, utilizando polímeros naturais (A) e sintéticos (B).

Perante os resultados observados relativos às áreas do pico presente no espectro de absorção (de 500 a 1150 nm) foi possível concluir que a metodologia que revela uma maior área é a de aplicação direta do pigmento, indicando que este é o que terá maior quantidade de pigmento depositado. Era expectável que o pigmento deposita-se apenas no filme funcionalizado devido ao facto da superfície estar carregada negativamente (carga oposta ao pigmento). Adicionalmente, por inspeção visual não foi detetada numa lixiviação de pigmento, o que revela que esta metodologia seria a mais vantajosa, no entanto, seria necessário fazer esta monitorização por espectrofotometria de UV-Vis.

Com a utilização de polímeros naturais (CHT e ALG) foi possível averiguar que, depois da deposição diretamente do pigmento, a metodologia mais vantajosa seria a deposição em camadas alternadas de polieletrólito (sandwich). Por outro lado, a metodologia que demonstrou a menor deposição foi a que se utilizou a deposição apenas com soluções catiónicas, o que seria o de esperar devido à repulsão de cargas.

No que diz respeito à utilização de polímeros sintéticos (PAH e PSS) a metodologia que se revelou mais vantajosa foi a realizada apenas com soluções catiónicas (+/+) que apresentava uma maior área do pico do pigmento. Por outro lado, a metodologia que apresentou menor deposição de pigmento (menor área de pico) foi a realizada com camadas de cargas opostas (+/-).

Estes resultados não são considerados resultados quantitativos devido a algumas limitações inerentes ao equipamento. De um modo geral, não foi possível a monitorização do crescimento da banda do pigmento ao longo da deposição e, consequentemente, não podemos afirmar a existência real de uma metodologia mais vantajosa para a realização do LbL com pigmento.

8. Conclusões

As sínteses propostas para a obtenção de pigmentos, nomeadamente pirano-3,7-desoxiantocianinas, foram bem sucedidas tendo sido obtidos rendimentos entre 12-15 % para os três pigmentos estudados. A estrutura destes pigmentos foi comprovada por HPLC, LC-DAD/ESI-MS e RMN (1D e 2D). Foram ainda realizados estudos relativos às suas propriedades físico químicas, recorrendo a espectrofotometria de UV-Vis, tendo sido obtidos os valores de pK_a para os pigmentos 4 e 7. Os valores de pK_a obtidos revelaram ser de elevado interesse para a aplicação com sensores em embalagens alimentares, pois encontram-se dentro da gama de valores de pH indicativos no que diz respeito à deterioração de alguns alimentos perecíveis (ex: carne, peixe).

A produção dos filmes para incorporação em embalagens alimentares foi realizada em diversas fases sendo a primeira a elaboração de um substrato, em que o material escolhido foi o acetato de celulose. Após a otimização da formulação do substrato, foi realizado um estudo de funcionalização do mesmo com uma solução de KOH, que foi comprovada pelo desaparecimento da banda característica do grupo C=O, presente em análises por FTIR.

Para a imobilização do pigmento, a técnica abordada neste trabalho foi por *Layer-by-Layer*, sendo que numa primeira abordagem foi estudado a deposição apenas dos polímeros no substrato. Foram abordados dois sistemas de polímeros com cargas opostas: naturais (CHT/ALG) e sintéticos (PAH/PSS). Esta imobilização foi caracterizada por TG-DSC, análise de *swelling* e SEM-EDS. Em ambos os sistemas observaram-se deposições poliméricas através das análises de TG-DSC que permitiram afirmar que a presença de polímeros na superfície dos filmes aumenta a estabilidade térmica do mesmo. Ao avaliar a capacidade de *swelling* dos filmes foi possível confirmar a presença de polímeros na superfície, nomeadamente que um maior tempo de imersão nas soluções poliméricas resulta numa maior quantidade de polímero à superfície. As análises de SEM-EDS demonstraram que o substrato funcionalizado apresentava uma morfologia amorfa. Em relação aos filmes com deposições de polímeros naturais não foram observadas diferenças significativas na morfologia nem na análise por EDS, o que já era expectável pois a deteção do elemento azoto (proveniente do quitosano) tem uma baixa deteção nesta técnica. Por outro lado, as imagens de SEM obtidas a partir dos filmes com deposições de polímeros sintéticos apresentam diferenças a nível da morfologia pois observamos alguns agregados. Através de análise por EDS em diferentes zonas foi possível afirmar que os aglomerados apresentam uma maior quantidade de polímero e por isso concluir que a deposição polimérica decorre de forma heterogénea. Por forma a ser avaliada a presença do elemento azoto na superfície do filme o mais adequado seria a realização de uma análise de XPS.

A imobilização do pigmento foi alcançada com sucesso embora de uma forma muito pouco eficiente pois a cor presente no filme foi muito ténue. De modo a comparar as diferenças entre as metodologias adotadas foi medida a absorbância UV-Vis dos filmes recorrendo uma sonda de refletância que não apresentou resultados muito concordantes, de tal forma que não foi possível aferir qual a melhor metodologia a adotar.

9. Perspetivas Futuras

No futuro, pretende-se continuar a sintetizar pigmentos do tipo pirano-desoxiantocianinas e a estudar as suas propriedades cromáticas para aplicação como sensores de pH em embalagens alimentares inteligentes.

Em relação à fixação dos pigmentos no substrato, pretende-se continuar a explorar a técnica de LbL nomeadamente por solubilização do pigmento diretamente nas soluções de polieletrólitos positivo e negativo, e também por funcionalização covalente do polímero com os pigmentos de forma a melhorar a eficácia da imobilização das moléculas sensoras entre as camadas poliméricas dos filmes e consequentemente obter uma maior intensidade de cor dos mesmos.

Por outro lado, outra abordagem que será estudada passa pela imobilização dos pigmentos sensores na solução de acetato de celulose, sem recorrer a qualquer funcionalização, e obtenção direta do filme sensor por *solvent casting*.

10. Referências Bibliográficas

1. Kabera, J. N.; Semana, E.; Mussa, A. R.; He, X., Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *Pharmacy and Pharmacology* **2014**, 2, 377-392.
2. Chen, J.; Zhu, Y.; Zhang, W.; Peng, X.; Zhou, J.; Li, F.; Han, B.; Liu, X.; Ou, Y.; Yu, X., Delphinidin induced protective autophagy via mTOR pathway suppression and AMPK pathway activation in HER-2 positive breast cancer cells. *BMC Cancer* **2018**, 18 (1), 1-13.
3. Agunloye, O. M.; Oboh, G.; Ademiluyi, A. O.; Ademosun, A. O.; Akindahunsi, A. A.; Oyagbemi, A. A.; Omobowale, T. O.; Ajibade, T. O.; Adedapo, A. A., Cardio-protective and antioxidant properties of caffeic acid and chlorogenic acid: Mechanistic role of angiotensin converting enzyme, cholinesterase and arginase activities in cyclosporine induced hypertensive rats. *Biomedicine Pharmacotherapy* **2019**, 109, 450-458.
4. Addepalli, V.; Suryavanshi, S. V., Catechin attenuates diabetic autonomic neuropathy in streptozotocin induced diabetic rats. *Biomedicine Pharmacotherapy* **2018**, 108, 1517-1523.
5. Lu, C.; Zhu, W.; Shen, C.-L.; Gao, W., Green tea polyphenols reduce body weight in rats by modulating obesity-related genes. *PloS one* **2012**, 7 (6), e38332.
6. Ali, F.; Jyoti, S.; Naz, F.; Ashafaq, M.; Shahid, M.; Siddique, Y. H., Therapeutic potential of luteolin in transgenic Drosophila model of Alzheimer's disease. *Neuroscience letters* **2019**, 692, 90-99.
7. Huang, B.; Liu, J.; Ma, D.; Chen, G.; Wang, W.; Fu, S., Myricetin prevents dopaminergic neurons from undergoing neuroinflammation-mediated degeneration in a lipopolysaccharide-induced Parkinson's disease model. *Journal of Functional Foods* **2018**, 45, 452-461.
8. Laura, A.; Alvarez-Parrilla, E.; Gonzalez-Aguilar, G. A., *Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability*. John Wiley & Sons: 2009.
9. Shen, J.; Qu, C.; Xu, L.; Sun, H.; Zhang, J., Resveratrol exerts a protective effect in chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behavior: involvement of the AKT/GSK3 β signaling pathway in hippocampus. *Psychopharmacology* **2019**, 236 (2), 591-602.
10. Huang, X.; Sun, J.; Chen, G.; Niu, C.; Wang, Y.; Zhao, C.; Sun, J.; Huang, H.; Huang, S.; Liang, Y., Resveratrol promotes diabetic wound healing via SIRT1-FOXO1-c-Myc signaling pathway-mediated angiogenesis. *Frontiers in pharmacology* **2019**, 10, 421.
11. Pandey, K. B.; Rizvi, S. I., Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine cellular longevity* **2009**, 2 (5), 270-278.
12. Vuolo, M. M.; Lima, V. S.; Junior, M. R. M., Phenolic compounds: structure, classification, and antioxidant power. In *Bioactive compounds*, Elsevier: 2019; pp 33-50.
13. Laura, A.; Moreno-Escamilla, J. O.; Rodrigo-García, J.; Alvarez-Parrilla, E., Phenolic compounds. In *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables*, Elsevier: 2019; pp 253-271.
14. Gómez-Caravaca, A. M.; Verardo, V.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Caboni, M. F., Phenolic compounds and saponins in plants grown under different irrigation regimes. In *Polyphenols in Plants*, Elsevier: 2014; pp 37-52.

15. Tsao, R., Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2010**, 2 (12), 1231-1246.
16. Castañeda-Ovando, A.; de Lourdes Pacheco-Hernández, M.; Páez-Hernández, M. E.; Rodríguez, J. A.; Galán-Vidal, C. A., Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* **2009**, 113 (4), 859-871.
17. Bondonno, N. P.; Lewis, J. R.; Blekkenhorst, L. C.; Bondonno, C. P.; Shin, J. H.; Croft, K. D.; Woodman, R. J.; Wong, G.; Lim, W. H.; Gopinath, B., Association of flavonoids and flavonoid-rich foods with all-cause mortality: The Blue Mountains Eye Study. *Clinical Nutrition* **2020**, 39 (1), 141-150.
18. Bakoyiannis, I.; Daskalopoulou, A.; Pergialiotis, V.; Perrea, D., Phytochemicals and cognitive health: Are flavonoids doing the trick? *Biomedicine Pharmacotherapy* **2019**, 109, 1488-1497.
19. Khoo, H. E.; Azlan, A.; Tang, S. T.; Lim, S. M., Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food nutrition research* **2017**, 61 (1), 1361779.
20. He, J.; Giusti, M. M., Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual review of food science technology* **2010**, 1, 163-187.
21. Karageorgou, P.; Manetas, Y., The importance of being red when young: anthocyanins and the protection of young leaves of *Quercus coccifera* from insect herbivory and excess light. *Tree Physiology* **2006**, 26 (5), 613-621.
22. Santos-Buelga, C.; Mateus, N.; De Freitas, V., Anthocyanins. Plant pigments and beyond. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, 62, 6879–6884.
23. Adaku, C.; Skaar, I.; Berland, H.; Byamukama, R.; Jordheim, M.; Andersen, Ø. M., Anthocyanins from mauve flowers of *Erlangea tomentosa* (*Bothriocline longipes*) based on erlangidin – The first reported natural anthocyanidin with C-ring methoxylation. *Phytochemistry Letters* **2019**, 29, 225-230.
24. Qian, B.-J.; Liu, J.-H.; Zhao, S.-J.; Cai, J.-X.; Jing, P., The effects of gallic/ferulic/caffeic acids on colour intensification and anthocyanin stability. *Food Chemistry* **2017**, 228, 526-532.
25. Huang, B.; Liu, J.; Ma, D.; Chen, G.; Wang, W.; Fu, S., Myricetin prevents dopaminergic neurons from undergoing neuroinflammation-mediated degeneration in a lipopolysaccharide-induced Parkinson's disease model. *Journal of Functional Foods* **2018**, 45, 452-461.
26. Arias, N.; Macarulla, M. T.; Aguirre, L.; Milton, I.; Portillo, M. P., The combination of resveratrol and quercetin enhances the individual effects of these molecules on triacylglycerol metabolism in white adipose tissue. *European journal of nutrition* **2016**, 55 (1), 341-348.
27. Błkowska-Barczak, A., Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants—a review. *Polish journal of food and nutrition sciences* **2005**, 14, 55.
28. Fossen, T.; Cabrita, L.; Andersen, O. M., Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry* **1998**, 63 (4), 435-440.
29. Brouillard, R.; Lang, J., The hemiacetal–cis-chalcone equilibrium of malvin, a natural anthocyanin. *Canadian journal of chemistry* **1990**, 68 (5), 755-761.
30. Torskangerpoll, K.; Andersen, Ø. M., Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chemistry* **2005**, 89 (3), 427-440.

31. Furtado, P.; Figueiredo, P.; das Neves, H. C.; Pina, F., Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins. *Journal of Photochemistry Photobiology A: Chemistry* **1993**, 75 (2), 113-118.
32. Rytel, E.; Tajner-Czopek, A.; Kita, A.; Kucharska, A. Z.; Sokół-Łętowska, A.; Hamouz, K., Content of anthocyanins and glycoalkaloids in blue-fleshed potatoes and changes in the content of α -solanine and α -chaconine during manufacture of fried and dried products. *International Journal of Food Science Technology* **2018**, 53 (3), 719-727.
33. Wesche-Ebeling, P.; Argaz-Jamet, A., Stabilization mechanisms for anthocyanin: The case for copolymerization reactions. In *Engineering and Food for the 21st Century*, 2002; pp 141-150.
34. Ertan, K.; Türkyılmaz, M.; Özkan, M., Color and stability of anthocyanins in strawberry nectars containing various co-pigment sources and sweeteners. *Food Chemistry* **2020**, 310.
35. Van, Q. T. T.; Vien, L. T.; Hanh, T. T. H.; Huong, P. T. T.; Cuong, N. T.; Thao, N. P.; Thuan, N. H.; Dang, N. H.; Thanh, N. V.; Cuong, N. X., Acylated flavonoid glycosides from *Barringtonia racemosa*. *Natural product research* **2020**, 34 (9), 1276-1281.
36. Berké, B.; Chèze, C.; Vercauteren, J.; Deffieux, G., Bisulfite addition to anthocyanins: revisited structures of colourless adducts. *Tetrahedron Letters* **1998**, 39 (32), 5771-5774.
37. Rentzsch, M.; Schwarz, M.; Winterhalter, P., Pyranoanthocyanins—an overview on structures, occurrence, and pathways of formation. *Trends in food science technology* **2007**, 18 (10), 526-534.
38. da Silva, C. P.; Pioli, R. M.; Liu, L.; Zheng, S.; Zhang, M.; Silva, G. T. d. M.; Carneiro, V. n. M. T.; Quina, F. H., Improved synthesis of analogues of red wine pyranoanthocyanin pigments. *ACS omega* **2018**, 3 (1), 954-960.
39. Liu, S.; Laaksonen, O.; Yang, W.; Zhang, B.; Yang, B., Pyranoanthocyanins in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) wines fermented with *Schizosaccharomyces pombe* and their evolution during aging. *Food Chemistry* **2020**, 305.
40. Cruz, L.; Teixeira, N.; Silva, A. M. S.; Mateus, N.; Borges, J.; De Freitas, V., Role of vinylcatechin in the formation of pyranomalvidin-3-glucoside-(+)- catechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, 56 (22), 10980-10987.
41. Rentzsch, M.; Schwarz, M.; Winterhalter, P.; Blanco-Vega, D.; Hermosín-Gutiérrez, I., Survey on the content of vitisin A and hydroxyphenyl-pyranoanthocyanins in Tempranillo wines. *Food Chemistry* **2010**, 119 (4), 1426-1434.
42. Oliveira, J.; Alinho Da Silva, M.; Teixeira, N.; De Freitas, V.; Salas, E., Screening of Anthocyanins and Anthocyanin-Derived Pigments in Red Wine Grape Pomace Using LC-DAD/MS and MALDI-TOF Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2015**, 63 (35), 7636-7644.
43. Guzmán-Figueroa, M. P.; Ortega-Regules, A. E.; Bautista-Ortín, A. B.; Gómez-Plaza, E.; Anaya-Berrios, C., New pyranoanthocyanins synthesized from roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) anthocyanins. *Journal of the Mexican Chemical Society* **2016**, 60 (1), 13-18.
44. Wu, N.; Wang, J. Y.; Jiang, T.; Li, S. Y.; Zhu, Z. Z.; He, J. R., Preparation, Spectral Properties and Antioxidant Activities of Pyranone-Anthocyanin Derivative (Oxovitisin). *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi/Spectroscopy and Spectral Analysis* **2017**, 37 (7), 2120-2127.
45. Gómez-Alonso, S.; Blanco-Vega, D.; Gómez, M. V.; Hermosín-Gutiérrez, I., Synthesis, isolation, structure elucidation, and color properties of 10-acetyl-pyranoanthocyanins. *Journal of agricultural food chemistry* **2012**, 60 (49), 12210-12223.

46. Araújo, P.; Basílio, N.; Azevedo, J.; Fernandes, A.; Mateus, N.; Pina, F.; de Freitas, V.; Oliveira, J., Colour modulation of blue anthocyanin-derivatives. Lignosulfonates as a tool to improve the water solubility of natural blue dyes. *Dyes and Pigments* **2018**, *153*, 150-159.
47. Mazza, G.; Miniati, E., *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains*. CRC press: Boca Raton, FL, 1993; Vol. 362, p 384.
48. Dey, A.; Neogi, S., Oxygen scavengers for food packaging applications: A review. *Trends in Food Science & Technology* **2019**, *90*, 26-34.
49. Gaikwad, K. K.; Singh, S.; Ajji, A., Moisture absorbers for food packaging applications. *Environmental Chemistry Letters* **2019**, *17* (2), 609-628.
50. Lee, D. S., Carbon dioxide absorbers for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology* **2016**, *57*, 146-155.
51. Bailén, G.; Guillén, F.; Castillo, S.; Serrano, M.; Valero, D.; Martínez-Romero, D., Use of activated carbon inside modified atmosphere packages to maintain tomato fruit quality during cold storage. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **2006**, *54* (6), 2229-2235.
52. Mousavi Khaneghah, A.; Hashemi, S. M. B.; Limbo, S., Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. *Food and Bioprocess Technology* **2018**, *111*, 1-19.
53. Heras-Mozos, R.; Muriel-Galet, V.; López-Carballo, G.; Catalá, R.; Hernández-Muñoz, P.; Gavara, R., Development and optimization of antifungal packaging for sliced pan loaf based on garlic as active agent and bread aroma as aroma corrector. *International Journal of Food Microbiology* **2019**, *290*, 42-48.
54. Vanderroost, M.; Ragaert, P.; Devlieghere, F.; De Meulenaer, B., Intelligent food packaging: The next generation. *Trends in Food Science & Technology* **2014**, *39* (1), 47-62.
55. Chalco-Sandoval, W.; Fabra, M. J.; López-Rubio, A.; Lagaron, J. M., Development of polystyrene-based films with temperature buffering capacity for smart food packaging. *Journal of Food Engineering* **2015**, *164*, 55-62.
56. Moreira, J. B.; Terra, A. L. M.; Costa, J. A. V.; de Moraes, M. G., Development of pH indicator from PLA/PEO ultrafine fibers containing pigment of microalgae origin. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *118*, 1855-1862.
57. Mills, A., Oxygen indicators in food packaging. In *Sensors for environment, health and security*, Springer: 2009; pp 371-388.
58. Grasso, S.; Zompanti, A.; Sabatini, A.; Pazzaglia, I.; Santonico, M.; Pennazza, G. In *Optical CO2 detectors for smart packaging of food in modified atmosphere*, 2020 IEEE International Workshop on Metrology for Industry 4.0 and IoT, MetroInd 4.0 and IoT 2020 - Proceedings, 2020; pp 334-339.
59. Silva-Pereira, M. C.; Teixeira, J. A.; Pereira-Júnior, V. A.; Stefani, R., Chitosan/corn starch blend films with extract from Brassica oleraceae (red cabbage) as a visual indicator of fish deterioration. *Food Science Technology* **2015**, *61* (1), 258-262.
60. Gupta, B.; Sharma, S., A long-range fiber optic pH sensor prepared by dye doped sol-gel immobilization technique. *Optics communications* **1998**, *154* (5-6), 282-284.
61. Zhang, X.; Lu, S.; Chen, X., A visual pH sensing film using natural dyes from Bauhinia blakeana Dunn. *Sensors actuators B: Chemical* **2014**, *198*, 268-273.

62. Dong, S.; Luo, M.; Peng, G.; Cheng, W., Broad range pH sensor based on sol–gel entrapped indicators on fibre optic. *Sensors actuators B: Chemical* **2008**, 129 (1), 94-98.
63. Pávai, M.; Mihály, J.; Paszternák, A., pH and CO₂ sensing by curcumin-coloured cellophane test strip. *Food analytical methods* **2015**, 8 (9), 2243-2249.
64. Calogero, G.; Yum, J.-H.; Sinopoli, A.; Di Marco, G.; Grätzel, M.; Nazeeruddin, M. K., Anthocyanins and betalains as light-harvesting pigments for dye-sensitized solar cells. *Journal of Solar Energy* **2012**, 86 (5), 1563-1575.
65. Golasz, L. B.; Silva, J. d.; Silva, S. B. d., Film with anthocyanins as an indicator of chilled pork deterioration. *Food Science Technology* **2013**, 33, 155-162.
66. Huber, T.; Müssig, J.; Curnow, O.; Pang, S.; Bickerton, S.; Staiger, M. P., A critical review of all-cellulose composites. *Journal of Materials Science* **2012**, 47 (3), 1171-1186.
67. Perepelkin, K. E., Renewable plant resources and processed products in chemical fibre production. *Fibre Chemistry* **2004**, 36 (3), 161-176.
68. Abdolali, A.; Guo, W. S.; Ngo, H. H.; Chen, S. S.; Nguyen, N. C.; Tung, K. L., Typical lignocellulosic wastes and by-products for biosorption process in water and wastewater treatment: A critical review. *Bioresource Technology* **2014**, 160, 57-66.
69. Zhou, Y.; Min, Y.; Qiao, H.; Huang, Q.; Wang, E.; Ma, T., Improved removal of malachite green from aqueous solution using chemically modified cellulose by anhydride. *International Journal of Biological Macromolecules* **2015**, 74, 271-277.
70. Emsley, A. M.; Stevens, G. C., Kinetics and mechanisms of the low-temperature degradation of cellulose. *Cellulose* **1994**, 1 (1), 26-56.
71. Akhlaghi, S. P.; Berry, R. C.; Tam, K. C., Surface modification of cellulose nanocrystal with chitosan oligosaccharide for drug delivery applications. *Cellulose* **2013**, 20 (4), 1747-1764.
72. Wan, C.; Li, J., Facile synthesis of well-dispersed superparamagnetic γ -Fe₂O₃ nanoparticles encapsulated in three-dimensional architectures of cellulose aerogels and their applications for Cr (VI) removal from contaminated water. *ACS Sustainable Chemistry Engineering* **2015**, 3 (9), 2142-2152.
73. Hu, C.; Bai, X.; Wang, Y.; Jin, W.; Zhang, X.; Hu, S., Inkjet printing of nanoporous gold electrode arrays on cellulose membranes for high-sensitive paper-like electrochemical oxygen sensors using ionic liquid electrolytes. *Analytical chemistry* **2012**, 84 (8), 3745-3750.
74. Moubarik, A.; Grimi, N.; Boussetta, N., Structural and thermal characterization of Moroccan sugar cane bagasse cellulose fibers and their applications as a reinforcing agent in low density polyethylene. *Composites Part B: Engineering* **2013**, 52, 233-238.
75. Willgert, M.; Leijonmarck, S.; Lindbergh, G.; Malmström, E.; Johansson, M., Cellulose nanofibril reinforced composite electrolytes for lithium ion battery applications. *Journal of Materials Chemistry A* **2014**, 2 (33), 13556-13564.
76. Yan, H.; Chen, X.; Song, H.; Li, J.; Feng, Y.; Shi, Z.; Wang, X.; Lin, Q., Synthesis of bacterial cellulose and bacterial cellulose nanocrystals for their applications in the stabilization of olive oil pickering emulsion. *Food Hydrocolloids* **2017**, 72, 127-135.
77. Kaur, G.; Grewal, J.; Jyoti, K.; Jain, U. K.; Chandra, R.; Madan, J., Oral controlled and sustained drug delivery systems: concepts, advances, preclinical, and clinical status. In *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems*, Elsevier: 2018; pp 567-626.

78. Berndt, P.; Kurihara, K.; Kunitake, T., Adsorption of poly (styrenesulfonate) onto an ammonium monolayer on mica: a surface forces study. *Langmuir* **1992**, *8* (10), 2486-2490.
79. Malucelli, G., Layer-by-Layer nanostructured assemblies for the fire protection of fabrics. *Materials Letters* **2016**, *166*, 339-342.
80. de Torresi, S. I. C.; Neto, J. R. M.; Vidotti, M.; Huguenin, F., Layer-by-Layer Assembly of Electrochromic Materials: On the Efficient Method for Immobilisation of Nanomaterials. *Electrochromic Materials Devices* **2015**.
81. Volodkin, D.; Skirtach, A.; Möhwald, H., Bioapplications of light-sensitive polymer films and capsules assembled using the layer-by-layer technique. *Polymer international* **2012**, *61* (5), 673-679.
82. Zhang, X.; Shi, F.; Yu, X.; Liu, H.; Fu, Y.; Wang, Z.; Jiang, L.; Li, X., Polyelectrolyte Multilayer as Matrix for Electrochemical Deposition of Gold Clusters: Toward Super-Hydrophobic Surface. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (10), 3064-3065.
83. Izumrudov, V. A.; Mussabayeva, B. K.; Murzagulova, K. B., Polyelectrolyte multilayers: Preparation and applications. *Russian Chemical Reviews* **2018**, *87* (2), 192.
84. Qin, C.; Li, H.; Xiao, Q.; Liu, Y.; Zhu, J.; Du, Y., Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydrate polymers* **2006**, *63* (3), 367-374.
85. Muzzarelli, R.; Mattioli-Belmonte, M.; Miliani, M.; Muzzarelli, C.; Gabbanelli, F.; Biagini, G., In vivo and in vitro biodegradation of oxychitin–chitosan and oxypullulan–chitosan complexes. *Carbohydrate polymers* **2002**, *48* (1), 15-21.
86. Kumar, M. R.; Muzzarelli, R.; Muzzarelli, C.; Sashiwa, H.; Domb, A., Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical reviews* **2004**, *104* (12), 6017-6084.
87. Kumar, M. N. R., A review of chitin and chitosan applications. *Reactive functional polymers* **2000**, *46* (1), 1-27.
88. Shariatnia, Z., Pharmaceutical applications of chitosan. *Advances in Colloid Interface Science* **2019**, *263*, 131-194.
89. Hu, W., *Polymer physics: a molecular approach*. Springer Science & Business Media: 2012.
90. Jennings, J. A.; Bumgardner, J. D., *Chitosan Based Biomaterials Volume 1: Fundamentals*. Woodhead Publishing: 2016.
91. Drogoz, A.; David, L.; Rochas, C.; Domard, A.; Delair, T., Polyelectrolyte complexes from polysaccharides: formation and stoichiometry monitoring. *Langmuir* **2007**, *23* (22), 10950-10958.
92. Sonvico, F.; Cagnani, A.; Rossi, A.; Motta, S.; Di Bari, M.; Cavatorta, F.; Alonso, M.; Deriu, A.; Colombo, P., Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. *International journal of pharmaceutics* **2006**, *324* (1), 67-73.
93. Goh, C. H.; Heng, P. W. S.; Chan, L. W., Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate polymers* **2012**, *88* (1), 1-12.
94. Kloareg, B.; Quatrano, R. S., Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanography marine biology: An annual review* **1988**, *26*, 259-315.
95. Brownlee, I.; Allen, A.; Pearson, J.; Dettmar, P.; Havler, M.; Atherton, M.; Onsøyen, E., Alginate as a source of dietary fiber. *Critical Reviews in Food Science Nutrition* **2005**, *45* (6), 497-510.

96. Jiménez-Escrig, A.; Sánchez-Muniz, F., Dietary fibre from edible seaweeds: chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutrition Research* **2000**, 20 (4), 585-598.
97. Kuo, C. K.; Ma, P. X., Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* **2001**, 22 (6), 511-521.
98. Dekamin, M. G.; Karimi, Z.; Latifidoost, Z.; Ilkhanizadeh, S.; Daemi, H.; Naimi-Jamal, M. R.; Barikani, M., Alginic acid: A mild and renewable bifunctional heterogeneous biopolymeric organocatalyst for efficient and facile synthesis of polyhydroquinolines. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, 108, 1273-1280.
99. Foocharoen, C.; Chunlertrith, K.; Mairiang, P.; Mahakkanukrauh, A.; Suwannaroj, S.; Namvijit, S.; Wantha, O.; Nanagara, R., Effectiveness of add-on therapy with domperidone vs alginic acid in proton pump inhibitor partial response gastro-oesophageal reflux disease in systemic sclerosis: randomized placebo-controlled trial. *Rheumatology* **2017**, 56 (2), 214-222.
100. Fernando, I. S.; Sanjeewa, K. A.; Kim, S.-Y.; Lee, J.-S.; Jeon, Y.-J., Reduction of heavy metal (Pb²⁺) biosorption in zebrafish model using alginic acid purified from *Ecklonia cava* and two of its synthetic derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, 106, 330-337.
101. Tedeschi, G.; Benitez, J. J. s.; Ceseracciu, L.; Dastmalchi, K.; Itin, B.; Stark, R. E.; Heredia, A.; Athanassiou, A.; Heredia-Guerrero, J. A., Sustainable fabrication of plant cuticle-like packaging films from tomato pomace agro-waste, beeswax, and alginate. *ACS Sustainable Chemistry Engineering* **2018**, 6 (11), 14955-14966.
102. Zhu, B.; Ni, F.; Xiong, Q.; Yao, Z., Marine oligosaccharides originated from seaweeds: Source, preparation, structure, physiological activity and applications. *Critical Reviews in Food Science Nutrition* **2020**, 1-15.
103. Tao, X.; Liu, B.; Hou, Q.; Xu, H.; Chen, J.-F., Enhanced accumulation and visible light-assisted degradation of azo dyes in poly (allylamine hydrochloride)-modified mesoporous silica spheres. *Materials Research Bulletin* **2009**, 44 (2), 306-311.
104. Zhou, S.; Li, X.; Shi, Y.; Alshameri, A.; Yan, C., Preparation, characterization, and Ce (III) adsorption performance of poly (allylamine)/silica composite. *Desalination Water Treatment* **2015**, 56 (5), 1321-1334.
105. Zhang, P.; Wu, T.; Kong, J.-L., In situ monitoring of intracellular controlled drug release from mesoporous silica nanoparticles coated with pH-responsive charge-reversal polymer. *ACS applied materials interfaces* **2014**, 6 (20), 17446-17453.
106. Qin, F.; Zhou, Y.; Shi, J.; Zhang, Y., A DNA transporter based on mesoporous silica nanospheres mediated with polycation poly (allylamine hydrochloride) coating on mesopore surface. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials* **2009**, 90 (2), 333-338.
107. Zhang, G.; Liu, B.; Zhang, Y.; Li, T.; Chen, W.; Zhao, W., Study on the effects of a π electron conjugated structure in binuclear metallophthalocyanines graphene-based oxygen reduction reaction catalysts. *Nanomaterials* **2020**, 10 (5).
108. Colbert, G. B.; Patel, D.; Lerma, E. V., Patiromer for the treatment of hyperkalemia. *Expert Review of Clinical Pharmacology* **2020**, 13 (6), 563-570.

109. Aggas, J. R.; Abasi, S.; Phipps, J. F.; Podstawczyk, D. A.; Guiseppi-Elie, A., Microfabricated and 3-D printed electroconductive hydrogels of PEDOT:PSS and their application in bioelectronics. *Biosensors and Bioelectronics* **2020**, 168.
110. Ali, S. W.; Rajendran, S.; Joshi, M., Effect of process parameters on layer-by-layer self-assembly of polyelectrolytes on cotton substrate. *Polymers and Polymer Composites* **2010**, 18 (5), 237-249.
111. Oliveira, J.; Petrov, V.; Parola, A. J.; Pina, F.; Azevedo, J.; Teixeira, N.; Brás, N. F.; Fernandes, P. A.; Mateus, N.; Ramos, M. J., Chemical Behavior of Methylpyranomalvidin-3-O-glucoside in Aqueous Solution Studied by NMR and UV–Visible Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* **2011**, 115 (6), 1538-1545.
112. Sousa, J. L.; Gomes, V.; Mateus, N.; Pina, F.; de Freitas, V.; Cruz, L., Synthesis and equilibrium multistate of new pyrano-3-deoxyanthocyanin-type pigments in aqueous solutions. *Tetrahedron Letters* **2017**, 73 (41), 6021-6030.
113. Al Bittar, S.; Mora, N.; Loonis, M.; Dangles, O., A simple synthesis of 3-deoxyanthocyanidins and their O-glucosides. *Tetrahedron Letters* **2016**, 72 (29), 4294-4302.
114. Gomes, V.; Mateus, N.; de Freitas, V.; Cruz, L., Synthesis and Structural Characterization of a Novel Symmetrical 2,10-Bis-Styryl-1-Benzopyrylium Dye. *Synlett* **2018**, 14 (10), 1390-1394.
115. Gomes, V.; Mateus, N.; de Freitas, V.; Cruz, L., Synthesis and chemical equilibria of a new 10-methylpyrano-2-styrylbenzopyrylium pigment in aqueous solution and its modulation by different micellar systems. *Dyes and Pigments* **2019**, 167, 60-67.
116. Gomes, V.; Guimaraes, M.; Goncalves, G.; de Freitas, V.; Cruz, L., Bioinspired Synthesis and Physical-Chemical Properties of a New 10-Methylpyrano-4'-hydroxyflavylium Chloride Salt. *Synlett* **2020**, 31 (04), 334-338.
117. Fulcrand, H.; dos Santos, P.-J. C.; Sarni-Manchado, P.; Cheynier, V.; Favre-Bonvin, J., Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *Journal of the Chemical Society* **1996**, (7), 735-739.
118. Fulcrand, H.; Benabdeljalil, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M., A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry* **1998**, 47, 1401-1407.
119. Lu, Y.; Foo, L. Y., Unusual anthocyanin reaction with acetone leading to pyranoanthocyanin formation. *Tetrahedron Letters* **2001**, 42 (7), 1371-1373.
120. Schwarz, M.; Winterhalter, P., A novel synthetic route to substituted pyranoanthocyanins with unique colour properties. *Tetrahedron Letters* **2003**, 44 (41), 7583-7587.
121. Cruz, L.; Petrov, V.; Teixeira, N.; Mateus, N.; Pina, F.; Freitas, V. d., Establishment of the chemical equilibria of different types of pyranoanthocyanins in aqueous solutions: evidence for the formation of aggregation in pyranomalvidin-3-O-coumaroylglucoside-(+)-catechin. *The Journal of Physical Chemistry B* **2010**, 114 (41), 13232-13240.
122. Mohan, T.; Kargl, R.; Tradt, K. E.; Kulterer, M. R.; Bračić, M.; Hribernik, S.; Stana-Kleinschek, K.; Ribitsch, V., Antifouling coating of cellulose acetate thin films with polysaccharide multilayers. *Carbohydrate polymers* **2015**, 116, 149-158.
123. Kim, D.-Y.; Nishiyama, Y.; Kuga, S., Surface acetylation of bacterial cellulose. *Cellulose* **2002**, 9 (3-4), 361-367.

- 124.** Li, W.; Li, X.; Wang, T.; Li, X.; Pan, S.; Deng, H., Nanofibrous mats layer-by-layer assembled via electrospun cellulose acetate and electrosprayed chitosan for cell culture. *European polymer journal* **2012**, *48* (11), 1846-1853.
- 125.** Corazzari, I.; Nisticò, R.; Turci, F.; Faga, M. G.; Franzoso, F.; Tabasso, S.; Magnacca, G., Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity. *Polymer Degradation Stability* **2015**, *112*, 1-9.
- 126.** Peniche-Covas, C.; Argüelles-Monal, W.; San Román, J., A kinetic study of the thermal degradation of chitosan and a mercaptan derivative of chitosan. *Polymer Degradation Stability* **1993**, *39* (1), 21-28.
- 127.** Moussout, H.; Ahlafi, H.; Aazza, M.; Bourakhouadar, M., Kinetics and mechanism of the thermal degradation of biopolymers chitin and chitosan using thermogravimetric analysis. *Polymer Degradation Stability* **2016**, *130*, 1-9.
- 128.** Shah, S. B.; Patel, C. P.; Trivedi, H. C., Fenton's reagent-initiated graft copolymerization of acrylonitrile onto sodium alginate. *Journal of Applied Polymer Science* **1994**, *51* (8), 1421-1426.
- 129.** Salisu, A.; Sanagi, M. M.; Naim, A. A.; Abd Karim, K. J.; Ibrahim, W. A. W.; Abdulganiyu, U., Alginate graft polyacrylonitrile beads for the removal of lead from aqueous solutions. *Polymer Bulletin* **2016**, *73* (2), 519-537.
- 130.** Zhou, B.; Hu, Y.; Li, J.; Li, B., Chitosan/phosvitin antibacterial films fabricated via layer-by-layer deposition. *International Journal of Biological Macromolecules* **2014**, *64*, 402-408.
- 131.** Shao, L.; Lutkenhaus, J. L., Thermochemical properties of free-standing electrostatic layer-by-layer assemblies containing poly (allylamine hydrochloride) and poly (acrylic acid). *Soft Matter* **2010**, *6* (14), 3363-3369.
- 132.** Palencia, M.; Córdoba, A.; Arrieta, A., Stimuli-sensitive nanostructured poly (sodium 4-styrene sulfonate): Synthesis, characterization, and study of metal ion retention properties. *Journal of Applied Polymer Science* **2018**, *135* (11), 46001.
- 133.** Sonia, A.; Dasan, K. P., Celluloses microfibers (CMF)/poly (ethylene-co-vinyl acetate)(EVA) composites for food packaging applications: A study based on barrier and biodegradation behavior. *Journal of Food Engineering* **2013**, *118* (1), 78-89.
- 134.** Prommakool, A.; Sajjaanantakul, T.; Janjarasskul, T.; Krochta, J. M., Whey protein-okra polysaccharide fraction blend edible films: tensile properties, water vapor permeability and oxygen permeability. *Journal of the Science of Food Agriculture* **2011**, *91* (2), 362-369.