



EDISON TUTOMU KATO JUNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR INTELIGENTE CONTENDO INDICADORES
DE H₂S**

**Campinas – São Paulo
2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
EDISON TUTOMU KATO JUNIOR**

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR INTELIGENTE CONTENDO INDICADORES
DE H₂S**

Orientadora: Telma Teixeira Franco

Co-orientadora: Cristiana Maria Pedroso Yoshida

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA COMO
PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM
ENGENHARIA QUÍMICA**

Este exemplar corresponde à versão final da defesa da Tese de Doutorado em Engenharia Química



Profª Drª Telma Teixeira Franco - Orientadora
DEPro/FEQ/UNICAMP

Campinas – São Paulo

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

K156d Kato Junior, Edison Tutomu, 1978-
Desenvolvimento de sensor inteligente contendo indicadores de H₂S / Edison Tutomu Kato Junior. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Telma Teixeira Franco.
Coorientador: Cristiana Maria Pedroso Yoshida.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Quitosana
. 2. Sensor. 3. Indicadores. I. Franco, Telma Teixeira, 1957-. II. Yoshida, Cristiana Maria Pedroso. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of intelligent sensor containing H₂S indicators

Palavras-chave em inglês:

Chitosan

Sensor

Indicators

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora:

Telma Teixeira Franco [Orientador]

Rosemary Aparecida de Carvalho

Pilar Rodriguez de Massaguer

Jamal da Silva Chaar

Fernando Rodrigo Frederico

Data de defesa: 12-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Tese de Doutorado defendida por Edison Tutomu Kato Junior e aprovada em 12 de julho de 2013 à banca examinadora constituída pelos doutores:



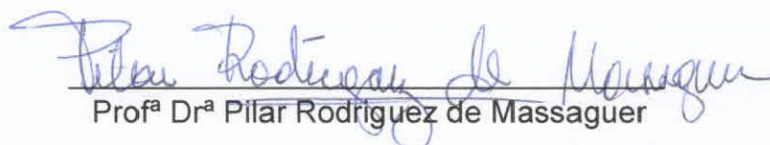
Profª Drª Telma Teixeira Franco

DEPro/FEQ/UNICAMP



Profª Drª Rosemary Aparecida de Carvalho

FZEA/USP



Profª Drª Pilar Rodriguez de Massaguer

Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello



Prof Dr Jamal da Silva Chaar

UFAM



Dr Fernando Rodrigo Frederico

FEQ/UNICAMP

RESUMO

Um sensor inteligente foi desenvolvido neste estudo, visando detectar a presença de gás sulfídrico (H_2S). A aplicação deste sensor pode ser abrangente, desde aplicações em controle de vazamentos na indústria petroquímica, até o controle de qualidade de produtos alimentícios, uma vez que o H_2S é um dos metabólitos liberado por microrganismos contaminantes em condições de anaerobiose. Este sistema tem a função de comunicar a presença de H_2S no caso de vazamentos na linha de recuperação em pontos críticos (juntas, válvulas, conexões, etc.) ou informar ao consumidor possíveis alterações microbiológicas no produto durante o transporte e armazenamento, indicando o estado de frescor do produto. O sensor biodegradável e inteligente foi desenvolvido a partir de filmes de quitosana, um polímero natural proveniente do descarte da indústria pesqueira, biodegradável e capaz de formar filmes resistentes, flexíveis e com eficiente barreira a oxigênio. A incorporação dos indicadores de H_2S produz um sinal colorimétrico como uma resposta rápida para a presença deste composto. O objetivo deste estudo consistiu na obtenção do sensor inteligente com indicadores de presença de H_2S , na caracterização do sensor quanto suas propriedades mecânicas, correlação da gramatura calculada/prática e capacidade de absorção de água, aplicação e avaliação de eficiência do sensor em ambiente real na análise da identificação de contaminação microbiológica e análises visando caracterizar a interação entre o indicador colorimétrico e a matriz de quitosana.

O presente trabalho deu origem ao depósito de uma patente junto ao INPI no dia 18 de dezembro de 2009, sob o número de protocolo 018090056144 e junto ao *Patent Cooperation Treaty* (PCT) no dia 24 de novembro de 2010, sob o número do processo internacional PCT/BR2010/000394.

Palavras-chave: quitosana, sensor inteligente, H_2S , indicadores

ABSTRACT

A smart sensor was developed in this study to detect the presence of hydrogen sulphide gas (H_2S). This sensor can be applied for leakage control in the petrochemical industry and also in quality control of food products, once the H_2S is one of the metabolites released by contaminating microorganisms under anaerobic conditions. This system has the function of communicating the presence of H_2S in the case of leaks in the recovery line at critical points (seals, valves, connections, etc.) in petrochemicals. It can inform the consumer possible microbiological changes in the product during transport and storage, indicating the state of freshness of the product. The biodegradable and smart sensor was developed using chitosan, a natural polymer derived from the disposal of the fishing industry, biodegradable and capable of forming resistant, flexible films and efficient barrier to oxygen. The accumulation of trash of hard degradation is increasing worldwide. The incorporation of H_2S indicators produces a colorimetric signal as a rapid response to the presence of this compound. The aim of this study was to obtain intelligent sensors with H_2S indicators, the characterization of the sensor as its mechanical properties, correlation of the calculated thickness / practice and ability to absorb water, efficiently evaluation in a real environment on the analysis of the identification of microbiological contamination and analysis to characterize the interaction between the chitosan matrix and the colorimetric indicator.

Keywords: chitosan, intelligent sensor, H_2S , indicators

Sumário

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
NOMENCLATURA	xix
CAPITULO 1	21
INTRODUÇÃO	21
OBJETIVOS.....	24
APRESENTAÇÃO DA TESE	24
CAPITULO 2	25
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1. Quitina e Quitosana	25
2.2. Filmes de Quitosana	26
2.3. Filmes inteligentes	26
2.4. H ₂ S e a indústria petroquímica.....	29
2.5. H ₂ S e a indústria de alimentos	30
2.6. Quitosana e Celulose.....	31
2.7. Interação Quitosana – Íon Metálico.....	31
CAPITULO 3	34
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1. Materiais	34
3.2. Métodos	34
3.2.1. Caracterização da quitosana	34
3.2.2. Extração de mioglobina	35
3.2.3. Filmes de quitosana.....	35

3.2.4. Avaliação das características dos filmes	36
3.2.5. Revestimento do papel cartão	36
3.2.6. Correlação da gramatura calculada e prática	37
3.2.7. Determinação do melhor parâmetro de cor no espaço CIELab a ser utilizado como resposta	38
3.2.8. Otimização dos filmes inteligentes.....	39
3.2.9. Exposição ao H ₂ S.....	40
3.2.10. Avaliação da eficiência da resposta colorimétrica dos filmes inteligentes	41
3.2.11. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	42
3.2.12. Caracterização mecânica	42
3.2.13. Capacidade de absorção de água (<i>Cobb Test</i>)	43
3.2.14. Avaliação da influência da umidade na eficiência de resposta do sensor inteligente de H ₂ S: CH-Fe.....	44
3.2.15. Avaliação em sistema real do sensor inteligente de H ₂ S: CH-Fe	46
3.2.16. Análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente	49
3.2.17. Difração de raios-X (XRD)	50
3.2.18. Análise termogravimétrica (ATG).....	50
3.2.19. Análise estatística dos dados	50
CAPITULO 4	51
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
4.1. Etapa 1 – Caracterização da quitosana, produção do sensor inteligente e avaliação da funcionalidade.....	51
4.1.1. Caracterização da quitosana	52
4.1.2. Produção dos filmes inteligentes e sensores.....	53

4.2. Etapa 2 – Otimização, avaliação da microestrutura e das propriedades mecânicas e de barreira do sensor inteligente.....	57
4.2.1. Determinação da gramatura prática e otimização do sensor quitosana-papel.....	59
4.2.2. Avaliação da microestrutura da matriz.....	67
4.2.3. Caracterização mecânica	69
4.2.4. Capacidade de absorção de água (<i>Cobb Test</i>)	70
4.2.5. Trabalho completo apresentado no XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química – XVIII COBEQ, Foz do Iguaçu/PR – Brasil, realizado de 19 a 22 de Setembro de 2010.	71
Desenvolvimento e otimização de sensor inteligente e biodegradável contendo indicador de H ₂ S	71
4.3. Etapa 3 – Avaliação da influência da umidade na eficiência de resposta do sensor inteligente CH-Fe	82
4.3.1. Isotermas de sorção	82
4.3.2. Trabalho completo apresentado no V Simpósio Ibero-Americano de Quitina – V SIAQ, Santiago do Chile – Chile, realizado de 7 a 10 de março de 2010. ...	90
Chitosan intelligent film: a fast detection of H ₂ S	91
4.3.3. Artigo publicado na revista indexada Polymer International, v.60, Issue 6, 2011 (Article first published online : 2 MAY 2011, DOI: 10.1002/pi.3095.....	103
4.3.4. Trabalho completo apresentado na X Conferência Internacional da Sociedade Européia de Quitina – 10 TH EUCHIS, São Petersburgo – Russia, realizado de 20 a 24 de maio de 2011.....	110
Characterization of a new hydrogen sulfide indicator	110
4.3.5. Trabalho completo apresentado no VI Simpósio Ibero-Americano de Quitina – VI SIAQ e XII Conferência Internacional de Quitina e Quitosana – XII ICCQ, Fortaleza – Brasil, realizados de 2 a 5 de setembro de 2012.	120

Characterization of a new H ₂ S chitosan intelligent sensor and study of the influence of moisture content.....	120
4.4. Etapa 4 – Avaliação do sensor inteligente em sistema real	133
4.4.1. Avaliação do sensor inteligente de H ₂ S: CH-Fe em sistema real	133
4.4.2. Determinação do nível de contaminação das embalagens cujos sensores apresentaram resposta positiva a presença do gás H ₂ S.	136
4.4.3. Trabalho em fase de submissão “ <i>A new contamination sensor to detect SRB contamination in meat</i> ”.	138
4.5. Etapa 5 – Análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente, investigação do elemento e/ou composto ligado a matriz de quitosana e avaliação de possíveis alterações químicas resultantes do processo de produção do sensor inteligente.....	157
4.5.1. Análise quantitativa dos elementos do sensor inteligente.....	157
4.5.2. Investigação do possível elemento ou composto químico ligado a matriz de quitosana.	168
4.5.3. Análise termogravimétrica do sensor inteligente.	172
4.5.4. Trabalho em fase de submissão “ <i>A new H₂S intelligent sensor: synthesis and characterization</i> ”.	175
CAPITULO 5	188
CONCLUSÕES	188
CAPITULO 6	190
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	190
CAPITULO 7	200
ANEXO – Patente depositada junto ao INPI no dia 18 de dezembro de 2009, sob o número de protocolo 018090056144 e junto ao Patent Cooperation Treaty (PCT) no dia 24 de novembro de 2010, sob o número do processo internacional PCT/BR2010/000394.....	200

À minha família amada: Edison (*in
memoriam*), Esther, Eduardo, Bruna,
Eduarda e Mariana.
Presentes de Deus.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por seu infinito amor e misericórdia.

À Prof^a. Dr^a. Telma Teixeira Franco (UNICAMP) pela orientação, pelo suporte e pela confiança.

À Prof^a. Dr^a. Cristiana Maria Pedroso Yoshida (UNIFESP) pela co-orientação, por ser um exemplo, pelo incentivo e pela amizade.

Aos Prof. Dr. Eric Guibal (*École des Mines d'Alès – France*) e Prof. Dr. Laurent David (*Université Claude Bernard Lyon1 – France*) pela co-orientação durante o doutorado sanduíche, pelo tempo, pela disponibilidade e pelo desprendimento.

Aos Thierry Vincent (*Laboratoire Génie de l'Environnement Industriel, École des Mines d'Alès – France*), Stephane Trombotto (*Département Chimie-Biochimie Ingénierie des Matériaux Polymères/Faculté des Sciences et Technologies, Université Claude Bernard Lyon 1 – France*) e Ruben Vera (*Centre de Diffractométrie/Faculté des Sciences et Technologies, Université Claude Bernard Lyon 1 – France*) pela dedicação e ajuda na realização da parte experimental durante o doutorado sanduíche.

A banca examinadora pelo tempo despendido, pela leitura atenta e cuidadosa, pela disponibilidade na conclusão deste trabalho.

Às minhas tias Hideko, Hieko, Kuniko, Yaeko e Yossiko pela compreensão, pelo carinho e incentivo.

A todos meus tios, tias, primos e primas que me dou o direito de não nomeá-los, pois certamente tomariam mais de uma página.

Ao grande homem e amigo estimado André Brun que me recebeu como parte de sua família e com sua sabedoria, exemplos de sua vida, alegria e sempre disposto a ajudar mostrou-me que os franceses são sim pessoas extremamente amáveis.

Aos amados padrinhos que ganhei de presente da França André e Annie Moulin pelo exemplo de vida e dedicação.

Aos amigos Adriana e Marcos, Andrée, Aziza, Bahia, Bia, Carol, Cathy, Celia, Christian, Dani, Diego, Fernanda, Florence, Gustavo, Guto, Hary, Henrique, Ingrid, Irene e Helder, Jean-Claude, Jean-Régis, Jeremy, Julia, Kenzo, Lê Thăng, Lionel, Noémie, Paulina e Paweł, Phan Thanh Lượng, Philippe, Rafael, Raíza, Rita, Robertta, Rosario e Sylvie, Roussy, Sandra, Sébastien, Thanh Liêm Phan, Thơ Trang, Tien Dung Nguyen, Trắng Thu e Yu Dany pelos bons momentos.

Às alunas de iniciação científica Marina Vicentini e Mariana Mendonça pela ajuda e oportunidade de aprendizado.

Aos amigos Adriana, Allan, Ariele, Cíntia, Cláudia, Danielle, Débora, Edson, Élio, Fábio, Fabrício, Flávio, Guilherme, Hanu, Hideki, Karen, Kelly, Lissandra, Luciana, Mariana, Marisa, Nelson, Patrícia, Risa, Rodrigo, Sandra, Sérgio, Sheila, Sueli, Taninha e Wilson pelos momentos de comunhão.

Aos amigos de pós Alessandro, Andréia, Annamaria, Arlete, Bianca, Camilo, Cecília, Eduardo, Érica, Érika, Fernando, Giselle, Jaiver, Lilina, Lucy, Maricy, Michelle, Mônica, Renato, Saartje, Sergio, Talita, Tony, Verônica e Vinícius pela amizade profissional e pessoal e pelos momentos de confraternização.

Aos funcionários da FEQ: Adilson (LRAC), Alex (SIFEQ), Alexandre (eletricista), Cleverson (SIFEQ), Edgar (manutenção), Emerson (eletricista), Everton (secretário DEPro), Fabiane (limpeza), Fátima (limpeza), Henrique (patrimônio), Kelly (LRAC), Lourdes (limpeza), Lu (SIFEQ), Márcia (secretária da pós), Maria Helena (limpeza), Marquinho (financeiro), Noka (ATU), Pazini (Almoxarifado), Rita (assistente administrativa), Roberto (SIFEQ), Rogério (informática) e Rosângela (secretária de convênios DEPro) pelos incontáveis favores.

Às agências de fomento à pesquisa: FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado, CAPES pela concessão da bolsa do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior – PDEE realizado na *École des Mines d'Alès* e na *Université Claude Bernard Lyon1* – França.

A TODOS O MEU MUITO OBRIGADO!

“Toute réussite déguise une abdication (Todas as vitórias ocultam uma abdicação).

Le présent n'est pas un passé en puissance, il est le moment du choix et de l'action
(O presente não é um passado em potencial, ele é o momento da escolha e da ação)”

Simone de Beauvoir

“Alguns homens veem as coisas como são e dizem: Por quê? Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo: Por que não?”

George Bernard Shaw

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser, mas Graças a Deus não somos o que éramos.”

Martin Luther King

NOMENCLATURA

Abreviação / símbolo	Significado	Unidade
τ	Concentração	-
A	Absorbância	-
A	Área	mm ² , cm ² ou m ²
a*	Parâmetro de cor croma a* indica a variação no espaço de cor do verde para o vermelho	-
b*	Parâmetro de cor croma b* indica a variação no espaço de cor do azul para o amarelo	-
BET	<i>Brunauer, Emmet and Teller</i>	-
CH-Fe	Sensor inteligente em suporte físico (papel) contendo íons Fe	-
CH-Mg	Sensor inteligente em suporte físico (papel) contendo mioglobina	-
CMD	<i>Cross Machine Direction</i>	-
DA ou GA	Grau de acetilação	%
DD, DDA ou GD	Grau de desacetilação	%
dn/dc	Índice diferencial de refração	-
F _A	Fração molar de N-acetilglucosamina	-
Fm-Fe	Sensor inteligente na forma de filme contendo íons Fe	-
Fm-Mg	Sensor inteligente na forma de filme contendo mioglobina	-
GAB	<i>Guggenheim, Anderson and de Boer</i>	-
GlcN	Glucosamina	-
GlcNAc	N-acetil glucosamina	-

Abreviação / símbolo	Significado	Unidade
IP	Índice de polidispersividade	-
L*	Parâmetro de luminosidade	-
m	Massa	µg, mg ou kg
MD	<i>Machine Direction</i>	-
Mn e Mw	Massa molar media numérica e ponderal	g mol ⁻¹
P	Pressão	mbar
R	Taxa	-
R ²	Coeficiente de regressão	%
T	Temperatura	° C
t	Tempo	s, min ou h
TNTC	<i>Too Numerous to Count</i>	-
UFC ou CFU	Unidades formadoras de colônia	-
UR ou RH	Umidade relativa	%
UV/VIS	Ultra Violeta / Visível	A
v ou V	Volume	mL, cm ³ , dm ³ ou m ³
w	<i>Weight</i> - Peso	g mol ⁻¹
WVPR	Permeabilidade ao vapor de água	%
β-FeO(OH)	Akaganeíta	-
ρ	Densidade molar	mol dm ⁻³

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO

Para indústria petroquímica, o H_2S é um efluente conduzido para linha de recuperação de enxofre ou para queimadores tipo *flare*, neste percurso podem ocorrer emissões fugitivas que conforme a concentração conferem riscos diversos à saúde do trabalhador. Segundo Campos (2003), no homem a principal via de penetração é a respiratória. Experimentos com animais de laboratório mostraram absorção através da pele; contudo, no homem, a absorção por essa via é discutida.

Segundo Dainty (1996) a produção de H_2S pode ser usada como um indicador de enterobactérias assim como problemas de higiene em carnes estocadas em ambiente aeróbio.

Em alimentos, microrganismos patogênicos são responsáveis por grande parte de doenças por intoxicação alimentar, podendo ser letal em crianças, idosos e pessoas com deficiências no sistema imunológico. Dentre os microrganismos contaminantes, pode-se destacar os *Clostridium sp* quanto à importância sanitária. *Clostridium sp* tem sido identificado como um dos principais produtores de compostos de enxofre e microrganismo deteriorante (Arnaut-Rollier et al., 1999). Os alimentos, contaminados com *Clostridium sp*, geralmente implicados são: palmito, mel, carne de mamíferos e aves frias ou requentadas, empanadas, molhos e de modo especial os pratos pré-cozidos. A patologia clínica é conhecida como botulismo, geralmente estabelecida por intoxicação alimentar em consequência da ingestão da toxina pré-formada no alimento contaminado (Trabulsi, 1998). Recentemente, um alerta foi feito na mídia para evitar o consumo de mel por crianças com idade inferior a 1 ano, devido a incidência do *Clostridium sp* no produto. Fatos como relatados pela notícia divulgada (3 de setembro de 2012) pela Anvisa em seu portal eletrônico onde quatro casos de botulismo em uma mesma família, ocorridos no município de Nova Canaã Paulista/SP poderiam estar associados a ingestão de alimentos contaminados; o surto de botulismo ocorrido na cidade de Araquari/SC na primeira quinzena de março onde sete pessoas ficaram doentes e

uma morreu após consumirem mortadela segundo nota técnica conjunta nº 1/2011 da Anvisa e da Secretaria de Vigilância em Saúde e os quatro casos de botulismo alimentar no Paraná resultando em dois óbitos, ocasionados pelo consumo de um tipo de salsichão na forma crua confirmados pela Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, em 16 de março de 2012. Poderiam ter sido evitados pela simples visualização do sensor indicando pela alteração de cor que os referidos alimentos apresentavam-se impróprios ao consumo.

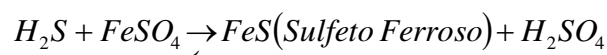
Os indicadores rápidos de H₂S e contaminação microbiana selecionados neste trabalho foram a mioglobina e sulfato ferroso (FeSO₄).

A mioglobina é a principal heme proteína encontrada no músculo cardíaco e esquelético, ela esta presente em três formas: oximioglobina, desoximioglobina e metamioglobina. As duas primeiras formas apresentam o íon de ferro no estado oso (Fe²⁺) enquanto que a metamioglobina apresenta o íon ferro no estado ico (Fe³⁺). As três formas da mioglobina estão em constante interconversão nos musculos frescos (Govindarajan, 1973).

A mioglobina reage com o gás sulfídrico formando uma quarta forma, a sulfomioglobina de coloração esverdeada (Paine & Paine, 1992) e foi utilizada como indicador de gás sulfídrico por Smolander *et al* (2002) em cortes de frangos apresentando uma sensibilidade de 0,63ppm em um filme de concentração igual a 4µg/mm².

Os sais de ferro são amplamente usados no tratamento da anemia, como complemento nutricional no período pré-natal e suplemento vitamínico no uso diário, cerca de 20% do FeSO₄ é constituído de ferro. Este sal é considerado terapêutica padrão para correção da anemia ferropriva (ANVISA, 2013).

O FeSO₄ apresenta baixa ou nenhuma toxicidade e reage com o gás sulfídrico formando sulfeto ferroso de coloração preta. Este é o principio utilizado em meios de cultura como o meio SIM (Sulfito, Indol, Motilidade) para prova bioquímica da positividade da formação de gás sulfídrico em produtos contaminados por *Clostridium* produtor de H₂S. A reação consiste em:



A consciência ambiental do consumidor vem aumentando bem como a procura por alternativas para redução do lixo de difícil degradação gerado pelos polímeros sintéticos. Segundo Mansur (2006), estima-se que 30% em volume do lixo refere-se a fração de plásticos. O acesso a uma melhor educação e informação tem direcionado o gosto do consumidor a produtos orgânico/naturais, alimentos ou medicamentos, estando dispostos a pagar um valor superior aos produtos tradicionais. Assim os polímeros naturais apresentam várias vantagens, como disponibilidade (recursos marinhos, agricultura de reposição), biocompatibilidade, biodegradabilidade, além da segurança ecológica e a possibilidade de obtenção de uma variedade de derivados químicos ou enzimáticos para usos específicos (Prashanth e Tharanathan, 2007).

Nesta última década, inúmeros estudos foram desenvolvidos visando a produção e caracterização de filmes biodegradáveis à base de macromoléculas naturais, como quitosana (Yoshida, 2009; Yoshida, 2010), proteínas de soro de leite (McHugh & Krochta, 1994; Yoshida, 2002; Yoshida & Antunes, 2004), gelatina (Sobral, 2001; Carvalho & Grosso, 2006; Catalina *et al*, 2011; Chambi e Grosso, 2011), zeína (Gennadios & Weller, 1991), proteína miofibrilar (Sobral, 2000), PLA (Rhim e Kim, 2009; Ahmed e Varshney, 2011), amido de milho (Ghanbarzadeh, Almasi e Entezami, 2011) e outros, entretanto a abordagem da aplicação destes materiais ainda é escassa na literatura especializada.

O sensor inteligente desenvolvido neste projeto foi produzido através do revestimento de uma matriz celulósica (papel cartão) por uma solução de quitosana contendo indicador colorimétrico do gás H_2S ($FeSO_4$ ou mioglobina). Uma análise econômica prévia foi realizada e o custo estimado de produção do sensor desenvolvido neste projeto foi de US\$0,25.

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento do sensor inteligente com indicadores de presença de H_2S , sua caracterização quanto às propriedades mecânicas, correlação da gramatura calculada/prática e capacidade de absorção de água, aplicação/avaliação de eficiência do sensor em ambiente real na análise da identificação de contaminação microbiológica e caracterização da interação entre o indicador colorimétrico e a matriz de quitosana.

APRESENTAÇÃO DA TESE

A presente tese de doutorado está dividida em 7 capítulos.

No primeiro capítulo a introdução, os objetivos do estudo e a descrição da tese são apresentados.

No Capítulo 2 encontra-se a revisão bibliográfica.

O terceiro capítulo foi dedicado à descrição do material e dos métodos utilizados ao longo da realização dos trabalhos.

O quarto capítulo apresenta os resultados, discussões e os trabalhos publicados em revistas científicas e/ou congressos.

O quinto capítulo traz as conclusões gerais do trabalho.

O sexto capítulo lista as referências bibliográficas.

O sétimo capítulo apresenta o pedido de depósito da patente resultante do caráter inovador do trabalho.

CAPITULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Quitina e Quitosana

A quitina, matéria-prima para obtenção da quitosana, é um biopolímero composto de cadeias não ramificadas de N-acetilglicosamina unidas por ligações β -1,4. A quitosana (Figura 1) é um polissacarídeo obtido através da desacetilação da quitina (Comma *et al*, 2002) constituído predominantemente por unidades de glicosamina ligadas linearmente por ligações glicosídicas β -1,4, com vários níveis de acetilação. Para diferenciar os dois polímeros, costuma-se definir como quitosana o polímero com F_A (fração molar de N-acetilglucosamina) abaixo de 0,4 (Roberts, 1992; Peter, 2002).

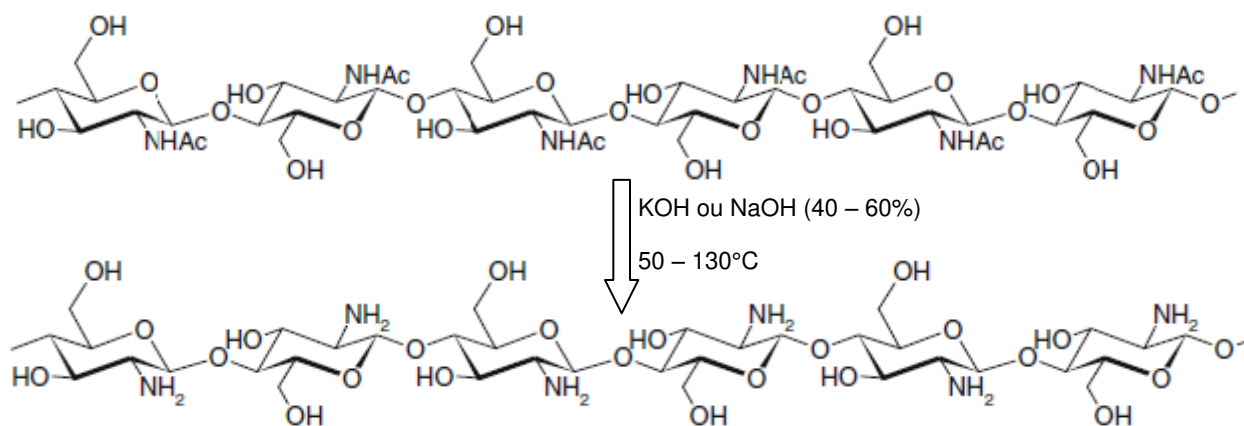


Figura 1. Reação de desacetilação da quitina.

O grau de acetilação (DA), grau de desacetilação (DD ou DDA), fração molar (F_A) ou a quantidade de grupos residuais de acetil da molécula conferem diferentes propriedades deste polissacarídeo. Maiores valores de F_A promovem rigidez, inflexibilidade da cadeia e menor solubilidade em solução de ácido acético (1%). Assim, se o polímero contém glucosamina acetilada (GlcNAc) em até 40% ($F_A=0,4$), é solúvel em ácido acético 1% (m/v). A quitina retirada da cutícula de insetos

encontra-se acetilada em 90% ($F_A=0,9$). A quitosana é obtida a partir da quitina seguindo uma sequência de processos tais como: desproteínização, desmineralização e desacetilação e sua massa molar depende das condições do processo de desacetilação (Peter, 2002).

2.2. Filmes de Quitosana

O mecanismo de formação dos filmes de quitosana baseia-se na gelatinização, que corresponde a uma reorganização molecular da matriz envolvendo inicialmente a quebra seguida da formação de novas ligações. As interações de atração na matriz (pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e outras) equilibram com as interações repulsivas, que correspondem essencialmente a solvatação de grupos hidrofílicos (Vachoud *et al.*, 2000). A quitosana pode ser considerada como um agente formador de filmes porque o grupo amino NH_2 presente na sua molécula pode ser protonado a NH_3^+ , formando interações eletrostáticas com grupos aniônicos de soluções ácidas (Xu *et al.*, 2005).

Os filmes de quitosana foram caracterizados pela elasticidade, flexibilidade e difícil rompimento, além disto, formam uma matriz filmogênica coesa (ausência de poros ou falhas) e apresentam coloração levemente amarelada (Butler *et al.*, 1996, Yoshida *et al.*, 2009). Em comparação com filmes poliméricos comerciais, o filme de quitosana apresenta uma eficiente barreira de permeação a gases (Pinotti *et al.*, 2007).

2.3. Filmes inteligentes

O potencial de aplicação de filmes inteligentes no setor de embalagens vem crescendo devido a uma maior exigência do consumidor no que se refere a segurança, qualidade e praticidade (Butler, 2006). Geralmente, filmes ou embalagens inteligentes utilizam indicadores, que são definidos como substâncias que indicam a presença ou ausência de uma substância ou a ocorrência de reação entre duas ou mais substâncias através de variações nas características, especialmente

colorimétricas. (Kerry *et al.*, 2006). Indicadores visuais são compostos que alteram a cor dependendo das características físico-químicas da solução em que estão dispersos, em função de fatores como pH, potencial elétrico, complexação com íons metálicos, adsorção em sólidos e outros. Segundo Lee *et al.* (2006), a detecção colorimétrica é a mais fácil e conveniente metodologia.

Diferentes estudos foram realizados utilizando a incorporação de indicadores de frescor, vazamentos em embalagens, e outros. Smolander, Hurme & Ahvenainen (1997) desenvolveram um indicador sensível ao oxigênio visando a detecção de vazamentos em embalagens de atmosfera modificada como também a eficiência de absorvedores de oxigênio, associando que um típico indicador colorimétrico de O₂ consiste em um pigmento sensível a oxi-redução, um componente redutor e um componente alcalino. Como exemplo pode-se citar o indicador de integridade da embalagem proposto por MacGill & Sacks (1990), onde os componentes principais do indicador são azul de metileno, bórax, ácido tioglicólico e o vermelho de fenol onde a mudança ocorre do transparente para azul. O pigmento reduzido foi oxidado pelo O₂ produzindo uma alteração de cor sendo que o pigmento mais comumente usado é o azul de metileno (MacGill & Sacks, 1990).

Smolander *et al.* (2002) avaliaram a ação da mioglobina como indicador de frescor para carne de frango embalada em atmosfera modificada. Alíquotas de aproximadamente 0,33 $\mu\text{L}/\text{mm}^2$ de uma solução de mioglobina solubilizada em tampão pH 6,8 (50 mg/mL) foram aplicadas em pequenos quadrados de agarose gel (2% em 40 mM de tampão fosfato de sódio pH 6,8). A solução de mioglobina foi adsorvida na agarose por um período de 18 horas a temperatura aproximada de 4°C, obtendo-se uma quantidade final de 4,13 a 33,05 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$. Os quadrados de agarose/mioglobina foram termo-soldados entre dois filmes de polietileno de baixa densidade (PEBD) sendo de um lado um PEBD branco de 25 μm de espessura e na outra face um PEBD transparente de 50 μm de espessura. Esse sistema foi comparado com um que substituiu PEBD por cloreto de polivinila (PVC), aproximadamente 20 μm de espessura, e papel coberto com polietileno (PE). A mudança de cor do indicador contendo diferentes quantidades de mioglobina em presença de H₂S foi estudada em condições anaeróbias *in vitro*. Os indicadores

sofreram mudança de cor do marrom para o verde quando em contato com o H_2S e essa alteração foi nítida nos indicadores que apresentavam a menor composição estudada, 0,5 mg de mioglobina/indicador, porém segundo os autores a maior composição estudada, 4mg de mioglobina/indicador, apresentou maiores variações do parâmetro de cor estudado.

Os indicadores preparados com materiais mais permeáveis (PVC e papel revestido com PE) obtiveram uma mudança visível da cor em um menor intervalo de tempo (1h de reação com 1,3 mg/L H_2S) quando comparados com PEBD (3h de reação). A sensibilidade dos indicadores a base de mioglobina ao H_2S foi estudado usando os indicadores preparados com PVC, expondo os indicadores a diferentes concentrações de H_2S na faixa de 0,06mg/L a 0,63 mg/L em headspace de 22, 62 e 120 mL. O objetivo desse estudo foi estudar não somente os efeitos da concentração de H_2S como também os efeitos da quantidade total de H_2S no headspace. Em todas as conduções de *headspace*, a maior concentração (0,63mg/L) de H_2S levou a mudança mais perceptível na cor do indicador. Segundo os autores, o início da reação depende da concentração local de H_2S e independe do volume do headspace, sendo que a quantidade total de H_2S torna-se importante com o início da reação (Smolander *et al.*, 2002).

Fornari (2006) avaliou um indicador, na forma de etiqueta para embalagem constituído de polietileno linear de baixa densidade e vermelho congo como indicador na proporção de 0,004 g de indicador / g de polímero, sensível à variação de pH, visando indicar a evolução do processo de acidificação de alimentos.

Um sistema para controle de qualidade de substâncias orgânicas (alimentos e medicamentos) foi patenteado por Wolfbeis *et al.* (1995), para detecção da formação de H_2S . Os autores propuseram uma emulsão formada por silicone PE 1055A, inibidor de polimerização PS 925, solução 40% $PbNO_3$ (com 34mg de dodecil sulfato de sódio, $NaC_{12}H_{25}SO_4$) e 2% de dióxido de titânio. As substâncias orgânicas foram misturadas com um componente de cura (silicone PE 1055B) para promover as ligações cruzadas, o material obtido era utilizado para recobrir o material de embalagem na extensão e espessura desejada por um período de cura de 24 horas a temperatura ambiente ou por 2 horas a 50°C. O resultado foi um sensor de

coloração branca que ao reagir com H_2S alterava para a cor marrom acinzentado e então para cor negra.

Segundo Kruijf et al (2002) os indicadores de frescor tem como base a detecção de metabólitos voláteis (CO_2 , diacetil, aminas, amônia e gás sulfídrico) produzidos durante a vida de prateleira dos alimentos.

Pacquit et al. (2007) desenvolveram um sensor colorimétrico para monitoramento do estado de frescor de pescados através da detecção de bases nitrogenadas voláteis totais utilizando como indicador de pH o verde de bromocresol.

2.4. H_2S e a indústria petroquímica

Na indústria petroquímica o H_2S é oriundo do tratamento do óleo bruto por uma solução de dietanolamina (DEA), tal processo de tratamento é necessário, pois os derivados de petróleo, tais como são produzidos, nem sempre se enquadram nas especificações requeridas, especialmente no que diz respeito ao teor de enxofre. Nesse processo, soluções de etanolaminas (mono, di e tri) têm a propriedade de se combinar com o H_2S , formando produtos estáveis em temperaturas próximas a do ambiente. No entanto estes produtos se decompõe quando aquecidos, regenerando a solução original e liberando o gás (H_2S) anteriormente absorvido, que pode ser então enviado à uma unidade de recuperação de enxofre ou queimado em um *flare* (Mariano, 2001).

Vários acidentes com vazamentos de H_2S para o meio ambiente ocorreram acarretando, conseqüentemente, intoxicações e mortes e nem sempre registradas pela mídia e nem pelos Órgãos de Saúde Pública. O jornal Estado de S. Paulo (1996) informou que três operários morreram no Rio Grande de Sul ao entrar em um silo de estocagem de milho. A deterioração do milho gerou altos teores de H_2S ocasionando o envenenamento dos operários (Mainier, 2003).

Segundo Goodman & Gilman (1987), apesar do seu odor característico e desagradável, o H_2S em teores acima de 150ppm provoca a perda da sensação de odor, que é devido à fadiga do sistema olfatório sensitivo pela destruição dos nervos (neuroepitélio olfatório) responsáveis por esta função.

Segundo matéria escrita por Balbi (2001) vinculada pelo O GLOBO em 26 de janeiro, acredita-se que o vazamento de gás natural contaminado por H₂S na plataforma P-37 da Petrobrás fora a razão da morte de dois funcionários da prestadora de serviços.

2.5. H₂S e a indústria de alimentos

Nos alimentos, os microrganismos são normalmente controlados por remoção, inibição da multiplicação ou destruição (Fellows, 1998; Hayes, 1993). Atualmente os processos utilizados dependem da sensibilidade dos microrganismos a serem controlados e da natureza do produto. Uma forma de controlar o desenvolvimento microbiano em alimentos é a utilização de técnicas de embalagem como, por exemplo, a atmosfera modificada, que consiste em um sistema de embalagem hermético confeccionado com material que ofereça alta barreira onde substitui-se o ar por um gás ou uma mistura de gases inertes (McMillin, Huang, Ho, & Smith, 1999). As embalagens com atmosfera modificada previnem o desenvolvimento de microrganismos aeróbios, porém não impede a degradação por microrganismos anaeróbios, anaeróbios facultativos e microaerófilos. Dentre os microrganismos contaminantes em alimentos, pode-se destacar os Clostrídios sulfitos redutores quanto à importância sanitária.

A qualidade microbiológica pode ser determinada pela reação entre indicadores e o desenvolvimento de metabólitos microbianos: etanol, ácido acético, ácido láctico, ácido sulfídrico são indicadores do metabolismo fermentativo de bactérias heterofermentadoras. Variações no pH, presença de aminas, produção de dióxido de carbono são indicadores de frescor de produtos alimentícios, onde a maioria é baseada na mudança de cor como resposta do desenvolvimento de metabólitos microbianos produzidos durante a deterioração (Smolander, 2002).

2.6. Quitosana e Celulose

O aumento da preocupação dos consumidores com o meio ambiente acarretou em uma demanda para a substituição de embalagens feitas a partir de polímeros sintéticos por materiais renováveis e biodegradáveis. Materiais a base de celulose são os mais utilizados para embalagens renováveis, entretanto apresentam baixa barreira a gases e umidade (Gällstedt & Hedenqvist, 2005).

A quitosana combinada com celulose vêm sendo estudada como aditivo na produção de papel e no tratamento da superfície do papel por décadas. Essa combinação aumenta a resistência mecânica dos papéis e melhora a retenção de cor do papel cartão (Allan *et al.*, 1989; Makino & Hirata, 1997; Struszczyk & Kivekäs, 1990). A printabilidade do papel aumenta com a adição de quitosana (Thomson, 1985), possivelmente devido a redução da absorção de água.

Segundo foi estudado a quitosana é quase que totalmente adsorvida sobre a superfície das fibras celulósicas, e que essa adsorção aumenta quanto maior o grau de desacetilação. Os possíveis meios de interação entre a quitosana e os substratos celulósicos podem ser: ligações de hidrogênio, interação eletrostática, forças de van der Waals, ligações covalentes e por agregação ou associação (Li, Du e Xu, 2004).

2.7. Interação Quitosana – Íon Metálico

Uma das principais aplicações da quitosana é baseada na sua habilidade em quelar íons metálicos, devido ao seu grande número de grupamentos quimicamente ativos ($-NH_2$ e $-OH$) (Ding, Xia e Nanosci, 2006; Klepka, 2008).

Vários estudos confirmaram a capacidade quelante da quitosana com metais, onde os grupamentos amino ($-NH_2$) das moléculas de quitosana são responsáveis pela captura dos cátions metálicos por quelação (Helander *et al.*, 2001).

Diferentes modelos para o complexo quitosana-metal tem sido propostos. No modelo “pendente”, o íon metálico é ligado a molécula de quitosana pelo grupamento $-NH_2$, enquanto que no modelo “ponte ou quelante” os íons metálicos são

coordenados por vários grupamentos -NH_2 de uma mesma ou diferentes moléculas de quitosana (Mazeau, Winter e Chanzy, 1994). Diversas técnicas têm sido utilizadas para investigar esses mecanismos de interação, entre eles o dicroísmo circular, a espectrofotometria UV, espectrometria de infravermelho, espectrometria de Mossbauer, potenciometria e titulação calorimétrica (Guibal, 2004).

Guibal (2004) propôs um modelo baseado no sistema quitosana-cobre relacionando o pH com a proporção de sítios disponíveis para interação na molécula de quitosana. Valores de pH menores que 6, a complexação envolve apenas um grupamento -NH_2 e três hidroxilas (-OH) ou moléculas de água, enquanto que em valores maiores ($\text{pH} > 6,7$) considerou provável que tenham dois grupamentos -NH_2 envolvidos na interação e para valores superiores de pH, por exemplo valores entre 7 e 9, foi considerado que a interação seja governada por dois grupamentos -NH_2 e duas -OH .

De maneira similar Wang *et al.* (2005), utilizando as técnicas espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e difração de raios-X, propuseram que o íon metálico serviria como acceptor de elétrons e estaria ligado a uma ou mais moléculas de quitosana através de grupamentos -NH_2 e pontes de hidrogênio ligando as moléculas de quitosana, como mostra a Figura 2.

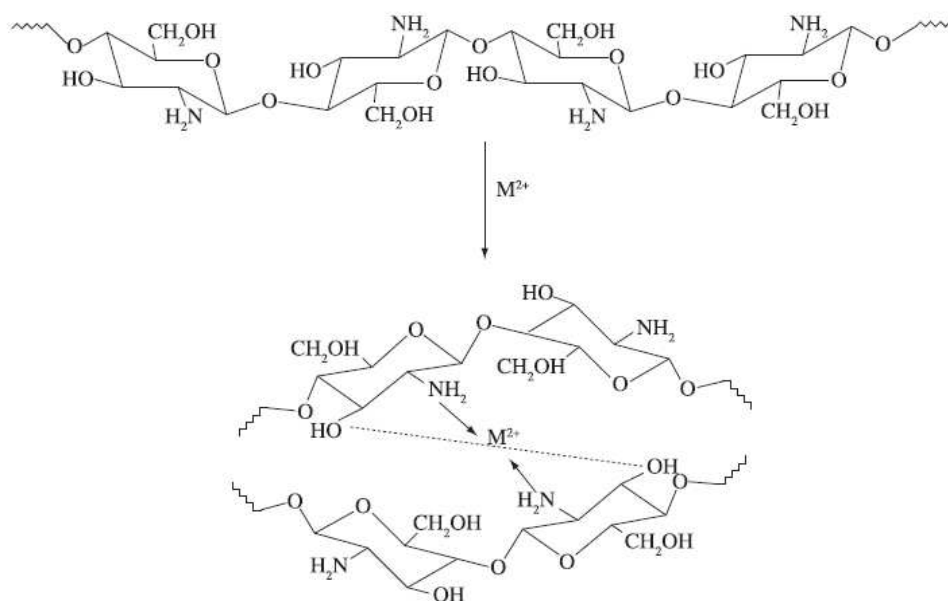


Figura 2. Modelo do complexo quitosana-metal de acordo com o modelo proposto por Wang *et al.* (2005).

Estudos de complexos de quitosana-cobre e de quitosana-ferro tem indicado que tanto os grupamentos -NH_2 quanto as -OH se ligam aos íons metálicos e mais de uma cadeia polimérica está envolvida com a formação do complexo (Ogawa *et al.*, 1984; Ogawa, 1986).

Segundo Trimukhe e Varma (2008) as propriedades cristalinas e morfológicas dos complexos quitosana-metal são diferentes das propriedades da quitosana, os íons metálicos são especificamente complexados pelos grupamentos -NH_2 da molécula de quitosana.

A Figura 3 ilustra o modelo proposto por Wang *et al.* (2010), obtido através das técnicas de FT-IR e espectrometria de foto-elétrons de raios-X, onde os íons de ferro (Fe(II) e Fe(III)) estão difundidos na solução de quitosana e quelados com os grupamentos ativos da quitosana (-NH_2 e -OH), na proporção molar de dois grupamentos -NH_2 por íon metálico.

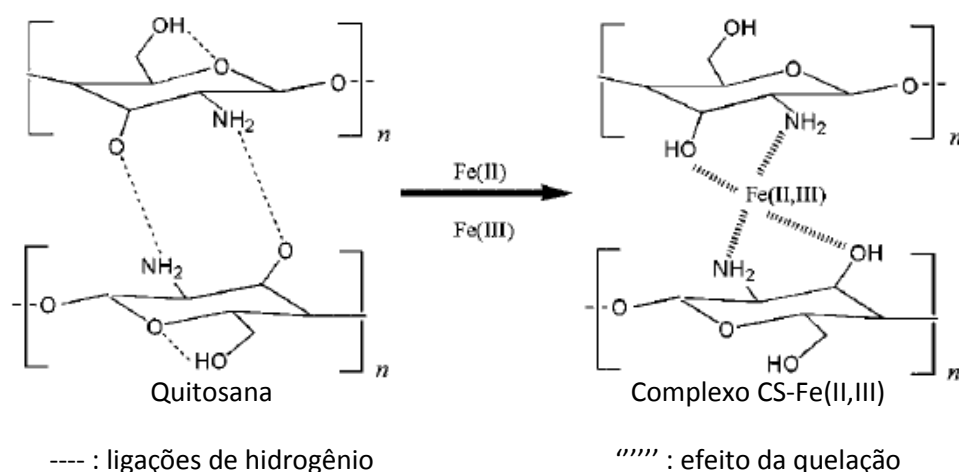


Figura 3. Mecanismo de complexação proposto por Wang *et al.* (2010).

CAPITULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Materiais

Quitosana (Primex, Islândia); ácido acético (Synth, Brasil); soluções indicadoras de H_2S (mioglobina, Sigma/Alemanha, e FeSO_4 , Merck/Brasil); carbonato de sódio, Na_2CO_3 (Synth, Brasil); sulfeto ferroso, FeS (Sigma, Alemanha); ácido clorídrico, HCl (Synth, Brasil); papel cartão Triplex TP250 (250 g/m^2 ; 0,5 mm de espessura, Suzano Papel e Celulose Ltda, Brasil); Anaerogen (Probac do Brasil); mioglobina (Sigma, Alemanha); *Reinforced Clostridial Medium*, RCM (Sigma, Alemanha); glicose (Sigma, Alemanha); agar (Sigma, Alemanha)

3.2. Métodos

3.2.1. Caracterização da quitosana

3.2.1.1. Massa molecular

As características de formação da matriz polimérica a partir de soluções filmogênicas à base de quitosana estão diretamente relacionadas com a massa molecular e o grau de acetilação da quitosana. A massa molecular da quitosana foi determinada de acordo com Hirai *et al.* (1991), utilizando-se um cromatógrafo de exclusão por tamanho, SEC-RALLS ANGLE (Modelo TODA 302, Viscotek). Esse cromatógrafo emprega um detector de índice de refração, para fornecer informações como concentração do polímero, e detectores de espalhamento de luz a 7° e a 90° , os quais fornecem informações como a massa molar da amostra, não há necessidade da utilização de uma calibração convencional, devido à utilização dos diferentes detectores em conjunto, sendo necessária somente a injeção de um padrão característico para calibração do equipamento.

3.2.2. Extração de mioglobina

Na extração de mioglobina foi utilizado o procedimento adaptado de Geileskey (1998). A uma porção de 100g do músculo *longissimus dorsi* (contra-filé) picado foi adicionado 240mL de tampão fosfato 0,1M (pH 6,5) em seguida homogeneizou-se a 15.000 rpm por um período de 20 segundos, utilizando um ultra-homogeinizador modelo TE-102 Turratec (Tecnal, Brasil). O caldo obtido foi centrifugado a 5.000g por 15 minutos, utilizando-se uma centrífuga modelo Rotina 420 (Hettich-Zentrifugen) e o sobrenadante foi filtrado com lã de vidro. O volume foi ajustado em balão volumétrico de 500mL com tampão fosfato. Com o resíduo insolúvel foi repetido o processo, porém por um período de 20 segundos. O extrato obtido foi quantificado, liofilizado e armazenado a 4°C.

Mioglobina comercial (Sigma-Aldrich) com pelo menos 99% de pureza foi utilizada para construção de uma curva padrão para quantificação do teor de mioglobina no extrato por espectroscopia a 525 nm (Figura 12).

3.2.3. Filmes de quitosana

A metodologia de produção dos filmes foi adaptada de Yoshida *et al.* (2009). Os filmes foram produzidos por via úmida a partir de solução de 3g/100g de solução filmogênica de quitosana, dispersa em solução contendo o indicador colorimétrico aquoso (FeSO_4 ou mioglobina). A concentração do indicador foi definida através do planejamento experimental descrito no item 3.2.8. A utilização de solução ácida mostrou em testes preliminares a diminuição do efeito quelante da quitosana com relação ao íon ferroso. Inicialmente o ácido acético foi adicionado estequiometricamente, de acordo com o grau de acetilação da quitosana (evitando excesso de ácido), sob agitação contínua até solubilização total da mesma. A espessura dos filmes foi mantida constante controlando-se a relação massa/área (g/m^2) aplicada no suporte plano (placas de Petri plásticas). A etapa seguinte

correspondeu à evaporação do solvente, pelo processo de secagem a $T = 30^{\circ}\text{C}$ em incubadora com circulação de ar (BOD TE-391 – Tecnal, Brasil).

3.2.4. Avaliação das características dos filmes

- Aspecto Visual – caracterização visual, tátil, olfativo. Os filmes foram avaliados quanto às seguintes características:
 - Homogeneidade: avaliação quanto à presença de partículas insolúveis visíveis, zonas de opacidade, cores heterogêneas. Assim como, espessura, estrutura, cor e transparência devem apresentar uniformidade.
 - Continuidade: presença de fraturas ou rupturas.
 - Manuseio: a facilidade em retirar os filmes do suporte e a sua elasticidade.

3.2.5. Revestimento do papel cartão

A metodologia de produção das soluções fimogênicas foi adaptada de Yoshida *et al.* (2009), acrescida do indicador colorimétrico de H_2S . Folhas de papel cartão foram inicialmente impregnadas superficialmente com 3mL de solução 4g/100g de solução carbonato de sódio (Na_2CO_3) com auxílio de uma barra extensora de 40 μm (Regmed, Brasil) sendo imediatamente levadas para estufa equipada com luz UV para secagem à 150°C por 90 segundos. Em seguida as folhas de papel cartão foram revestidas com o uso do recobridor automático – Zehntner (ZAA 2300, Alemanha) e aplicadores universais de nível de camada – Zehntner (ZUA-2000, Alemanha) com alíquotas de 0,5 – 4mL de solução filmogênica 3% w/w em quitosana, conforme a concentração do indicador colorimétrico (Tabela 1) e secas à 150°C por 90 segundos.

Tabela 1. Volumes utilizados da suspensão conforme a concentração do indicador colorimétrico e a barra extensora utilizada.

Extensor (μm - altura ajustada no aplicador universal)	Concentração do indicador (%)	V* (mL)
10	1,0	0,45
25	0,6	1,13
25	1,5	1,13
40	0,2	1,80
40	1,0	1,80
40	2,0	1,80
60	0,6	2,70
60	1,5	2,70
80	1,0	3,60

*Os valores de volume indicados foram determinados através da correlação entre a densidade da suspensão e a massa aferida com o auxílio de balança analítica.

3.2.6. Correlação da gramatura calculada e prática

A correlação entre a gramatura calculada e prática foi obtida por diferença de massa. A gramatura calculada foi obtida com base nos sólidos totais da solução e no volume aplicado para o revestimento de cada sensor. Para obtenção da gramatura prática, a metodologia foi adaptada da norma ASTM 646-96, inicialmente as amostras (416 cm^2) foram impregnadas com Na_2CO_3 pesadas, revestidas conforme descrito no item 3.2.5. e novamente pesadas em balança analítica (a análise foi realizada em quadruplicata para cada binômio concentração / extensor) os valores obtidos foram utilizados para o cálculo da gramatura prática.

3.2.7. Determinação do melhor parâmetro de cor no espaço CIELab a ser utilizado como resposta

O parâmetro de cor croma a^* indica a variação no espaço de cor do verde (valores negativos) para o vermelho (valores positivos), o croma b^* indica a variação no espaço de cor do azul (valores negativos) para o amarelo (valores positivos) e o parâmetro luminosidade (L^*), varia do preto, 0, ao branco, 100 (Figura 4). Ensaio preliminares foram realizados para determinar-se qual parâmetro do espaço de cor CIELab representaria melhor as alterações de cor e então ser utilizado nas análises estatísticas.

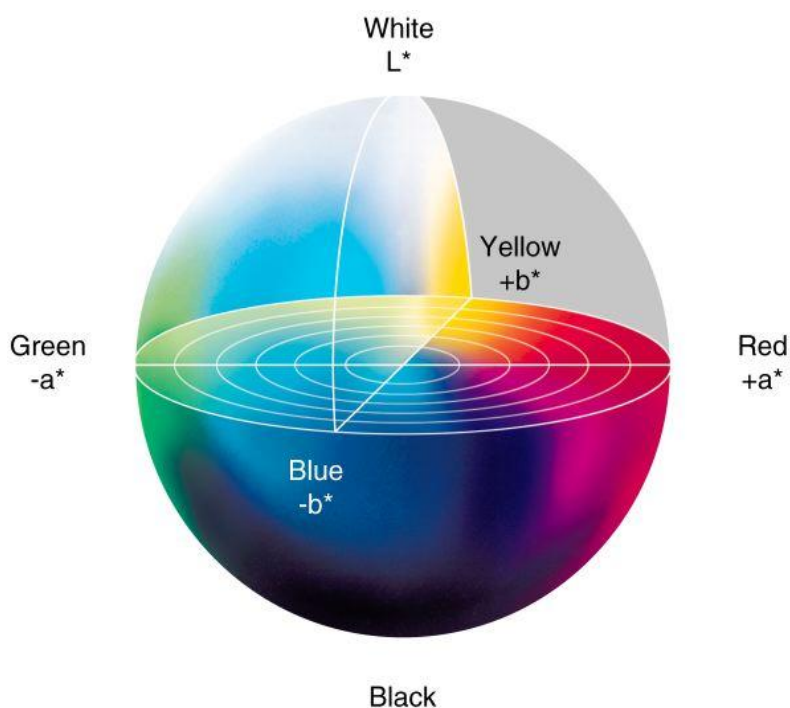


Figura 4. Espaço de cor CIELab.

O sensor inteligente, 12 amostras, foi analisado em diferentes umidades relativas. As amostras foram armazenadas, em triplicata, em dessecadores com a_w controlada de 0,11 (LiCl), 0,54 ($Mg(NO_3)_2$), 0,76 (NaCl), 0,85 (KCl) respectivamente. Depois de atingido o equilíbrio em relação às respectivas umidades de pré-acondicionamento as amostras foram expostas a uma mesma concentração (200

ppm) do gás H_2S e tempo de exposição (60 s). Sendo feita leitura dos parâmetros de cor imediatamente antes e após a exposição ao gás.

Os parâmetros de cor foram determinados de acordo com Sobral et al. (2001).

3.2.8. Otimização dos filmes inteligentes

O delineamento para investigar a melhor formulação do sensor inteligente foi realizado empregando-se a metodologia de superfície de resposta (RSM) com composto central (CCD). Os três parâmetros independentes avaliados foram: concentração do indicador colorimétrico, tempo de exposição ao gás sulfídrico (H_2S) e gramatura teórica do sensor com cinco diferentes níveis cada.

Os parâmetros escolhidos e seus níveis foram baseados em experimentos preliminares. O planejamento experimental foi realizado e os resultados obtidos foram analisados usando o *software* STATISTICA 5.0. Para este estudo um total de 17 experimentos foram desenvolvidos. O planejamento experimental (Tabela 2) foi composto de oito (2^3) pontos fatoriais, seis pontos axiais (pontos estrela) e três repetições no ponto central.

Tabela 2. Matriz do planejamento composto central (CCD).

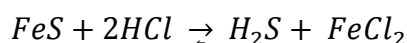
Planejamento CCD (2 ³)			
Experimento	Concentração do indicador (X ₁)	Tempo de exposição (X ₂)	Extensor (X ₃)
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	+ α	0	0
13	- α	0	0
14	0	+ α	0
15	0	- α	0
16	0	0	+ α
17	0	0	- α

Onde: α = 1,68

3.2.9. Exposição ao H₂S

Os sensores inteligentes foram expostos em temperatura ambiente ao gás H₂S em uma cuba de vidro de 8000 mL.

O gás H₂S foi gerado por reação química entre o FeS_(s) e o HCl 1M conforme a Reação 1. Uma massa de 0,012g de FeS foi colocado em contato com HCl (1M), levemente aquecido para acelerar a reação química, gerando o gás H₂S a temperatura ambiente. Estequiometricamente foi determinado a quantidade de H₂S gerado considerando o volume de 8000mL da cuba e a pureza informada pelo fabricante, conforme mostra as equações 1 e 2.



Reação 1. Formação do gás H₂S por reação química.

$$n_{H_2S} = \rho \cdot V \quad (Eq. 1)$$

Onde: $\rho = 0,04079 \text{ mol/dm}^3$ (Poling *et al.*, 2008); $V = 8 \text{ dm}^3$

$$m_{FeS} = MM_{FeS} \cdot n_{H_2S} \quad (Eq. 2)$$

Onde: $MM_{FeS} = 87,92 \text{ g/mol}$.

A Figura 5 ilustra o esquema de exposição do sensor ao gás H_2S .

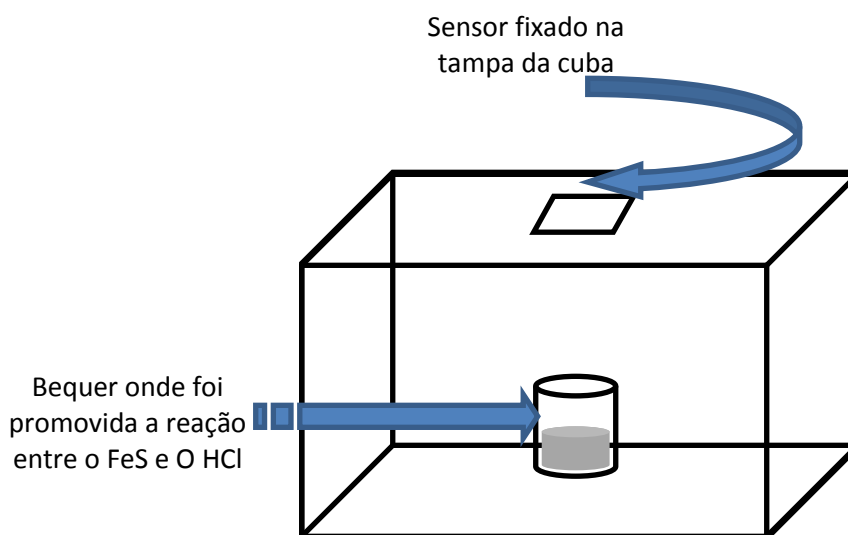


Figura 5. Ilustração do esquema de exposição ao gás H_2S .

3.2.10. Avaliação da eficiência da resposta colorimétrica dos filmes inteligentes

Os sensores de quitosana contendo $FeSO_4$ foram avaliados quanto a eficiência na variação de cor por contato com diferentes concentrações de gás H_2S . As amostras foram acondicionadas em ambiente controlado (ASTM D685) e foram submetidas a uma concentração entre 100 – 400 ppm de H_2S em um volume controlado de 8000 mL. A concentração do gás H_2S foi padronizada em uma faixa, baseando-se na Reação 1 item 3.2.9.

As variações colorimétricas dos filmes foram medidas em colorímetro modelo CR-400 da marca Konica Minolta (Japão), para avaliação do parâmetro L^* .

3.2.11. Microscopia Eletrônica de Varredura

A avaliação da microestrutura da matriz foi feita na superfície longitudinal e na área transversal de ruptura. Um microscópio eletrônico de varredura 440i (LEO Electron Microscopy Ltda.) foi utilizado com 20kV de voltagem, 100pA de corrente elétrica para o filme inteligente e 10kV e 50pA para o sensor, para foco de 18mm e I prohe 2,72. Uma camada de ouro foi depositada em um Sputter Coater SC 7620 (Polaron).

Para fazer um mapeamento da distribuição dos íons metálicos de ferro no sensor inteligente utilizou-se a técnica de Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS) acoplada ao MEV. O mapa resultante da análise consiste de pontos vermelhos, mostrando a localização de uma região de concentração particular, e a intensidade dos pontos dá uma indicação de sua concentração. Os parâmetros empregados para análise foram 20 kV de tensão, 600pA de corrente elétrica para o filme e 10kV e 600pA para o sensor e um tempo para mapeamento de 20 minutos.

3.2.12. Caracterização mecânica

3.2.12.1. Rigidez

A rigidez do sensor inteligente contendo o FeSO_4 , como indicador colorimétrico de H_2S , foi avaliada de acordo com a norma da ASTM D5342 (ASTM, 1997). As amostras de dimensões $38,1 \pm 0,3$ mm por $70,0 \pm 0,1$ mm foram analisadas nas direções longitudinal (*machine direction*, MD) e transversal (*cross-machine direction*, CMD), analisadas com auxílio do instrumento de rigidez RI-5000 (Regmed, Brasil). As amostras foram previamente acondicionadas em dessecador contendo sílica por 72 horas em temperatura ambiente ($25^\circ \pm 2^\circ$ C).

3.2.12.2. Propriedades Mecânicas de Tração

As propriedades mecânicas de tração (resistência à tração, alongamento, energia na tração, resistência à tração, comprimento de auto ruptura e índice de rigidez a tração) do sensor inteligente contendo o FeSO_4 como indicador colorimétrico de H_2S foram avaliadas de acordo com a norma da ASTM D828 (ASTM, 1997). As amostras de dimensões $15,0 \pm 0,1$ mm por $210,0 \pm 0,1$ mm foram analisadas nas direções longitudinal (*machine direction*, MD) e transversal (*cross-machine direction*, CMD), analisadas com auxílio do dinamômetro automático DI-21 (Regmed, Brasil). As amostras foram previamente acondicionadas em dessecador contendo sílica por 72 horas em temperatura ambiente ($25^\circ \pm 2^\circ$ C).

3.2.13. Capacidade de absorção de água (*Cobb Test*)

A capacidade de absorção de água do sensor inteligente contendo o FeSO_4 como indicador colorimétrico de H_2S foi avaliada de acordo com a norma da ASTM D3285 (ASTM, 1993). As amostras de dimensões 125 mm por 125 mm, foram inicialmente acondicionadas em dessecador contendo sílica por 72 horas em temperatura ambiente ($25^\circ \pm 2^\circ$ C). Em seguida, foram individualmente pesadas em balança analítica, fixadas no equipamento para Cobb (Regmed, Brasil) para análise da capacidade de absorção de água. Um volume de 100 mL de água destilada foi colocado em contato com a superfície delimitada pelo anel do equipamento (diâmetro interno de $11,28 \pm 0,02$ cm correspondendo a uma área de aproximadamente 100 cm^2) por 120 s. O excesso de água foi então rapidamente removido e amostra foi novamente pesada para o cálculo da capacidade de absorção de água.

3.2.14. Avaliação da influência da umidade na eficiência de resposta do sensor inteligente de H₂S: CH-Fe

A avaliação da influência da umidade na eficiência de resposta do CH-Fe foi realizada em duas partes, sendo a primeira realizada no laboratório LEBBPOR (Laboratório de Engenharia Bioquímica, Biorrefino e Produtos de Origem Renováveis da UNICAMP) e a segunda parte realizada no laboratório LGEI (*Laboratoire de Génie de l'Environnement Industriel*) da École des Mines d'Alès, França.

As isotermas de sorção foram determinadas seguindo o procedimento adaptado de COST 90 Project (Jowitt *et al.*, 1983). As amostras de CH-Fe e papel cartão foram cortadas (quadrados de 3 mm) e secos em atmosfera controlada por sílica durante pelo menos sete dias. Aproximadamente um grama de cada amostra foram pesados e armazenados em dessecadores contendo diferentes soluções salinas para o controle da atividade de água (a_w): 0,11 (LiCl), 0,33 (MgCl₂), 0,43 (K₂CO₃), 0,54 (Mg(NO₃)₂), 0,59 (NaBr), 0,76 (NaCl), 0,85 (KCl), 0,90 (BaCl₂), 0,94 (CuSO₄) na temperatura de 25 ± 2 °C. A umidade inicial em base seca de cada amostra foi medida em triplicata secando-se em estufa com renovação e circulação de ar – TE-394/2 (TECNAL, Brasil) à 105 °C até obtenção de massa constante (AOAC, 1990). Os experimentos de adsorção foram conduzidos em uma incubadora BOD, TE-391 (TECNAL, Brasil), pesando-se as amostras em intervalos frequentes até a obtenção de massa constante (± 5 %). Modelos de isoterma (Equações 3 – 7), que descrevem a umidade em base seca em função da atividade de água, foram utilizados para o ajuste dos dados com o auxílio do software STATISTICA 5.

Modelo de GAB:

$$X = \frac{X_m C K a_w}{(1 - K a_w)(1 - K a_w + C K a_w)} \quad (\text{Eq. 3})$$

Modelo de BET:

$$X = \frac{X_m C a_w}{(1 + C a_w)} + \frac{X_m a_w}{1 - a_w} \quad (\text{Eq. 4})$$

Modelo de HALSEY:

$$X = \left(\frac{A}{\ln(1/a_w)} \right)^{1/B} \quad (\text{Eq. 5})$$

Modelo de HENDERSON:

$$X = \left(\frac{\ln(1 - a_w)}{-C(273 + t)} \right)^{1/n} \quad (\text{Eq. 6})$$

Modelo de OSWIN:

$$X = X_m \left(\frac{a_w}{1 - a_w} \right)^k \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde: X_m é a umidade na monocamada, C e n são constantes do modelo, K é uma constante relacionada as propriedade das moléculas de água da multicamada em relação ao liquido, A e B são constantes do modelo de HALSEY e t é a temperatura de equilibrio em Celsius. Os parametros da equação foram estimados por regressão não linear (Statistica 5) em termos dos valores dos coeficientes de regressão (R^2).

As amostras acondicionas nos dessecadores com umidade relativa controlada de 54% ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$), 85% (KCl) e a 100% de umidade foram expostos ao gás H_2S (74,5 ppm), em sistema fechado (Figura 6) para determinar a influência da umidade no tempo de detecção do sensor em função da concentração do indicador na matriz de quitosana. Inicialmente foi feito vácuo no reator (230 mL) depois de atingido (-600 mmHg) foi feita a introdução do gás no sistema e iniciado a contagem de tempo até que a alteração de cor de amarelo para negro fosse visualmente verificada.



Figura 6. Sistema fechado construído para exposição do sensor a uma concentração controlado do gás H₂S.

3.2.15. Avaliação em sistema real do sensor inteligente de H₂S: CH-Fe

A avaliação em sistema real do sensor inteligente foi realizada no laboratório de termobacteriologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp.

O procedimento foi adaptado de Broda *et al.* (1996), a análise foi preparada em câmara de fluxo laminar em vinte e duas amostras frescas do músculo contra filé (*Longissimus dorsi*) para cada temperatura de estudo (4 e 15 °C). Toda gordura e tecido conjuntivo superficial do músculo foram cuidadosamente retirados (Figura 7), filés com dimensões aproximadas de 10x5x2 cm foram preparados e realizado procedimento para diminuição da flora contaminante em ambas faces com auxílio de um ferro de passar quente (Figura 8). Cada filé foi acondicionado individualmente em sacos laminados (Cryovac™, BB2800).



Figura 7. Toalete da peça de *Longissimus dorsi* para avaliação em sistema real do sensor inteligente CH-Fe.



Figura 8. Procedimento para diminuição da flora contaminante do músculo *Longissimus dorsi*.

Para inoculação, culturas de *Clostridium gasigenes* (DSM-12272) previamente isoladas de cortes frescos de carnes embaladas à vácuo e uma cultura de *Clostridium estertheticum* (DSM-8809, controle positivo) foram utilizadas. Uma alíquota de 1 mL com uma concentração celular de aproximadamente $6,0 \times 10^8$ UFC/mL foi inoculada em um dos lados do filé e igualmente distribuído na superfície seguido da adição do sensor inteligente previamente esterilizado, promovido imediatamente a retirada dos gases à um nível de vácuo de 6 mbar e seladas em uma máquina de embalagem à vácuo da marca Cryovac™ (Figura 9). As vinte amostras inoculadas e os dois controles negativos (não inoculados) foram armazenados a 4 e 15 °C e examinados semanalmente.



Figura 9. Foto ilustrativa das amostras prontas.

O parâmetro de cor L^* dos sensores inteligentes foram medidos com auxílio do colorímetro Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta, Japão) de acordo com Sobral *et al.* (2001) no início da análise e após a resposta positiva à presença do gás H_2S .

3.2.15.1. Determinação do nível de contaminação das embalagens cujos sensores apresentaram resposta positiva a presença do gas H₂S

A contagem bacteriológica foi realizada somente nas amostras armazenadas a 4 °C, uma vez que a temperatura de 15 °C representa uma temperatura abusiva de armazenagem o que poderia acarretar em um falso resultado.

A superfície exposta das carnes, aproximadamente 50 cm², cujos sensores inteligentes apresentaram resposta positiva foram amostrados com a técnica *swab*. Diluições na faixa de 10⁰ a 10⁻⁴ foram preparadas e alíquotas de 0,1 mL da diluição serial foram espalhadas em placas contendo RCM (Sigma-Aldrich) adicionado de 0,5 % de glicose (Sigma-Aldrich) e 2 % (w/w) de ágar (Sigma-Aldrich) para realização da contagem. As placas foram incubadas em câmaras anaeróbicas com geradores de anaerobiose (Anaerobac – Probac do Brasil) em ambas temperaturas de estudo (4 e 15 °C) por um período de 30 dias.

3.2.16. Análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente

A avaliação quantitativa do sensor inteligente foi realizada no *Centre de Recherche Louis Leprince-Ringuet – Laboratoire de Génie de l'Environnement Industriel* com a cooperação do *Centre des Matériaux de Grande Diffusion – CMGD (École des Mines d'Alès – France)*. A análise foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura Quanta 200 FEG (FEI Company) operado a 15 kV de voltagem e 0,60 torr de pressão equipado um detector de elétrons retroespalhados (BSE) integrado à um espectrômetro de energia dispersiva de raios X (INCA Energy 350 - Oxford Instruments). O espectro EDS foi obtido a uma distância de trabalho de 10 mm por um período de 50 s.

3.2.17. Difração de raios-X (XRD)

A análise de XRD foi realizada com o intuito de determinar-se qual composto químico apresentava-se ligado à matriz de quitosana. Um difratometro Gemini Ultra operado a 2,2 kW de potência com fonte de radiação o $\text{CuK}\alpha$ a um comprimento de onda de $\lambda = 0,154$ nm, com uma média radial de ângulos de 360° azimutais usando um detector CCD (dispositivo de carga acoplada) foi utilizado. Os dados foram tratados com o software CrysAlis^{Pro} no *Centre de diffractometrie Henri Longchambon* da Universidade Claude Bernard Lyon1 em Lyon – França. Os padrões de difração foram coletados na faixa de ângulos 2Θ (5° - 85°) a uma taxa de $0,1^\circ/\text{min}$.

3.2.18. Análise termogravimétrica (ATG)

Para avaliar possíveis alterações químicas na matriz de quitosana uma análise termogravimétrica foi realizada no Laboratório de materiais polimérico e biopoliméricos (LMPB) da Universidade Claude Bernard Lyon1 em Lyon – França. A estabilidade e degradação térmica do sensor inteligente foi avaliada usando um TGA Q500 (TA *Instruments*) a uma taxa de aquecimento constante de $5^\circ\text{C}/\text{min}$ de 35°C à 600°C em ar sintético a uma taxa de $40\text{ mL}/\text{min}$ de hélio e $60\text{ mL}/\text{min}$ de ar.

3.2.19. Análise estatística dos dados

Para comparação das médias obtidas na análise de rigidez utilizou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade com auxílio do software STATISTICA 5.0.

CAPITULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O presente trabalho foi dividido em 5 etapas:

- ✓ Caracterização da quitosana, produção do sensor inteligente e avaliação da funcionalidade.
- ✓ Otimização, avaliação da microestrutura e das propriedades mecânicas e de barreira do sensor inteligente.
- ✓ Avaliação da influência da umidade na eficiência de resposta do sensor inteligente.
- ✓ Avaliação do sensor inteligente em sistema real.
- ✓ Análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente, investigação do elemento e/ou composto ligado a matriz de quitosana e avaliação de possíveis alterações químicas resultantes do processo de produção do sensor inteligente.

4.1. Etapa 1 – Caracterização da quitosana, produção do sensor inteligente e avaliação da funcionalidade

Na Etapa 1 foi determinada a massa molar, $8,26 \times 10^4$ (Tabela 3) da quitosana. Na proposta inicial, sensores inteligentes seriam produzidos na forma de filmes poliméricos (Fm-Fe).

4.1.1. Caracterização da quitosana

A massa molar da quitosana foi determinada em triplicata por cromatografia de permeação em gel. A Figura 10 mostra o cromatograma para solução de quitosana, 1% (w/w) utilizando os diferentes detectores. A Tabela 3 indica os resultados obtidos para a massa molar média numérica (M_n) e ponderal (M_w), o índice de polidispersividade (M_w/M_n). O índice de polidispersividade (IP) reflete a distribuição de tamanhos de cadeias e, quanto maior for este índice, maior será a amplitude de distribuição.

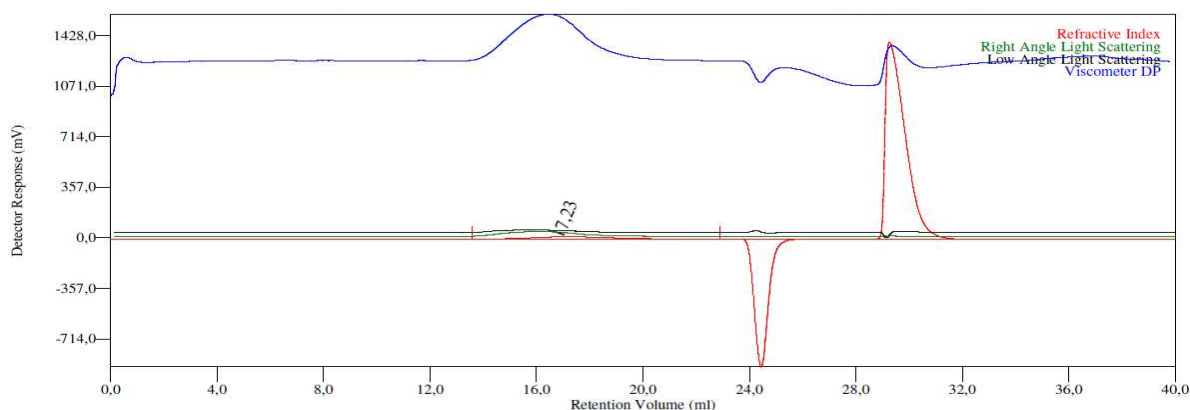


Figura 10. Cromatograma para a quitosana utilizando os diferentes detectores.

Tabela 3. Massas médias molares obtidas por GPC.

Amostra	M_n (g.mol ⁻¹)	M_w (g.mol ⁻¹)	Índice de Polidispersividade
1	$8,43 \times 10^4$	$2,40 \times 10^5$	2,85
2	$8,28 \times 10^4$	$2,37 \times 10^5$	2,87
3	$8,08 \times 10^4$	$2,38 \times 10^5$	2,95
Média	$8,26 \times 10^4$	$2,38 \times 10^5$	2,89

Os valores obtidos para as massas médias molares estão de acordo com Canella e Garcia (2001) que afirmaram que a massa molar média da quitosana varia de $10^4 - 10^6$ g.mol⁻¹.

4.1.2. Produção dos filmes inteligentes e sensores

As formulações para os filmes inteligentes foram inicialmente estudadas, utilizando o FeSO_4 como o indicador colorimétrico.

Os filmes foram produzidos conforme procedimento adaptado de Yoshida *et al.* (2009) e o indicador colorimétrico (FeSO_4) foi incorporado nas concentrações de 0,1; 0,5; 0,6; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5% em massa da suspensão filmogênica. Dificuldades foram encontradas no processo de secagem dos filmes, possivelmente devido às interações entre as moléculas de quitosana e os íons metálicos, Fe^{3+} (Wang *et al.*, 2010). Nos testes iniciais, as soluções não formaram filmes. Variações nas condições do processo de secagem, foram realizadas, alterando para um primeiro período de 24 horas a temperatura ambiente em bancada nivelada seguida por um período de 15 horas em incubadora ventilada a 30°C. Sempre buscando uma secagem lenta para promover uma melhor formação da matriz tridimensional.

A concentração de quitosana aplicada na matriz foi mantida constante em 3,0% (m/m) e variou-se a concentração do indicador em 0,1 – 2,0 %. A obtenção dos filmes inteligentes com concentração superior a 0,6 % de indicador colorimétrico (Figura 11) mostrou-se inviável devido a não formação da matriz filmogênica. Baixas concentrações de indicador tendem a apresentar baixa resposta colorimétrica do sensor, impossibilitando o estudo para determinar a melhor formulação para o filme inteligente uma vez que não seria possível a realização do delineamento experimental.



Figura 11. Imagem do filme inteligente contendo como indicador colorimétrico o FeSO_4 .

O outro indicador do gás H_2S proposto foi a mioglobina. A obtenção da mioglobina foi feita por extração a partir de músculo *longissimus dorsi* (contra-filet) conforme procedimento adaptado de Geileskey (1998), devido ao alto custo da mioglobina purificada comercial. A mioglobina foi extraída em tapão fosfato e em seguida, liofilizada.

O extrato obtido apresentou um baixo teor de sólidos. Assim um simples processo de congelamento à temperatura de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ (congelador de geladeira) não se mostrou suficiente, pois ao levar a solução ao liofilizador o extrato espumou levando a perda do extrato. Sendo, portanto realizado um congelamento em um ultra freezer na temperatura de congelamento de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ o que possibilitou a completa liofilização do extrato.

Para determinação da concentração de mioglobina no extrato obtido foi construída uma curva padrão em espectrofotômetro a partir de mioglobina purificada com teor de pureza aproximada de 99 % (Figura 12).

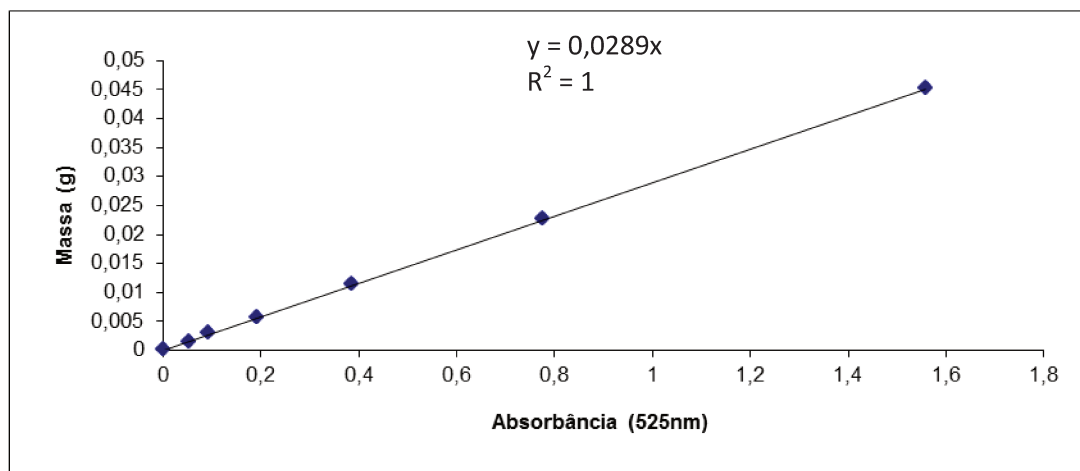


Figura 12. Curva padrão obtida para mioglobina a 525 nm.

Com o resultado obtido pela leitura a 525 nm (1,111A) foi determinada uma concentração de mioglobina no extrato de 0,0322 g/L, resultando em 0,0161 g de mioglobina extraída quando o esperado segundo Dosi *et al* (2006) para o músculo *Longissimus dorsi* bovino seria de aproximadamente 0,21 g/100g de tecido.

O sensor inteligente na forma de filme (Fm-Mg) e o sensor inteligente obtido por revestimento (CH-Mg), Figura 13, foram produzidos de maneira similar ao sensor inteligente contendo Fe. A mesma dificuldade encontrada na produção do Fm-Fe foi observada, ou seja, não foi possível obter a formação tridimensional dos Fm-Mg com concentração superior a 0,6% do extrato liofilizado de mioglobina. Como baixas concentrações de indicador tendem a apresentar baixa resposta colorimétrica, a determinação da melhor formulação para o Fm-Mg foi impossível. O sensor obtido não apresentou variação colorimétrica visível quando exposto ao gás H_2S , possivelmente devido ao baixo teor de mioglobina ($\leq 0,1\%$) e alto teor de sais no extrato ($\geq 99\%$).



(a)



(b)

Figura 13. Sensor inteligente contendo mioglobina como indicador colorimétrico, (a) sensor inteligente na forma de filme (Fm-Mg) e (b) sensor inteligente obtido por revestimento (CH-Mg).

Duas suspensões de quitosana/extrato de mioglobina, 1,0% e 1,5% (m/m) foram testadas para formar o sensor inteligente CH-Mg. A concentração de 1,5% não apresentou a formação da matriz tridimensional homogênea o que foi associado às altas concentrações de sais no extrato de mioglobina. O CH-Mg não apresentou uma resposta colorimétrica perceptível visualmente, possivelmente devido à pequena quantidade de mioglobina no extrato (4,05 g/L - estimado) . Segundo dados da literatura, o músculo bovino apresenta entre 16 – 20 mg de mioglobina por g de tecido (Sgarbieri,1996). Neste ensaio, um projeto de IC foi desenvolvido em paralelo, concluindo-se que para os filmes de quitosana contendo mioglobina, 3% de

quitosana e 2% em massa de extrato de mioglobina ou mioglobina pura, não foi identificada variação de cor significativa no sensor quando exposto ao H₂S.

Com a resposta negativa do indicador a presença do gás, um novo sensor com concentração de 3% de mioglobina purificada foi elaborado, mas não foi possível observar efeito colorimétrico de indicação do gás por meio do sensor. Este fenômeno pode ser associado à instabilidade da mioglobina em condições de variação de temperatura, concentração de oxigênio e forças iônicas.

De forma geral, concluiu-se que a aplicação da mioglobina como indicador do gás H₂S foi inviável nas condições trabalhadas neste projeto. Não foi possível observar efeito de variação colorimétrica do sensor ao expô-los ao gás, tanto com a incorporação da mioglobina obtida pela extração, como a comercial purificada.

4.1.2.1. Revestimento em papel cartão

Pelo elevado tempo de secagem para a obtenção do sensor na forma de filme, aproximadamente 48 h, dificuldade de obter filme inteligente homogêneo, manuseáveis, optou-se por aplicar a solução filmogênica como revestimento na superfície de papel cartão (250 g/m²), sendo uma técnica já desenvolvida e bastante aplicada no LEBBPOR em outros projetos. Assim, o filme inteligente foi alterado para um sistema bicamada, consistindo no revestimento de papel cartão pelo sistema de casting.

As folhas de papel cartão foram fixadas para evitar o encanoamento das mesmas durante o processo. A solução filmogênica foi distribuída uniformemente sobre a superfície do papel cartão. Após a aplicação, as folhas de papel cartão revestidas foram levadas para secagem em estufa a 150°C por um período de 90 segundos.

Os sensores revestidos apresentaram coloração amarelada e quando expostos em contato com o gás H₂S tornavam-se pretos após 30 s de exposição ao gás (Figura 14).

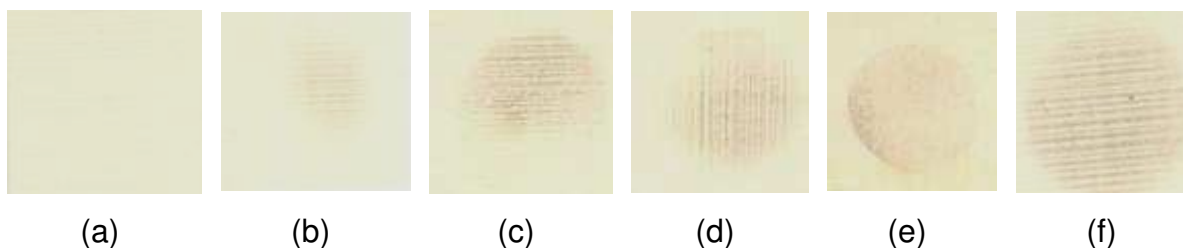


Figura 14. Imagem do sensor em diferentes tempos de exposição ao H₂S (a) 0; (b) 30; (c) 60; (d) 90; (e) 120; (f) 180s.

Foram realizados testes para determinação da funcionalidade do sensor inteligente, assim os sensores contendo sais de ferros foram expostos em temperatura ambiente ao gás H₂S em uma cuba de vidro de 8000 mL.

4.2. Etapa 2 – Otimização, avaliação da microestrutura e das propriedades mecânicas e de barreira do sensor inteligente.

Na Etapa 2, determinou-se o parâmetro de cor no espaço CIEab que melhor representasse as alterações colorimétricas do sensor inteligente. Para realização da análise estatística dos dados foi realizado a leitura dos sensores antes e após a exposição ao gás H₂S, os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Médias dos parâmetros L*, a* e b* do sensor inteligente.

Amostra	Sensor inteligente não exposto			Sensor inteligente após exposição ao gás H ₂ S		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
1	80,30±0,43	4,34±0,39	33,38±0,98	41,66±0,33	0,18±0,19	10,25±0,30
2	80,99±0,14	3,89±0,19	31,03±0,36	34,99±1,28	-0,73±0,32	5,31±0,35
3	79,40±0,79	4,75±0,65	32,03±1,94	38,85±4,00	-0,42±1,90	6,97±3,48
4	81,34±0,70	3,45±0,52	30,30±1,61	41,11±0,22	-0,88±0,17	8,05±0,05
5	81,64±0,92	3,39±0,84	29,20±2,12	33,97±0,67	-1,07±0,14	5,06±0,18
6	80,79±0,26	3,83±0,14	30,17±0,33	33,13±1,00	-0,57±0,37	4,91±0,87
7	79,15±4,90	5,34±4,33	32,98±7,88	48,32±0,51	0,97±0,46	12,05±0,79
8	79,89±0,88	4,81±0,78	32,62±1,90	45,64±2,78	0,67±0,43	12,02±1,16
9	79,10±2,77	5,01±2,43	31,77±5,59	63,08±3,13	-4,17±0,61	15,54±2,17
10	78,59±3,14	5,79±2,57	34,80±4,88	66,55±0,88	-3,52±0,90	20,45±2,08
11	80,83±0,28	3,82±0,34	31,85±1,06	73,72±2,42	-0,74±1,22	23,27±2,34
12	80,22±0,84	4,15±0,55	31,54±1,28	77,96±0,49	3,15±1,13	30,21±2,05

A partir dos dados da Tabela 4 foram construídos os gráficos das Figuras 15-17.

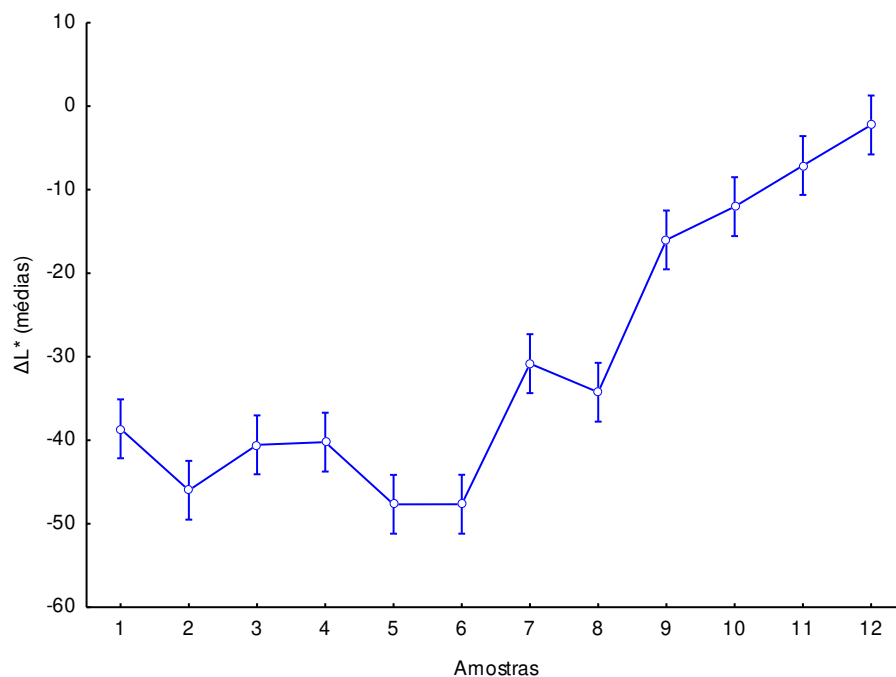


Figura 15. Comparação das médias obtidas do parâmetro L^* das amostras armazenadas a 11% (1-3), 54% (4-6), 76% (7-9) e 85% (10-12) de umidade relativa.

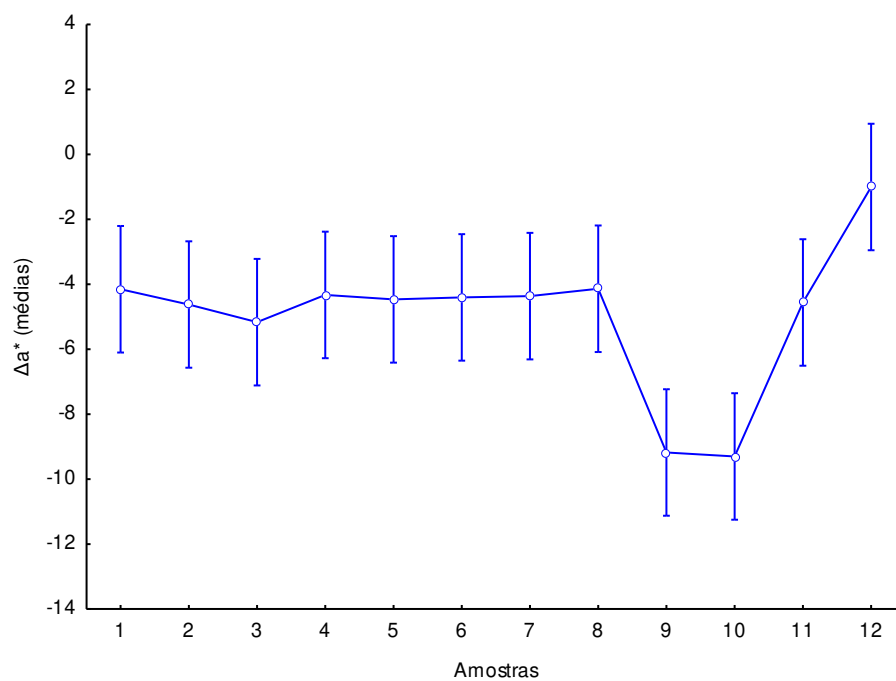


Figura 16. Comparação das médias obtidas do parâmetro a^* das amostras armazenadas a 11% (1-3), 54% (4-6), 76% (7-9) e 85% (10-12) de umidade relativa.

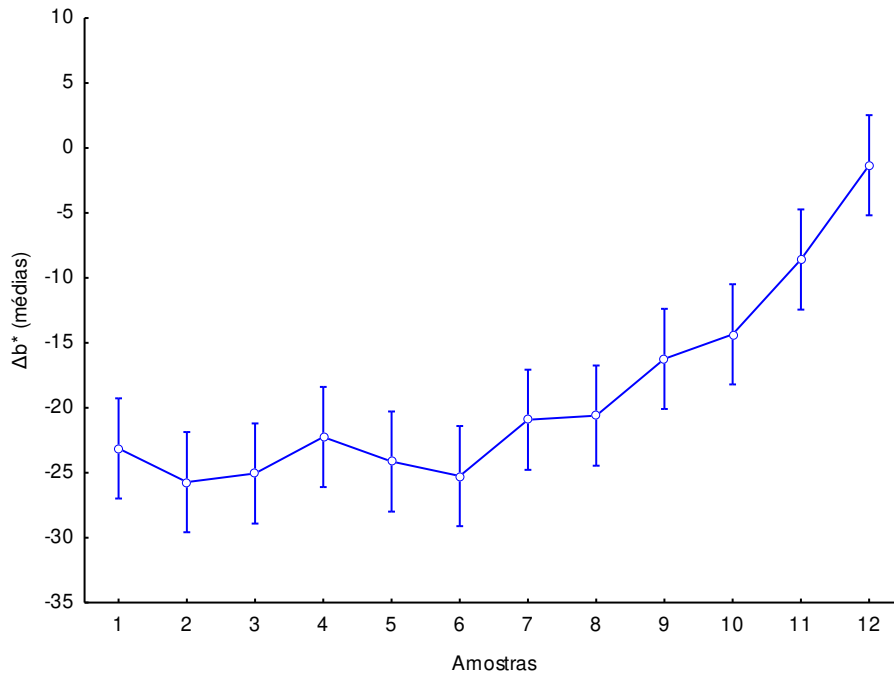


Figura 17. Comparação das médias obtidas do parâmetro b^* das amostras armazenadas a 11% (1-3), 54% (4-6), 76% (7-9) e 85% (10-12) de umidade relativa.

A partir da análise das Figuras 15-17 e das análises estatísticas (Teste de Tukey, $p < 0,05$) para L^* , a^* e b^* foi determinado que o parâmetro L^* é o que melhor representa a alteração colorimétrica no espaço de cor CIELab, uma vez que os parâmetros a^* e b^* não diferem ou diferem em uma escala muito inferior estatisticamente nas diferentes condições estudadas à 95% de confiança.

4.2.1. Determinação da gramatura prática e otimização do sensor quitosana-papel

Inicialmente a gramatura foi calculada com base nos sólidos totais da suspensão e no volume aplicado para o revestimento de cada sensor e a gramatura prática foi obtida gravimetricamente (Tabela 5).

Tabela 5 - Correlação da gramatura calculada e prática dos sensores inteligentes.

Extensor (μm - altura ajustada no aplicador universal)	Concentração do indicador na suspensão(%)	Gramatura teórica (g/m^2)	Gramatura prática (g/m^2)
10	1,00	0,40	0,95 $\pm$ 0,08
25	0,60	0,90	0,99 $\pm$ 0,16
25	1,50	1,13	1,73 $\pm$ 0,07
40	0,20	1,28	1,34 $\pm$ 0,24
40	1,00	1,60	2,47 $\pm$ 0,09
40	2,00	2,00	0,85 $\pm$ 0,07
60	0,60	2,16	1,18 $\pm$ 0,10
60	1,50	2,70	2,15 $\pm$ 0,13
80	1,00	3,20	1,82 $\pm$ 0,10

Os dados obtidos para gramatura prática são discordantes com os valores calculados para gramatura calculada, possivelmente devido à alta viscosidade das suspensões filmogênicas. Conforme foi determinado pelo do planejamento experimental 2^3 , a melhor formulação e consequentemente a estudada neste projeto corresponde a que apresenta 1,5 % em concentração do indicador na suspensão e aplicador universal ajustado para um revestimento de 25 μm .

Para otimização do sensor foi realizado um planejamento fatorial com composto central onde as variáveis independentes estudadas foram: concentração do indicador, tempo de exposição ao gás H_2S e espessura do revestimento em cinco níveis cada variável.

Na Tabela 6 são apresentados os níveis e seus respectivos valores reais para o planejamento experimental.

Tabela 6 - Valores atribuídos às variáveis do planejamento composto central para otimização do sensor quitosana papel.

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Concentração do indicador (%)	0,2	0,6	1,0	1,5	2,0
Tempo de exposição (s)	30	60	90	120	150
Espessura do revestimento - extensor (μm)	10	25	40	60	80

A resposta ΔL^* , parâmetro dependente foi obtido com o auxílio do colorímetro (Tabela 7).

Uma análise colorimétrica dos sensores antes da exposição ao H_2S (branco) foi realizada devido à diferença na cor inicial de cada sensor, consequência da alta temperatura (150°C) do processo de secagem levando a um maior escurecimento em algumas áreas do sensor, assim a análise de cor foi linearizada. Todas as análises foram realizadas em triplicata para minimizar os efeitos inesperados nas respostas observadas devido a fatores extrínsecos (pequenas variações no tempo de exposição ao gás H_2S , diferenças na espessura dos sensores), a média dos fatores L^* foi calculada e usada na análise estatística.

Tabela 7 - Parâmetro de cor, L^* , dos sensores antes e após a exposição ao gás H_2S .

Ensaio	BRANCO	EXPOSTO	ΔL^*
	L^* Médio	L^* Médio	
1	85,88±0,30	85,03±0,42	0,85±0,63
2	82,81±0,27	76,16±0,31	6,65±0,53
3	85,81±0,43	83,46±1,18	2,35±1,60
4	82,53±0,17	75,47±2,25	7,06±2,37
5	82,73±0,18	82,61±0,24	0,12±0,41
6	75,18±0,38	75,28±0,48	-0,10±0,24
7	83,04±0,24	82,90±0,05	0,14±0,28
8	75,44±0,22	73,14±0,06	2,30±0,22
9	83,34±1,04	82,14±1,02	1,20±1,34
10	84,81±0,16	83,85±0,46	0,97±0,30
11	84,08±0,60	82,99±0,64	1,08±0,26
12	80,49±0,18	77,05±1,91	3,44±2,05
13	76,03±0,26	75,81±0,08	0,22±0,31
14	83,96±0,41	81,34±0,95	2,62±0,58
15	87,33±0,73	87,23±0,40	0,09±0,94
16	84,84±0,37	83,12±0,67	1,71±1,03
17	84,00±0,74	83,34±0,27	0,66±0,79

A Figura 18 ilustra o efeito da variação na resposta colorimétrica variando a concentração do indicador colorimétrico, o tempo de exposição ao gás H_2S e o extensor utilizado no revestimento do papel cartão conforme o delineamento experimental, ensaios de 1 a 17.

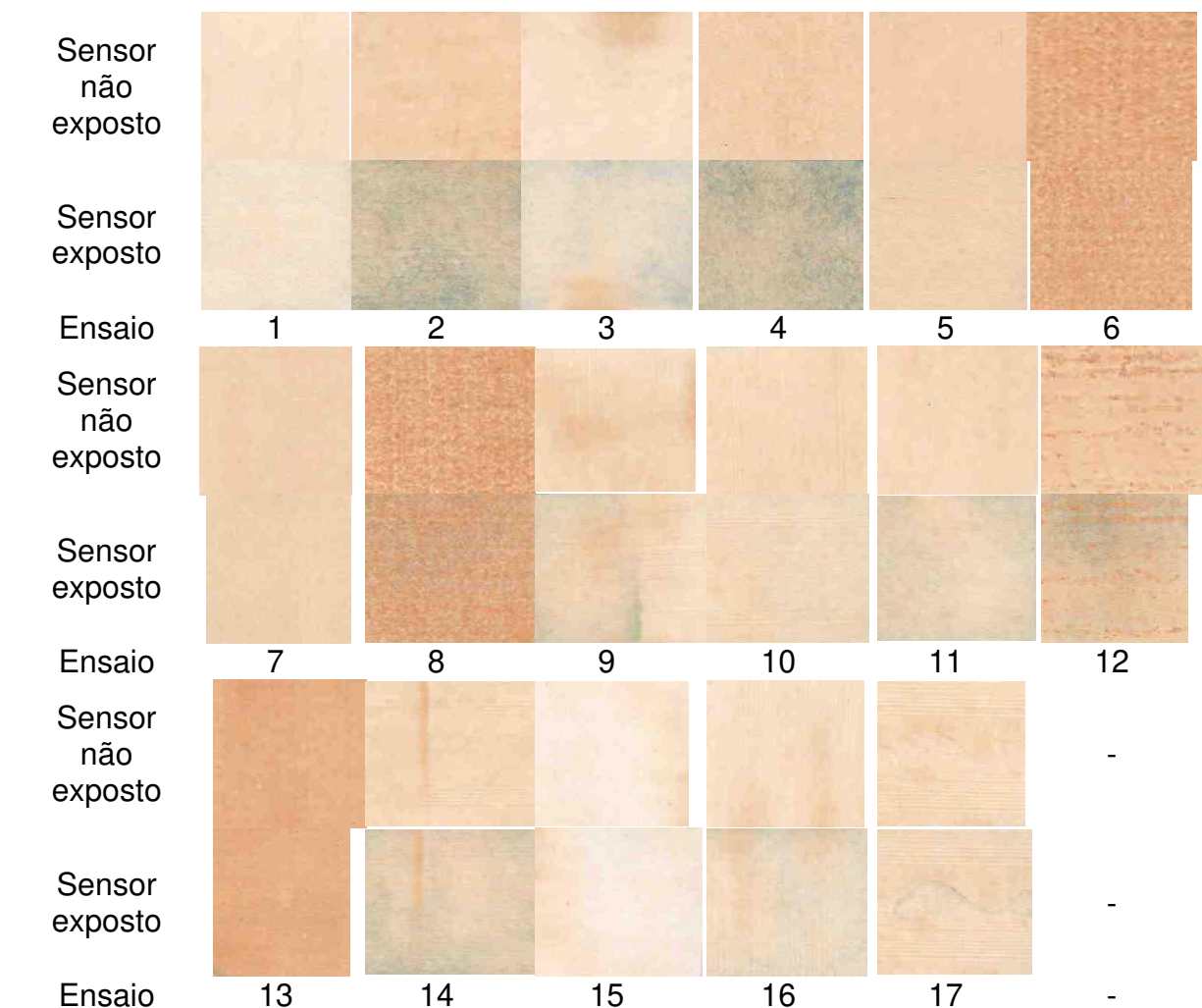


Figura 18. Imagens dos sensores antes e após a exposição ao H₂S.

O efeito da concentração do indicador colorimétrico, tempo de exposição ao gás H₂S e altura ajustada (extensor) utilizado no revestimento e suas interações foram estudadas (Tabela 8). Todos os termos apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) no parâmetro ΔL^* , a concentração do indicador assim como o tempo de exposição do sensor ao gás H₂S apresentaram efeito positivo no parâmetro ΔL^* e a espessura do revestimento apresentou efeito negativo. Ou seja, um aumento na concentração do indicador de 0,6 para 1,5% ou um aumento no tempo de exposição do sensor ao gás H₂S de 60 para 120 segundos resultaram uma diferença de cor escura (parâmetro ΔL^*) da ordem de grandeza de 2,25 e 1,06 respectivamente. Enquanto que um aumento na espessura do extensor utilizado no revestimento de 25 para 60 μm resulta em uma diminuição da cor escura (parâmetro ΔL^*) da ordem de

grandeza de 2,31. A interação entre a concentração do indicador e a espessura do revestimento apresentou efeito significativo ($p < 0,05$), sendo esse efeito negativo, ou seja, o aumento de 0,6 para 1,5% na concentração do indicador associado a um aumento de 25 para 60 μ m na espessura do extensor utilizado no revestimento resulta em uma diminuição da ordem de grandeza de 2,15 no parâmetro ΔL^* .

Tabela 8 - Efeitos e valores de p para o parâmetro ΔL^* ($R^2 = 0,78$).

Variável ^a	Efeitos	p ^b
Média	1,39	0,0021
X ₁	2,25	0,0007
X ₂	1,06	0,0029
X ₃	-2,31	0,0006
X ₁ X ₂	0,33	0,0569
X ₁ X ₃	-2,15	0,0014
X ₂ X ₃	0,13	0,2472

^a Concentração do indicador (X₁), tempo de exposição (X₂) e espessura do extensor utilizado no revestimento (X₃)

^b $p < 0,05$ indica efeito estatisticamente significativo

As interações entre a concentração do indicador e o tempo de exposição ao gás H₂S e entre o tempo de exposição ao gás H₂S e a espessura do extensor utilizado no revestimento não apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) no parâmetro ΔL^* (Tabela 8). O valor do coeficiente de determinação (R^2) de 0,78 deve-se possivelmente a diferença na espessura do revestimento, ou seja, para uma mesma barra extensora formaram-se até três espessuras de revestimento devido a variação da viscosidade da solução filmogênica com a concentração do indicador colorimétrico.

4.2.1.1. Superfícies de resposta

A análise de variância (ANOVA) obtida para aceitação global está apresentada na Tabela 9. O modelo de regressão gerado foi significativo ($p \leq 0,10$) uma vez que o $F_{\text{calculado}} (0,90;9;7) = 2,74$ foi maior que o $F_{\text{tabelado}} (0,90;9;7) = 2,72$. A

falta de ajuste também foi significativa ($F_{\text{calculado}} (0,90;5;2) = 245,22$ foi maior que o $F_{\text{tabelado}} (0,90;5;2) = 9,01$), porém o ideal seria um valor de $F_{\text{calculado}}$ menor que o F_{tabelado} , isto é, não significativo. Como as médias nos pontos centrais foram muito próximas e o erro puro muito baixo resultando em um valor de F da falta de ajuste alto, o modelo foi considerado válido para fins preditivos (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2001).

Tabela 9 - Análise de variância para aceitação global do modelo.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}	$F_{\text{tabelado 10\%}}$
Regressão	57,20	9	6,36	2,74	3,68	2,72
Resíduos	16,25	7	2,32			
Falta de Ajuste	16,23	5	3,25	245,22	19,30	9,29
Erro Puro	0,03	2	0,01			
Total	73,46	16	4,59			

As superfícies foram plotadas para ilustrar o efeito das variáveis independentes na resposta, ΔL^* . A Figura 19 mostra o aumento no parâmetro ΔL^* como resultado do aumento no tempo de exposição ao gás H_2S e na concentração do indicador.

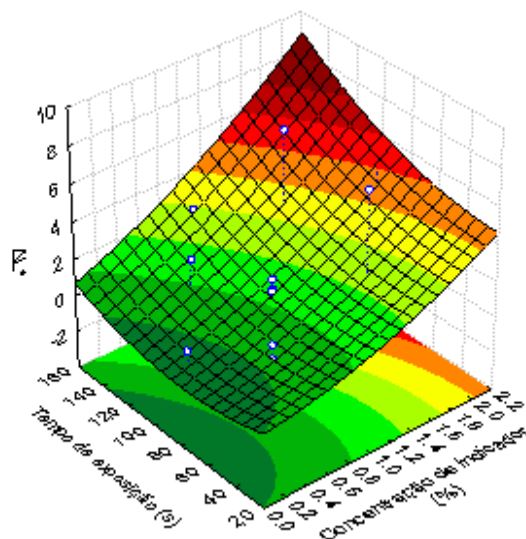


Figura 19. Superfície de resposta da interação entre a concentração do indicador e o tempo de exposição ao gás H_2S no parâmetro ΔL^* .

A Figura 20 mostra o efeito antagônico no parâmetro ΔL^* como resultado do aumento na concentração do indicador e na espessura do extensor utilizado no revestimento.

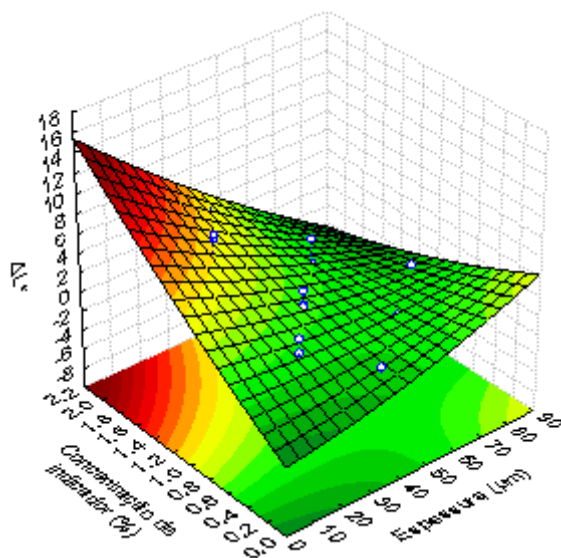


Figura 20. Superfície de resposta da interação entre a concentração do indicador e a espessura do extensor utilizado revestimento no parâmetro ΔL^* .

A Figura 21 mostra o efeito no parâmetro ΔL^* resultante da interação entre o tempo de exposição ao gás H_2S e a espessura do extensor utilizado no revestimento.

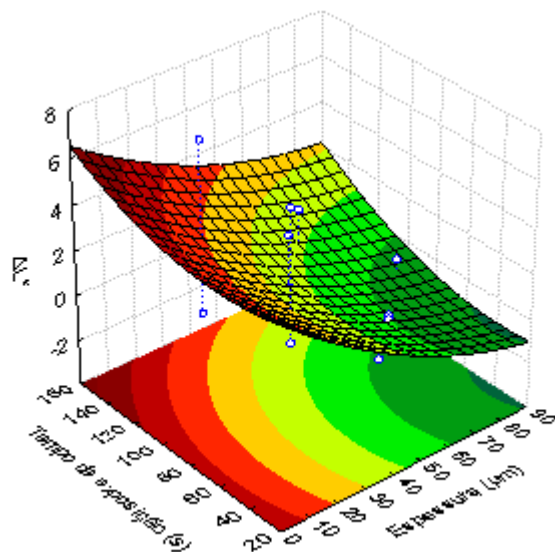


Figura 21. Superfície de resposta da interação entre o tempo de exposição ao gás H_2S e a espessura do extensor utilizado no revestimento no parâmetro ΔL^* .

A formulação ótima para o sensor estudado, considerando-se as interações entre a quitosana e o íon metálico (Fe^{3+}), que impossibilita a obtenção de sensores de maior concentração do indicador, foi a contendo 1,5% em concentração do indicador de H_2S e um revestimento de $1,13g/m^2$ (gramatura teórica).

4.2.2. Avaliação da microestrutura da matriz

A microestrutura e a distribuição dos íons ferro na matriz de quitosana foram avaliadas.

A morfologia da superfície dos filmes inteligentes de quitosana e do sensor foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliação do revestimento quanto à homogeneidade e ausência de rupturas no revestimento.

Um mapeamento da espécie Fe^{3+} adsorvidas na matriz de quitosana foi realizado tanto para o filme como para o sensor inteligente, utilizando-se a técnica de espectroscopia por dispersão de energia de raios-X (EDS). Na Figura 22 pode-se avaliar a distribuição dos íons metálicos (Fe^{3+}) representada pelos pontos vermelhos nas imagens.

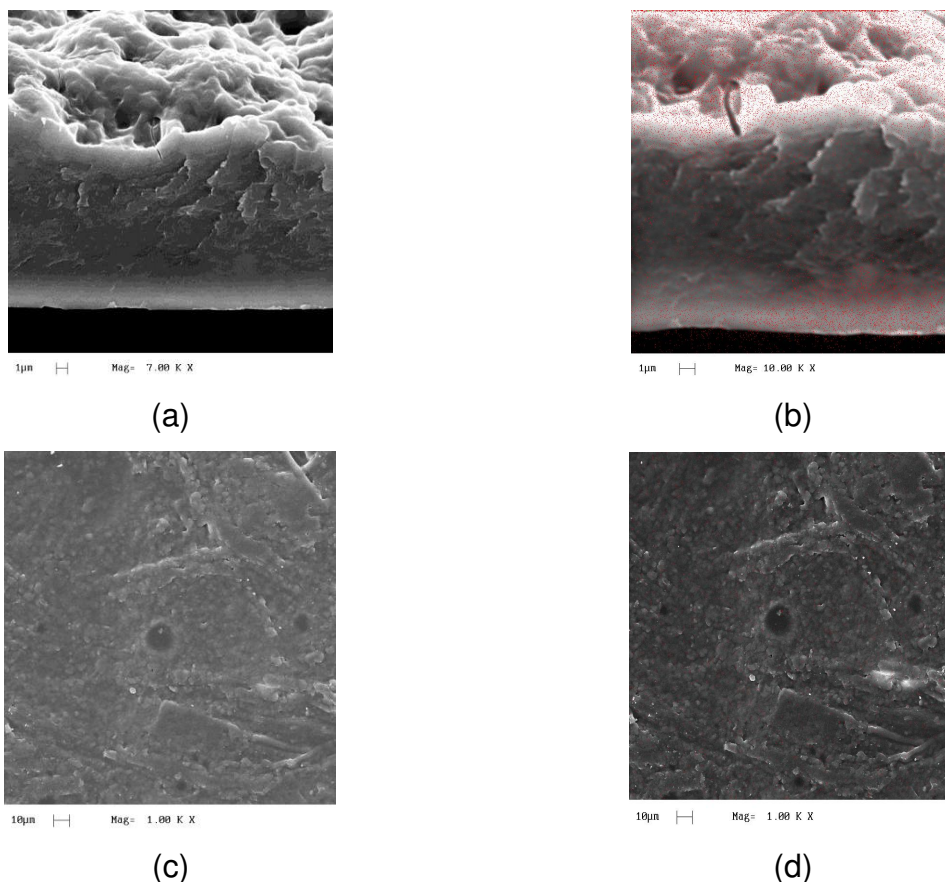


Figura 22. Imagens obtidas através da análise de MEV: (a) filme inteligente; (b) EDS do filme inteligente; (c) sensor inteligente e (d) EDS do sensor inteligente.

Na Figura 22 (b), observa-se a homogeneidade da distribuição (pontos vermelhos) dos íons metálicos (Fe^{3+}) na matriz de quitosana, ou seja, qualquer região do sensor apresentará uma mesma intensidade de resposta colorimétrica a presença do gás H_2S . Após o período de secagem os filmes apresentavam-se íntegros e sem rachaduras. Após um período de 48 horas o filme inteligente perdeu sua maleabilidade e tornou-se quebradiço.

O sensor apresentou uma ótima aderência, não mostrando sinais de descolamento da matriz filmogênica de quitosana da superfície de celulose, confirmando a adsorção observada da quitosana na superfície das fibras celulósicas por Li, Du e Xu (2004).

4.2.3. Caracterização mecânica

O sensor inteligente foi avaliado quanto às características mecânicas a fim de se determinar a viabilidade da utilização da tecnologia já existente na indústria de papel para sua produção.

4.2.3.1. Rigidez

Os valores obtidos para ambas as direções do papel (MD e CD) e sentido de giro (direita, D e esquerda, E) de rigidez são médias de dez (10) análises (Tabela 10).

Tabela 10 - Comparativo da rigidez (g.cm) entre o sensor inteligente e o papel cartão sem cobertura.

Amostra	Transversal (CMD)		Longitudinal (MD)	
	D	E	D	E
Papel cartão	60±3 ^a	84,5±3 ^b	135±4 ^a	172±3 ^c
Sensor inteligente	65±9 ^a	94±7 ^c	140±7 ^b	187±6 ^d

a-d: letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente a 95% de confiança. Teste de Tukey realizado a $p < 0,05$.

A rigidez na direção CMD do sensor inteligente não apresentou alteração na leitura no sentido D e no sentido E apresentou um pequeno aumento de 84,5 para 94 g.cm, na direção MD no sentido D o sensor inteligente apresentou um pequeno aumento de 135 para 140 g.cm e no sentido E um pequeno decréscimo de 172 para 167 g.cm na rigidez quando comparados com o papel sem cobertura. Segundo Rhim e Kim (2009) a rigidez do papel cartão aumentou com o revestimento com PLA. Samyn et al. (2010) relataram que papel cartão recoberto com anidrido estireno-maleico (SMA) apresentou rigidez similar ao papel cartão não recoberto.

4.2.3.2. Propriedades de tensão

Os resultados para propriedades de tensão (Força média, alongamento, energia na tração, resistência à tração, comprimento de auto ruptura e índice de rigidez a tração) apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Comparativo entre as características mecânicas do sensor inteligente e o papel cartão não recoberto.

Amostra	Força Média (N)	Alongamento (%)	Energia na Tração (J.m ⁻²)	Resistência a Tração (kN.m ⁻¹)	Comprimento de Auto Ruptura (km)	Índice de Rigidez a Tração (kN.m.kg ⁻¹)
Sensor Inteligente (MD)	244,53±4,37	3,69	368,21	16,30	6,65	2,65
Papel cartão não recoberto (MD)	236,31±7,47	3,55	342,75	15,75	6,43	2,66
Sensor Inteligente (CMD)	135,82±2,85	7,04	446,38	9,22	3,76	0,79
Papel cartão não recoberto (CMD)	138,25±3,65	7,11	440,78	9,05	3,69	0,76

Em concordância com Samyn *et al.* (2010) e Kibirkštis & Kabelkaitė (2006) a força média na direção MD é maior comparada com a direção CMD devido a anisotropia do papel.

4.2.4. Capacidade de absorção de água (*Cobb Test*)

A capacidade de absorção de água foi obtida para o sensor inteligente e para o papel cartão não recoberto (Tabela 12). A capacidade de absorção de água fornece informações referentes a quantidade de água que o papel cartão pode absorver, em gramas por metro quadrado, quando em contato direto com a água. Propriedade importante para o sensor inteligente uma vez que o mesmo pode ser utilizado para o controle de qualidade em alimentos com elevado teor de umidade.

Tabela 12 - Capacidade de absorção de água para o sensor inteligente em comparação com papel cartão não recoberto.

Amostra	Absorção (g/m ²)
Sensor inteligente	100,75±3,10
Papel cartão não recoberto	54,09±20,37

O revestimento na produção do sensor com biopolímero aumentou a absorção de água quando comparado com o papel cartão sem revestimento o mesmo foi observado por Rhim, Lee & Hong (2006), devido a hidrofilicidade da quitosana. O aumento da absorção pode também ser explicada pela impregnação inicial do papel cartão com CaCO₃.

Desta forma conclui-se que o sensor inteligente pode ser produzido com a tecnologia já existente nas indústrias de papel.

Os resultados foram apresentados no trabalho intitulado “Desenvolvimento e otimização de sensor inteligente e biodegradável contendo indicador de H₂S” no XVIII COBEQ 2010.

4.2.5. Trabalho completo apresentado no XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química – XVIII COBEQ, Foz do Iguaçu/PR – Brasil, realizado de 19 a 22 de Setembro de 2010.

Desenvolvimento e otimização de sensor inteligente e biodegradável contendo indicador de H₂S

E. T. KATO JUNIOR¹, T. T. FRANCO¹ e C. M. P. YOSHIDA^{1,2}

¹Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química

e-mail: kato_imel@yahoo.com.br

e-mail: franco@feq.unicamp.br

²Universidade Federal de São Paulo

e-mail: cristiana.yoshida@unifesp.br

RESUMO – Um novo conceito de sensor inteligente foi desenvolvido, visando detectar e indicar a presença de gás sulfídrico (H_2S). A aplicação deste sensor é abrangente, desde o controle de vazamentos na indústria petroquímica, até o controle de qualidade de produtos alimentícios. Este sensor biodegradável foi desenvolvido a partir da quitosana com a incorporação de indicador de presença de H_2S que produz um sinal colorimétrico como uma resposta rápida para a presença deste composto. O problema ambiental provocado pelo acúmulo de lixo de difícil degradação vem aumentando em âmbito mundial. As vantagens do uso de quitosana são: total biodegradabilidade, capacidade de formar filmes flexíveis resistentes e com barreira efetiva ao oxigênio. Um planejamento fatorial 2^3 , foi utilizado visando otimizar a formulação do sensor. A formulação ótima para o sensor de H_2S foi: 1,5% em massa a concentração do indicador colorimétrico, e uma cobertura de $1g/m^2$.

PALAVRAS-CHAVE: quitosana, sensor inteligente, gás sulfídrico, indicadores, otimização.

1. INTRODUÇÃO.

Gás sulfídrico (H_2S) é um gás inflamável, incolor, corrosivo e com odor característico que pode ser venenoso em altas concentrações. As pessoas geralmente sentem o odor do H_2S em baixas concentrações no ar, variando de 0,0005-0,3 partes por milhão (ppm), porém, em altas concentrações, podem perder a capacidade de senti-lo, o que o torna muito perigoso. O limite para exposição ocupacional ao H_2S é de 10 ppm para um período de 8 horas (ASTDR, 2006). Este gás pode ser gerado em refinarias de petróleo, plantas de gás natural, plantas petroquímicas, usinas de coque, fábricas de papel kraft, instalações de produção de enxofre, fundições de ferro, fábricas de processamento de alimentos e curtumes (Svendsen, 2001). Na indústria de alimentos produtos como vegetais enlatados (palmitos, cogumelos), alimentos minimamente processados, os alimentos consumidos *in natura* como mel e carne embalada a vácuo são expostos à

possibilidade de contaminação antes, durante ou após o processamento (em ambiente anaeróbio microorganismos, e.g. *Clostridium sp.* produzem como um de seus metabolitos do H₂S).

Segundo Sen *et. al.* (2008), tem aumentado o interesse no desenvolvimento de detectores em tempo real (Ninh, *et. al.*, 2007), portáteis (Tanda *et. al.*, 2007), e óticos (Choi *et. al.*, 2003) de H₂S operados em temperatura ambiente (Wang, Chu & Wu, 2006; Levchenko *et. al.*, 2007).

Um sensor colorimétrico pode ser definido como um composto que indica a presença de uma substância ou o grau de reação entre dois ou mais reagentes por alteração colorimétrica. Em contraste com os sensores eletrônicos, estes não necessitam de receptores e transdutores e comunicam a informação de maneira direta, ou seja, visualmente (Kerry *et. al.*, 2006).

A consciência ambiental do consumidor vem aumentando e com isso a procura por alternativas para reduzir o lixo de difícil degradação, gerado principalmente por polímeros sintéticos. Segundo Mansur (2006), estima-se que 30% em volume do lixo refere-se a fração de plásticos.

Nesta última década, inúmeros estudos foram desenvolvidos visando a produção e caracterização de filmes biodegradáveis à base de macromoléculas naturais, como proteínas de soro de leite (McHugh & Krochta, 1994; Yoshida, 2002; Yoshida & Antunes, 2004), gelatina (Sobral, 2001; Carvalho & Grosso, 2006), zeína (Gennadios & Weller, 1991), proteína miofibrilar (Sobral, 2000) e outros, entretanto a abordagem da aplicação destes materiais ainda é escassa na literatura especializada.

A quitosana é obtida pela reação de desacetilação da quitina em meio alcalino. A quitina é um polímero natural extraído de exoesqueleto de crustáceos, insetos, entre outros, composto pelas unidades monoméricas de β -(1 $\rightarrow$ 4)- 2-amino-2-desoxi-D-glicose e β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose. Este polímero natural possui uma estrutura cristalina altamente organizada, como comprovada por difração de raios-X (Alexander, 1985). Dessa forma, é um polímero insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos, e tem baixa reatividade química. A insolubilidade da quitina é o maior fator limitante da sua utilização. A quitosana apresenta como característica a baixa toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade

(Muzzarelli, 1973). Segundo Yoshida *et. al.* (2009) a quitosana é um excelente polímero linear formador de filmes.

2. OBJETIVO DO TRABALHO.

Este trabalho tem por objetivo desenvolver e otimizar um novo e rápido indicador inteligente, visando detectar e indicar a presença de gás sulfídrico (H₂S).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Quitosana (Primex, Islândia); ácido acético (Synth, Brasil); soluções indicadoras de H₂S; carbonato de sódio, Na₂CO₃ (Synth, Brasil); FeS (Sigma, Alemanha); ácido clorídrico, HCl (Synth, Brasil); papel cartão Triplex TP250 (250 g/m², Suzano Papel e Celulose Ltda, Brasil).

3.2. Métodos

3.2.1. Solução filmogênica de quitosana.

A metodologia de produção da solução filmogênica foi adaptada de Yoshida *et al.* (2009). Quitosana (3g/100g) foi solubilizada em solução aquosa ácida, sendo que o ácido acético foi adicionado estequiometricamente, de acordo com o grau de acetilação e a massa da quitosana (evitando excesso de ácido), sob agitação contínua até solubilização total. A solução contendo o indicador colorimétrico aquoso foi adicionada completando 100g de solução filmogênica.

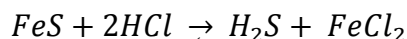
3.2.2. Obtenção do sensor inteligente.

Folhas de papel cartão foram revestidas com alíquotas de 0,5 – 4mL de solução filmogênica, conforme a concentração do indicador colorimétrico e a barra extensora utilizada para o revestimento. As folhas revestidas foram secas em estufa a 150°C por 90 segundos.

3.2.3. Exposição ao H₂S.

Os sensores inteligentes foram expostos em temperatura ambiente ao gás H₂S em uma cuba de vidro de 8000 mL.

O gás H₂S foi gerado por reação química entre o FeS_(s) e o HCl 1M (levemente aquecido para acelerar a reação) conforme a Reação 1. Uma massa de 0,012g de FeS foi colocado em contato com HCl (1M), gerando o gás H₂S a temperatura ambiente. Estequiometricamente foi determinado a quantidade de H₂S gerado levando-se em conta o volume de 8000mL da cuba e a pureza informada pelo fabricante, conforme mostra as equações 1 e 2.



Reação 1. Formação do gás H₂S por reação química.

$$n_{H_2S} = \rho \cdot V \quad (1)$$

Onde: $\rho = 0,04079 \text{ mol/dm}^3$ (Poling *et al.*, 2008); $V = 8 \text{ dm}^3$

$$m_{FeS} = MM_{FeS} \cdot n_{H_2S} \quad (2)$$

Onde: $MM_{FeS} = 87,92 \text{ g/mol}$.

3.2.4. Planejamento experimental dos sensores inteligentes - Otimização da formulação do sensor.

O delineamento para investigar a melhor formulação do sensor inteligente foi realizado empregando-se a metodologia de superfície de resposta (RSM) com composto central (CCD). Os três parâmetros independentes avaliados foram: concentração do indicador colorimétrico, tempo de exposição ao gás sulfídrico (H_2S) e gramatura do sensor com cinco diferentes níveis cada.

Na Tabela 1 são apresentados os níveis e seus respectivos valores reais para o planejamento experimental.

Tabela 1 - Valores atribuídos às variáveis do planejamento composto central para otimização do sensor inteligente.

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Concentração do indicador (%)	0,2	0,6	1,0	1,5	2,0
Tempo de exposição (s)	30	60	90	120	150
Gramatura do sensor (g/m^2)	0,40	1,00	1,60	2,40	3,20

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

Os resultados obtidos foram analisados usando o *software* STATISTICA 5.0 (Statistica, USA). O planejamento experimental (Tabela 2) foi composto de oito (2^3) pontos fatoriais, seis pontos axiais (pontos estrela) e três repetições no ponto central.

A resposta ΔL^* , parâmetro dependente (Tabela 2) foi obtido pela diferença algébrica entre o valor da leitura feita anterior a exposição ao gás com o auxílio do colorímetro e o valor da leitura após a exposição ao gás. Todas as análises foram realizadas em triplicata para minimizar os efeitos inesperados nas respostas

observadas devido a fatores extrínsecos (pequenas variações no tempo de exposição ao gás H_2S , diferenças na espessura dos sensores/indicadores inteligentes), a média dos fatores L^* foi calculada e usada na análise estatística.

Tabela 2 - Matriz do planejamento composto central (CCD).

Planejamento CCD (2^3)				
Experimento	Concentração do indicador	Tempo de exposição	Espessura do revestimento do sensor	ΔL^*
1	-1	-1	-1	$0,85 \pm 0,63$
2	+1	-1	-1	$6,65 \pm 0,53$
3	-1	+1	-1	$2,35 \pm 1,60$
4	+1	+1	-1	$7,06 \pm 2,37$
5	-1	-1	+1	$0,12 \pm 0,41$
6	+1	-1	+1	$-0,10 \pm 0,24$
7	-1	+1	+1	$0,14 \pm 0,28$
8	+1	+1	+1	$2,30 \pm 0,22$
9	0	0	0	$1,20 \pm 1,34$
10	0	0	0	$0,97 \pm 0,30$
11	0	0	0	$1,08 \pm 0,26$
12	$+\alpha$	0	0	$3,44 \pm 2,05$
13	$-\alpha$	0	0	$0,22 \pm 0,31$
14	0	$+\alpha$	0	$2,62 \pm 0,58$
15	0	$-\alpha$	0	$0,09 \pm 0,94$
16	0	0	$+\alpha$	$1,71 \pm 1,03$
17	0	0	$-\alpha$	$0,66 \pm 0,79$

Onde: $\alpha = 1,68$

A Figura 1 ilustra o efeito da variação na resposta colorimétrica com a exposição ao gás H_2S .



Sem Exposição Exposto ao H_2S

Figura 1 - Imagem do sensor antes e após a exposição ao H_2S .

O efeito da concentração do indicador colorimétrico (C_i), tempo de exposição ao gás H_2S (t) e espessura do sensor (E) e a interação C_iE apresentaram efeito

significativo ($p < 0,05$) no parâmetro ΔL^* (Figura 2). A concentração do indicador e o tempo de exposição do sensor ao gás H_2S apresentaram efeito positivo no parâmetro ΔL^* e a espessura do revestimento do sensor apresentou efeito negativo. Ou seja, um aumento na concentração do indicador de 0,6 para 1,5% ou um aumento no tempo de exposição do sensor ao gás H_2S de 60 para 120 segundos resultaram em uma diferença de cor escura (parâmetro ΔL^*) da ordem de grandeza de 2,25 e 1,06 respectivamente. E um aumento na espessura do revestimento do sensor de 1,00 para 2,40g/m² resulta em uma diminuição da cor escura (parâmetro ΔL^*) da ordem de grandeza de 2,31. A interação entre a concentração do indicador e a espessura do revestimento do sensor apresentou efeito significativo ($p < 0,05$), sendo esse efeito negativo, ou seja, o aumento de 0,6 para 1,5% na concentração do indicador associado a um aumento de 1,00 para 2,40g/m² na espessura do revestimento do sensor resulta em uma diminuição da ordem de grandeza de 2,15 no parâmetro ΔL^* .

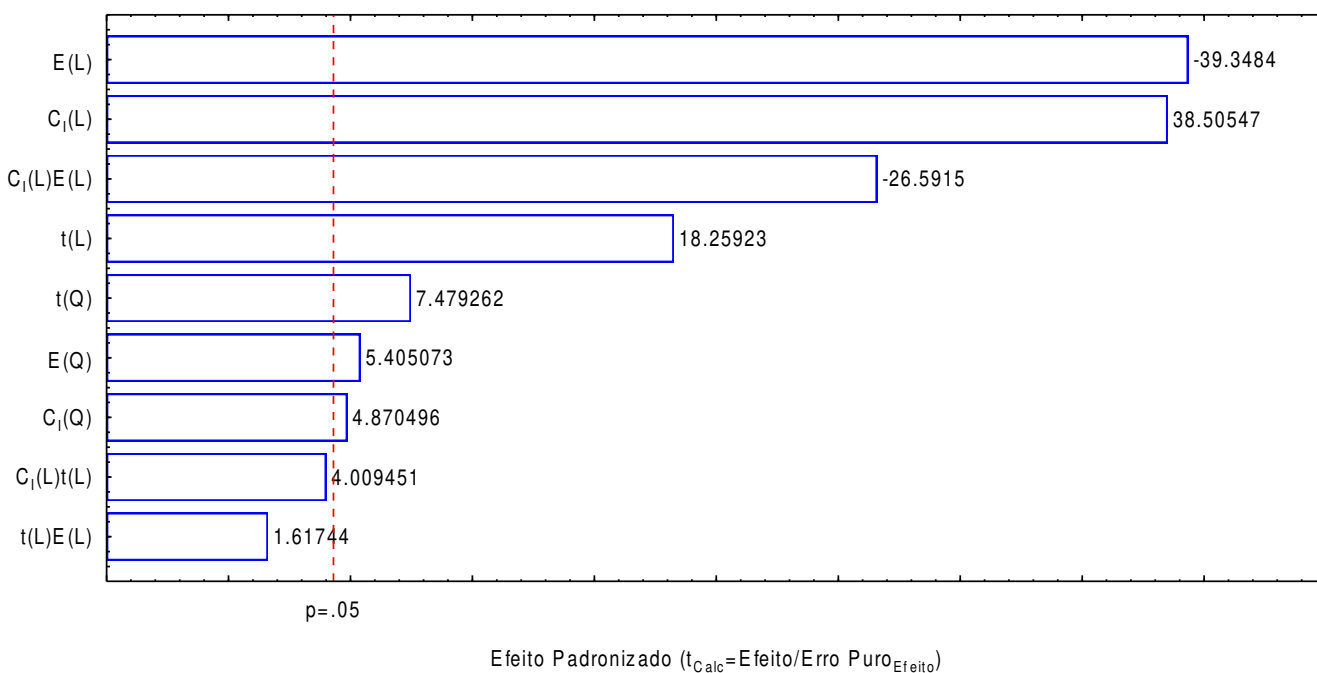


Figura 2 - Gráfico de Pareto a 95% de confiança dos efeitos padronizados.

4.1. Superfícies de resposta

A superfície em 3D foi plotada para ilustrar o efeito das variáveis independentes na resposta, ΔL^* . A Figura 3 mostra o efeito no parâmetro ΔL^*

resultante da interação entre a concentração do indicador e a espessura do revestimento do sensor.

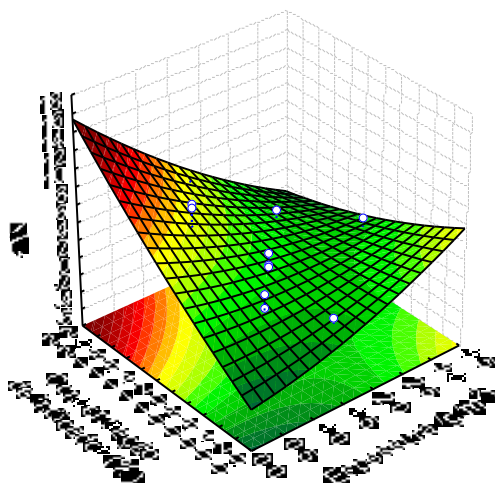


Figura 3 - Superfície de resposta da interação entre o tempo de exposição ao gás H_2S e a espessura do revestimento do sensor no parâmetro ΔL^* .

Analisando a Figura 3 verifica-se que há uma tendência para formulação ótima para o sensor na faixa estudada. Considerando as interações entre a quitosana e o indicador colorimétrico, que impossibilita a obtenção de sensores com concentração superior a 2%, a formulação ótima para o sensor foi estabelecida com 1,5% em concentração do indicador de H_2S e um revestimento de $1,00 \text{ g/m}^2$.

5. CONCLUSÃO

O sensor inteligente pode oferecer uma eficiente e rápida alternativa para indústria petroquímica, química e de alimentos para comunicar a presença de H_2S em caso de vazamentos em linhas de recuperação de enxofre e em produtos alimentícios, informando a segurança e qualidade de produtos relacionadas a presença de H_2S durante o transporte e/ou armazenamento.

A melhor formulação indicada pelo planejamento fatorial foi com 1,5% em concentração do indicador de H_2S e um revestimento de $1,00 \text{ g/m}^2$.

Agradecimentos: Capes, CNPq, Fapesp e Unifesp.

6. REFERÊNCIA

Alexander LE, Degree of Crystallinity of Polymers, in: *X-Ray Diffraction Methods in Polymer Science*, cap. 3, John Wiley & Sons Inc., Malabar (1985).

ASTDR - Agency for toxic substances and disease registry (2006). Toxicological profile for hydrogen sulfide, US. Department of health and human services, Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Acesso em <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp114.html>. 28 de abril de 2009.

Carvalho, R.A.; Grosso; C.R.F. Properties of chemically modified gelatin films. *Brazilian J. Chem. Eng.*, v.23, n.1, p.45-53, 2006.

Choi, M.M.F. and Hawkins, P. Development of an optical hydrogen sulphide sensor, *Sens. Actuators B Chem.* 90, 211–215, 2003.

Gennadios, A.; Weller, C.L. Edible films and coatings from soymilk and soy protein. *CFW Review*, v.36, n.12, p.1004-1009, 1991.

Kerry, J.P.; O’Grady, M.N.; Hogan, S.A. Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Sci.* 74, 113–130, 2006.

Levchenko, A.V.; Dobrovolsky, Y.A.; Bukun, N.G.; Leonova, L.S.; Zyubina, T.S.; Neudachina, V.S.; Yashina, L.V.; Tarasov, A.B.; Shatalova, T.B.; Shtanov, V.I. Chemical and electrochemical processes in low-temperature superionic hydrogen sulfide sensors, *Russ. J. Electrochem.* 43, 552–560, 2007.

Mansur, A. Nossos passos sobre a Terra. *Rev. Época*, Edição Verde, p.42-75, outubro, 2006.

McHugh, T.H.; Krochta, J.M. Permeability properties of edible films. In Krochta, J.M.; Baldwin, E.A.; Nisperos-Carriedo, M.O. *Edible Coatings and Films to Improve Quality*, Tech. Pub. Comp., Inc., Lancaster, 1994.

- Muzzarelli, R. A. A.; *Natural Chel. Polym.*, Pergamon: Oxford, p. 1-254, 1973.
- Ninh, H.P.; Tanaka, Y.; Nakamoto, T.; Hamada, K. A bad-smell sensing network using gas detector tubes and mobile phone cameras, *Sens. Actuators B Chem.* 125, 138–143, 2007.
- Poling, B.E.; Thomson, G.H; Friend, D.G.; Rowley, R.L. and Wilding, W.V. Perry's Chemical Engineers' Handbook. 8TH Edition, Section 2 *Physical and Chemical Data*, The McGraw-Hill Companies, Inc., 2008.
- Sen, A.; Albarella, J.D.; Carey, J.R.; Kim, P. and McNamara III, W.B. Low-cost colorimetric sensor for the quantitative detection of gaseous hydrogen sulfide. *Sens. Actuators B* 134, 234–237, 2008.
- Sobral, P.J.A. Influência da espessura sobre certas propriedades de biofilmes à base de proteínas miofibrilares. *Pesq. Agropec. Brás.*, v.35, p. 1251-1259, 2000.
- Sobral, P.J.A; Menegalli, F.C.; Hubinguer, M.D.; Roques, M.A. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocol.*, v.3-4, n.15, p. 423-32, 2001.
- Svendsen. K. Hydrogen sulphide. *Arbete Och Halsa*, 127:1-310, 2001.
- Tanda, N.; Washio, J.; Ikawa, K.; Suzuki, K.; Koseki, T.; Iwakura, M. A new portable sulfide monitor with a zinc-oxide semiconductor sensor for daily use and field study, *J. Dentistry* 35, 552–557, 2007.
- Wang, C.H.; Chu, X.F. and Wu, M.W. Detection of H₂S down to ppb levels at room temperature using sensors based on ZnO nanorods, *Sens. Actuators B Chem.* 113, 320–323, 2006.
- Yoshida, C.M.P. *Aplicação de concentrado protéico de soro de leite na elaboração de filmes comestíveis*. Campinas (São Paulo): UNICAMP, 227p. (Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos), 2002.
- Yoshida, C.M.P.; Antunes, A.C.B. Water vapour permeability of whey protein emulsion films. *Milchwissenschaft*, v.59, n.1/2, p. 48-51, 2004.

Yoshida, C.M.P.; Oliveira, E.N. and Franco, T.T. Chitosan Tailor-Made Films: The Effects of Additives on Barrier and Mechanical Properties. *Packag. Technol. Sci.*, 22: 161–170, 2009.

4.3. Etapa 3 – Avaliação da influência da umidade na eficiência de resposta do sensor inteligente CH-Fe

Devido a abrangente aplicação do sensor inteligente, na Etapa 3 foram realizados estudos quanto à influência da umidade na eficiência de resposta do sensor inteligente.

4.3.1. Isotermas de sorção

As isotermas de sorção obtidas à 25 °C seguindo o procedimento adaptado de COST 90 Project (Jowitt *et al.*, 1983) podem ser observadas nas Figuras 23 – 27 (papel cartão) e nas Figuras 28 – 32 (sensor inteligente). As isotermas foram obtidas para determinar o comportamento do sensor inteligente em diferentes umidades de equilíbrio devido a sua utilização em diferentes ambientes.

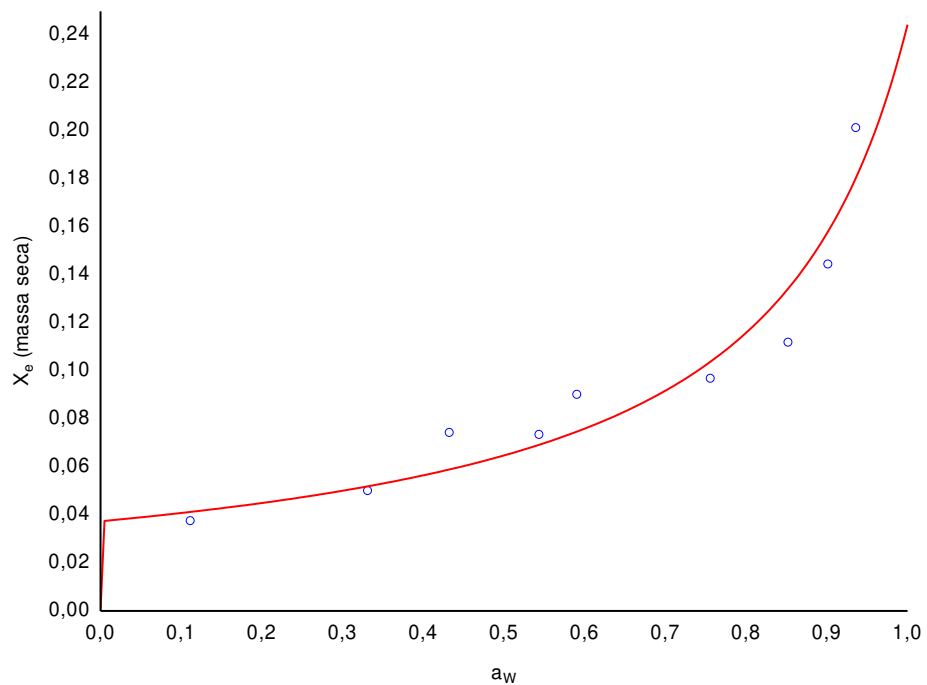


Figura 23. Isoterma de sorção do papel cartão na temperatura de 25 °C ajustada pelo modelo de GAB.

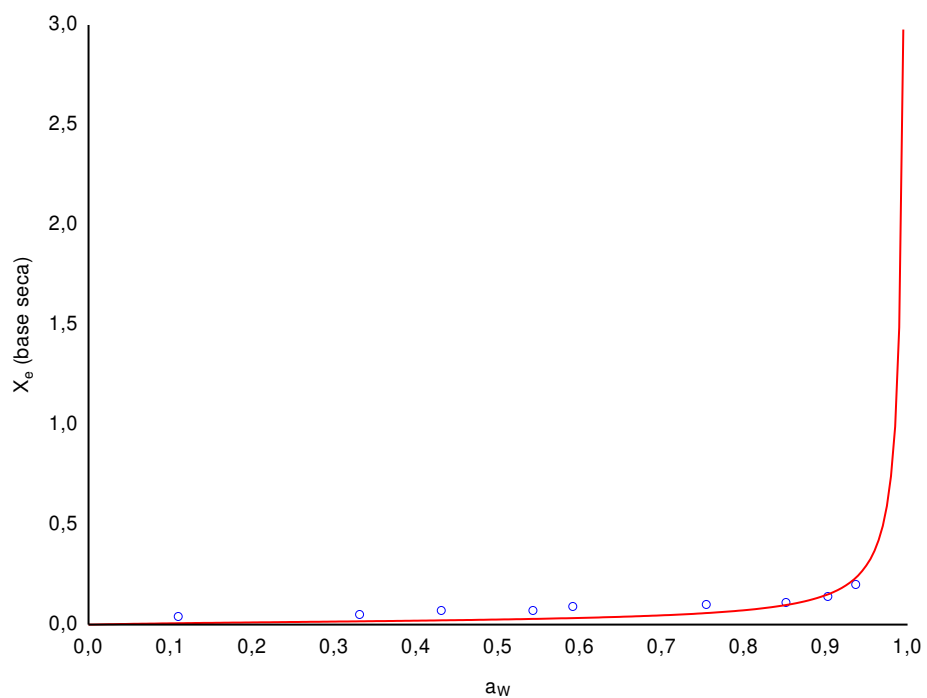


Figura 24. Isoterma de sorção do papel cartão na temperatura de 25 °C ajustada pelo modelo de BET.

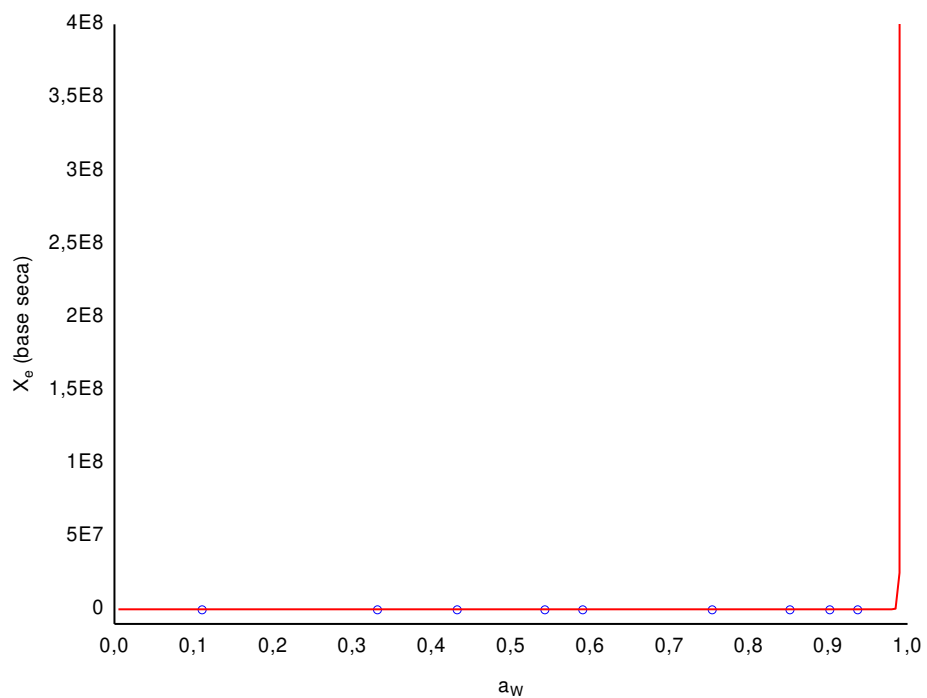


Figura 25. Isoterma de sorção do papel cartão na temperatura de 25 °C ajustada pelo modelo de HALSEY.

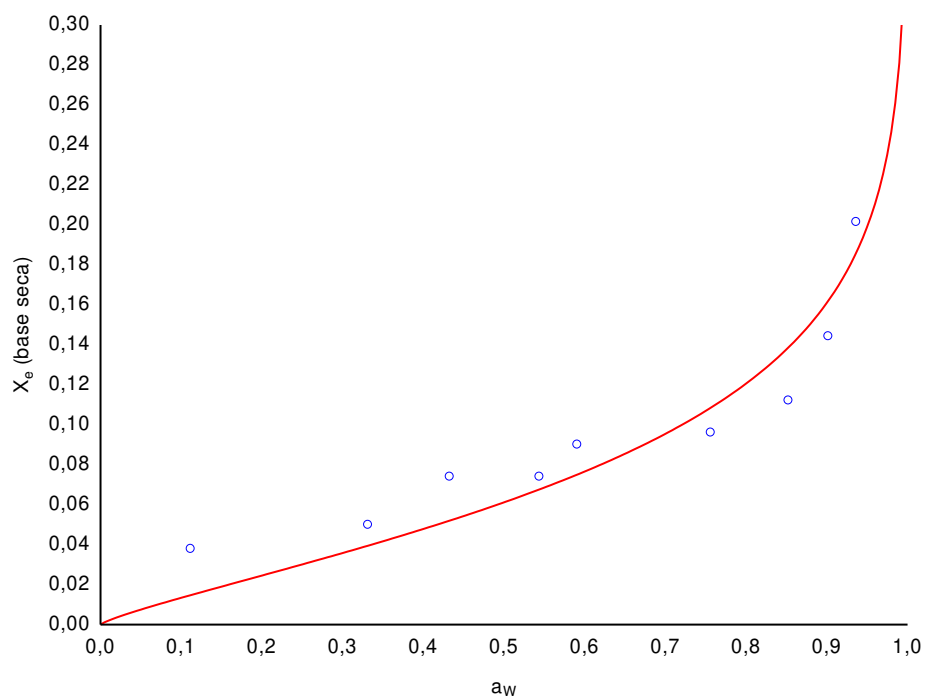


Figura 26. Isoterma de sorção do papel cartão na temperatura de 25 °C ajustada pelo modelo de HENDERSON.

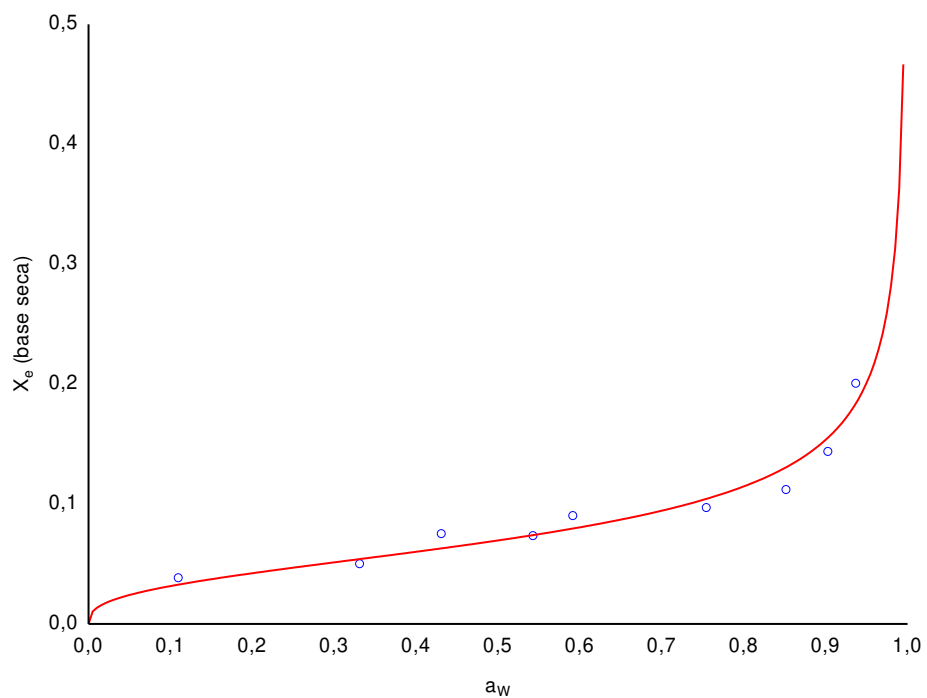


Figura 27. Isoterma de sorção do papel cartão na temperatura de 25 °C ajustada pelo modelo de OSWIN.

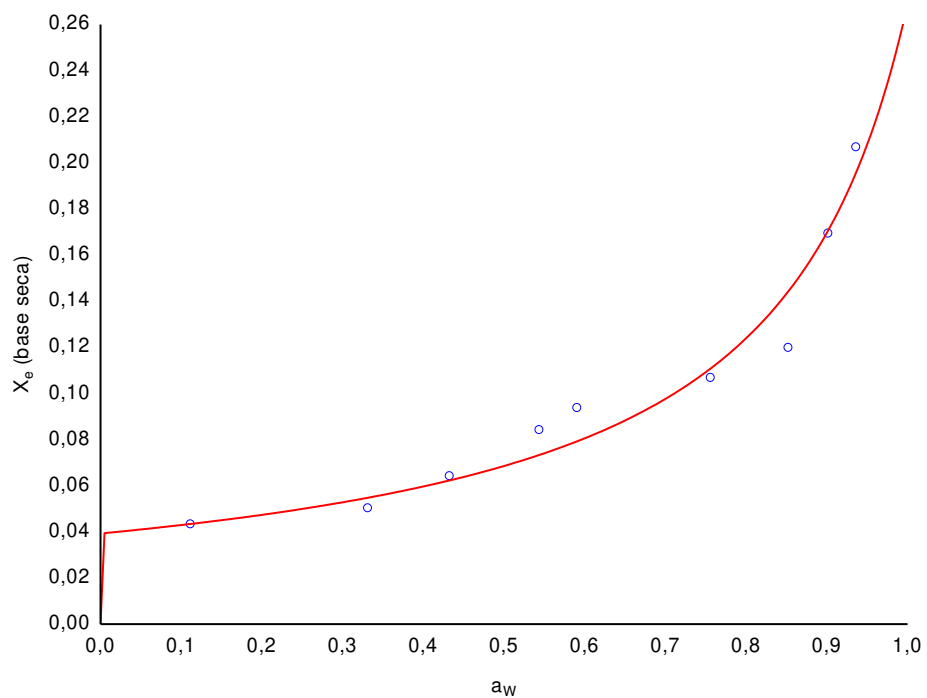


Figura 28. Isoterma de sorção do sensor inteligente na temperatura de 25 °C ajustada pelo modelo de GAB.

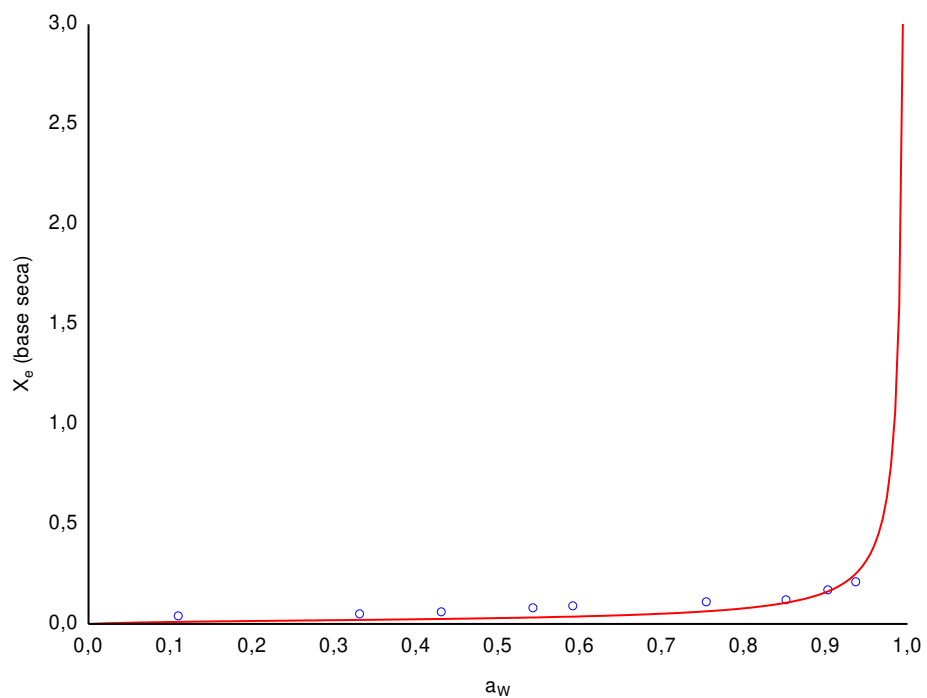


Figura 29. Isoterma de sorção do sensor inteligente na temperatura de 25 °C ajustada pelo modelo de BET.

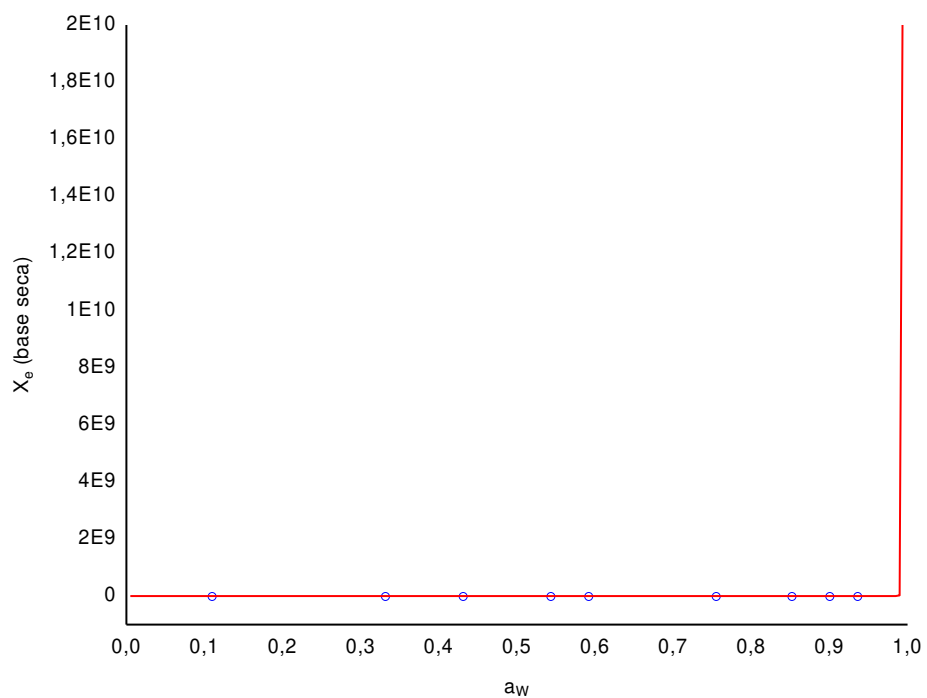


Figura 30. Isoterma de sorção do sensor inteligente na temperatura de 25 °C ajustada pelo modelo de HALSEY.

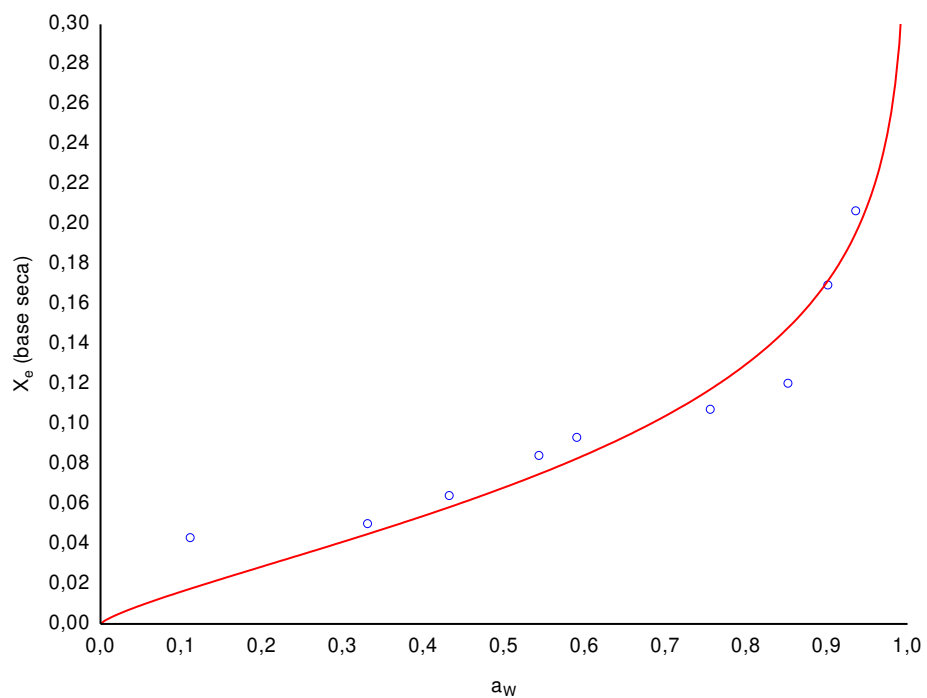


Figura 31. Isoterma de sorção do sensor inteligente na temperatura de 25 °C ajustada pelo modelo de HENDERSON.

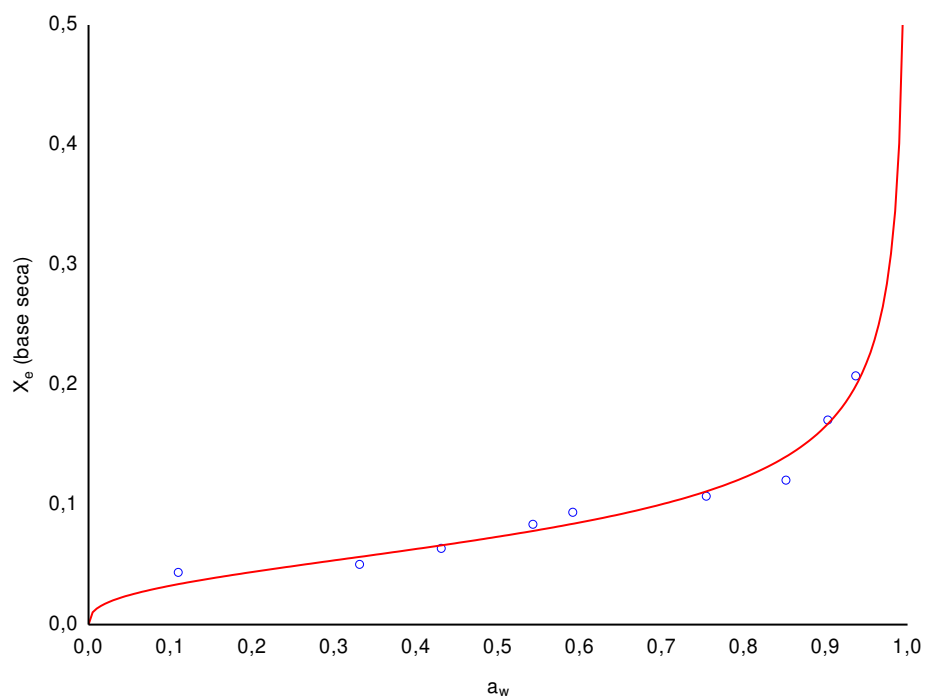


Figura 32. Isoterma de sorção do sensor inteligente na temperatura de 25 °C ajustada pelo modelo de OSWIN.

Nas Tabelas 13 e 14 são apresentados os valores das constantes dos modelos de GAB, BET, Halsey, Henderson e Oswin determinados com o software Statistica 5 e os parâmetros estatísticos, utilizados para a escolha do melhor modelo. De acordo com a Tabela 13, os modelos de GAB e Oswin apresentaram valores superiores de R^2 e variância explicada em relação aos demais modelos testados.

Conclui-se também que o sensor inteligente apresenta comportamento similar ao papel cartão, ou seja, suas isotermas de sorção apresentam o mesmo perfil que as isotermas do papel cartão não recoberto. Confirmado pelos valores dos parâmetros X_m e K nos modelos de GAB e Oswin.

O aumento no valor do parâmetro C, associado à entalpia de sorção da monocamada (Mulet *et al.*, 2002), do modelo de GAB é explicado pelo aumento no número de sítios polares devido à presença da quitosana.

Tabela 13 - Parâmetros de ajuste dos modelos para o papel cartão na temperatura de 25 °C.

Modelo	X_m	C	K	A	B	n	R^2	Variância explicada (%)
GAB	0,037382	1696373	0,847071	-	-	-	0,96	91,86
BET	0,014973	5,824014	-	-	-	-	0,59	34,33
HALSEY	-	-	-	0,055473	0,100000	-	-	-
HENDERSON	-	22,22620	-	-	-	1,241172	0,93	86,11
OSWIN	0,069645	-	0,359676	-	-	-	0,97	94,61

Tabela 14 - Parâmetros de ajuste dos modelos para o sensor inteligente na temperatura de 25 °C.

Modelo	X_m	C	K	A	B	n	R^2	Variância explicada (%)
GAB	0,039311	51179553	0,853588	-	-	-	0,98	95,74
BET	0,015973	11,343264	-	-	-	-	0,65	42,76
HALSEY	-	-	-	0,055635	0,100000	-	-	-
HENDERSON	-	23,20945	-	-	-	1,307672	0,96	92,00
OSWIN	0,073310	-	0,370441	-	-	-	0,98	96,97

A umidade age como facilitador na indicação da presença do gás H_2S , Figura 33, ou seja, independente da concentração do indicador adicionado na matriz de quitosana o aumento da umidade diminui o tempo de detecção do gás H_2S .

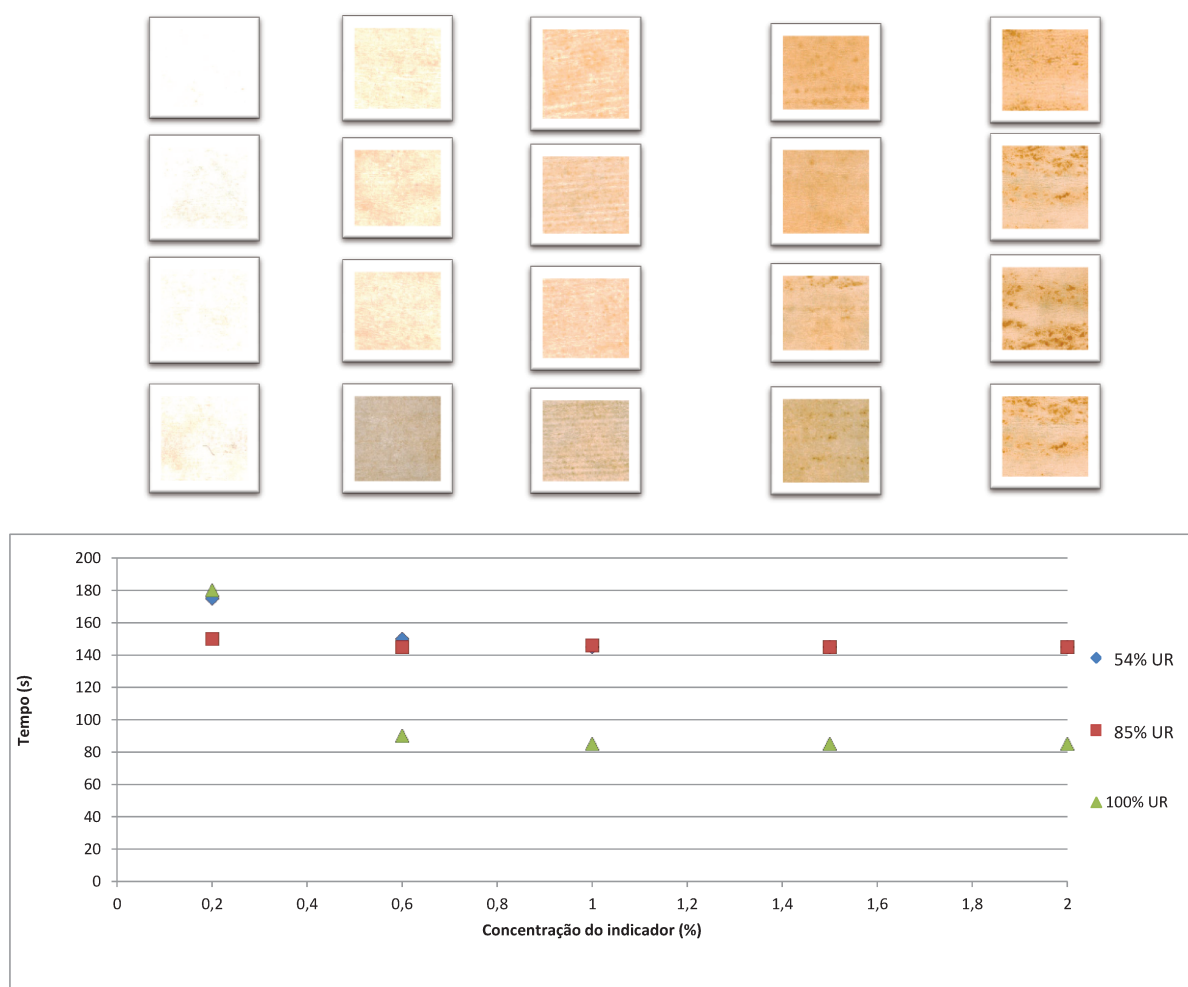


Figura 33. Efeito da umidade em função da concentração do indicador na indicação da presença do gás H_2S .

Na Figura 33 fica evidente que os sensores inteligentes com concentração de indicador na faixa de 0,6 a 2,0 % (m/m) apresentaram com o aumento da umidade de 85% a 100% uma diminuição de aproximadamente 60 s no tempo de resposta à presença do gás H_2S . Possivelmente devido ao inchamento da matriz polimérica facilitando assim a entrada do gás H_2S e sua subsequente interação com o indicador colorimétrico.

Devido ao seu caráter inovador no setor de sensores e por abordar uma preocupação atual quanto à qualidade e segurança em alimentos de grande consumo, foi feito um pedido de depósito de patente internacional, junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) no dia 18 de dezembro de 2009, sob o número de protocolo 018090056144 e junto ao *Patent Cooperation Treaty* (PCT) no dia 24 de novembro de 2010, sob o número do processo internacional PCT/BR2010/000394 (Capítulo 7 – ANEXO).

Os resultados foram apresentados nos trabalhos intitulados: “*Chitosan intelligent film: a fast detection of H₂S*” no V SIAQ 2010, como capítulo de livro (ISBN 978 8564131002), publicado sob a forma de artigo em revista indexada internacional Polymer International sob o título “*Fast detection of H₂S using a biodegradable colorimetric indicator system*” (DOI: 10.1002/PI.3095), no trabalho “*Characterization of a new hydrogen sulfide indicator*” no X EUCHIS 2011 e no trabalho intitulado “*Characterization of a new H₂S chitosan intelligent sensor and study of the influence of moisture content*” no VI SIAQ e XII ICCO 2012.

4.3.2. Trabalho completo apresentado no V Simpósio Ibero-Americano de Quitina – V SIAQ, Santiago do Chile – Chile, realizado de 7 a 10 de março de 2010.

Resumo

Um indicador inteligente foi desenvolvido combinando quitosana com indicador colorimétrico para presença de H₂S. O sistema apresentou uma resposta rápida à presença do gás H₂S.

Chitosan intelligent film: a fast detection of H₂S

E. T. KATO JR.^{1*}, **C. M. P. YOSHIDA**^{1,2}, **T. T. FRANCO**¹

ABSTRACT

An intelligent indicator system was developed combining chitosan as tridimensional biopolymer matrix and colorimetric indicator hydrogen sulfide gas, (H₂S). Chitosan is the partially deacetylated derivative of chitin, which is very abundant biopolymer usually discarded at tons by the fishing industry. Hydrogen sulfide (H₂S) is a flammable and colorless gas with a sweetish taste and characteristic odor of rotten eggs that can be poisonous at high concentrations, which can be generated in different industrial sectors (petrochemical, paper mills, food, etc). Products as canned vegetables (palm hearts, mushrooms), minimally processed food, *in natura* and vacuum packaged meat are potentially exposed to contamination before, during or after processing by anaerobic microorganisms, e.g. *Clostridium sp.* which produces H₂S as a metabolite. A biodegradable and intelligent system was developed based on chitosan film containing H₂S colorimetric indicator. Chitosan filmogenic solutions (3.0% w/w) were obtained and the indicator was incorporated at 2.0% (w/w). Colour variation on the chitosan system was measured along exposition time to H₂S gas in closed chambers. The indicator was able to produce black colour as a rapid response to the presence of H₂S.

Key words: chitosan film, intelligent packaging, colorimetric indicator, biodegradable

¹ School of Chemical Engineering –State of University of Campinas, UNICAMP – P.O. Box 6066, Cep.13083-970, Campinas – SP, Brazil. e-mail: kato_imel@yahoo.com.br

² Federal University of São Paulo, UNIFESP – Professor Artur Riedel Avenue, 275, Cep. 09.972-270, Diadema – SP, Brazil.

INTRODUCTION

Solid waste is a world problem and the improved management of wasted packaging has stimulated the development of biodegradable materials. The advantage of using natural polymers in packaging industry is the possible rapid biodegradation under composting and landfilling conditions^{[1],[2]}.

Several advantages were associated to biodegradable film, according to Srinivasa *et al.*^[3], since they are generally prepared by using natural materials such as polysaccharides, proteins and their derivatives, which are abundantly available. Polysaccharides, proteins and lipids constitute a group of biomaterials that readily form biofilms^[4], which have been investigated for their ability to retard the transport of moisture, gases, flavour and lipids^[5]. They can be used effectively as an alternative to synthetic plastics as long as the desirable overall mechanical and barrier properties are attended.

Chitosan is a polysaccharide derived from chitin by removing acetyl groups with alkali. Chitin is very abundant in nature, being found in fungal walls and exoskeletons of crustaceans and insects^[6]. Chitosan is an excellent film-forming linear polymer with a backbone consisting of β -(1-4)- 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose (*N*-acetyl glucosamine - GlcNAc) residues and glucosamine residues (GlcN). It is characterized by the degree of acetylation (DA) and average molecular weight (Mw), among other properties, e.g. degree of polymerization^[7], viscosity and solubility. Chitosan is low toxic, biodegradable and depending on its molecular structure, size and concentration, may inhibit the growth of fungi, bacteria and yeasts^[8]. It is soluble in dilute acid as it contains free amine groups ($-NH_2$) protonated in acidic solutions, which form ammonium groups ($-NH_3^+$)^[9]. These useful properties make chitosan a promising biodegradable polymer for active food packaging application^{[10],[11]}. Chitosan showed different useful film properties (water vapour transmission rate and mechanical properties such as tensile strength and elongation at break) when different additives, e.g. palmitic acid, beeswax or carnauba wax, were added in the mixture of the film-forming solutions^[12].

Intelligent packaging can be defined as a packaging system capable of carrying smart functions, e.g. detecting, sensing, recording, tracing, communicating, and applying scientific logic to facilitate decision making to extend shelf life, enhance safety, improving quality, providing information, and warning about possible problems. When integrated to science based principles, is a useful tool for tracking products and monitoring their conditions, facilitating real-time data access and exchange, and enabling rapid response and timely decision making^[13].

A colorimetric sensor may be defined as a substance that indicates the presence of another substance or the degree of reaction between two or more substances by a colorimetric change. In contrast indicators do not comprise receptor and transducer components and communicate information through direct visual change^[14].

The aim of this study was to develop biodegradable and intelligent system based on chitosan film containing a H₂S colorimetric indicator.

MATERIALS and METHODS

Raw materials

Chitosan (Primex, degree of acetylation, DA, of 18%, Island), acetic acid (Synth, Brazil), H₂S indicator (Synth, Brazil), sodium carbonate (Synth, Brazil) and card paper, Triplex TP 250 (Suzano Papel e Celulose, Brazil).

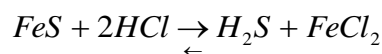
Intelligent system formation

Film solutions were prepared following the methodology proposed by Yoshida *et al.*^[12] dispersing chitosan (3.0%, w/w) in aqueous acetic acid. The stoichiometric amount of acetic acid was calculated from weight of sample and the DA, to achieve the protonation of the NH₂ sites. Chitosan solutions were homogenized by magnetic stirring at room temperature for 60 minutes and 2.0% (w/w) of the colourimetric indicator then added and well mixed to the filmogenic solution. Two grams of the prepared solution of chitosan and indicator were coated on card

paper sheets (16.5 x 27.5 cm) using a bar coater of 25µm of thickness manufactured by TKB Erichsen Instruments. The systems were dried in an oven at 150°C for a period of 90 seconds.

System response efficiency

The H₂S indicator response was measured submitting the coated paper sheets to different time exposition of H₂S gas, generated at room temperature by the reaction of 0.012g of FeS with HCl 1M (Reaction 1) in a closed chamber and slightly heated to accelerate the chemical reaction.



Reaction 2. H₂S gas generation by chemical reaction.

The amount of H₂S generated was determined stoichiometrically taking into account the volume of the chamber, 8000mL, and the purity of FeS informed by the manufacturer, as shown in Equations 1 and 2.

$$n_{H_2S} = \rho \cdot V \quad (Eq. 1)$$

With: $\rho = 0,04079 \text{ mol/dm}^3$ ^[15]; $V = 8 \text{ dm}^3$

$$m_{FeS} = MM_{FeS} \cdot n_{H_2S} \quad (Eq. 2)$$

With: $MM_{FeS} = 87,92 \text{ g/mol}$.

The color lightness parameter (L*) of the intelligent system was measured using a colorimeter (Konica Minolta Chroma Meter CR-400), according to Sobral *et al.*^[16].

Evaluation of the microstructure of the intelligent system

Scanning Electron Microscopy (SEM)

SEM analysis was performed on fractured cross-sections and the surface of gold-sputtered chitosan system using a LEO 440i scanning electron microscope (LEO Electron Microscopy Ltda.). SEM analysis was performed with voltage and amperage of 10kV and 50pA, respectively.

Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS)

Interaction of the primary beam with atoms in the sample causes shell transitions which result in the emission of an X-ray. The emitted X-ray has an energy characteristic of the parent element. Detection and measurement of the energy permits elemental analysis (EDS). An energy-dispersive (EDS) detector is used to separate the characteristic X-rays of different elements into an energy spectrum, and EDS system software is used to analyze the energy spectrum in order to determine the abundance of specific elements. EDS analysis was performed with voltage and amperage of 10kV and 600pA respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Intelligent chitosan system of H₂S presence was developed. Chitosan films obtained in our laboratory had a slightly yellow appearance (Figure 1a). The presence of the indicator induce a colour change of the chitosan films to a dark yellow colour (Figure 1b). Similar colour change was observed when the solution was applied as coating on the card paper surface (Figures 1c and 1d).

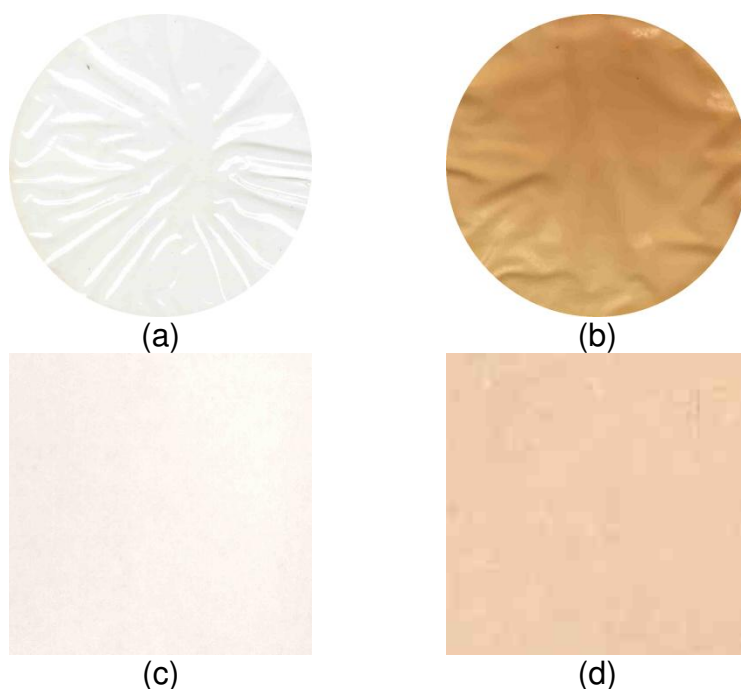


Figure 1 - Images of (a) film without indicator, (b) intelligente film with H_2S indicator, (c) card paper coating with chitosan without H_2S indicator and (d) intelligente indicator with H_2S indicator.

A compact and cohesive structure without pores or cracks was observed on SEM analysis (Figure 2) confirming the visual appearance. According to Li, Du and Xu ^[17], chitosan is almost completely adsorbed onto the surface of cellulosic fibers, and that the adsorption increases with the degree of deacetylation. The possible ways of interaction between chitosan and cellulose substrates can be hydrogen bonding, electrostatic interaction, van der Waals forces, covalent bonds and aggregation or association. The EDS analysis shows the H_2S indicator was uniformly distributed into chitosan matrix films represented by red points through chitosan matrix (Figure 2b).

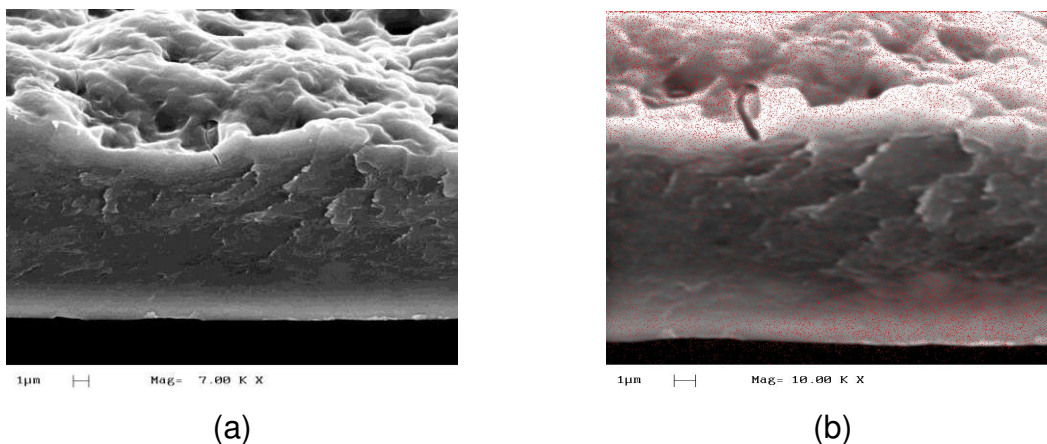


Figure 2 - SEM Micrographs for chitosan intelligent system (a) and (b) elemental analysis.

Indicator response efficiency

The intelligent system developed in this study showed an initial response at 30 seconds of exposure changing the colour from yellow to black. Figure 3 illustrates the colour variation under different exposition time with H₂S gas contact. The L* parameter value, indicating luminosity, was measured and its standard deviation in function of H₂S exposition time was shown in Figure 4, where is denoted that variation on L* parameter value after 90 seconds has no statistically significance difference at $p \leq 0.05$.

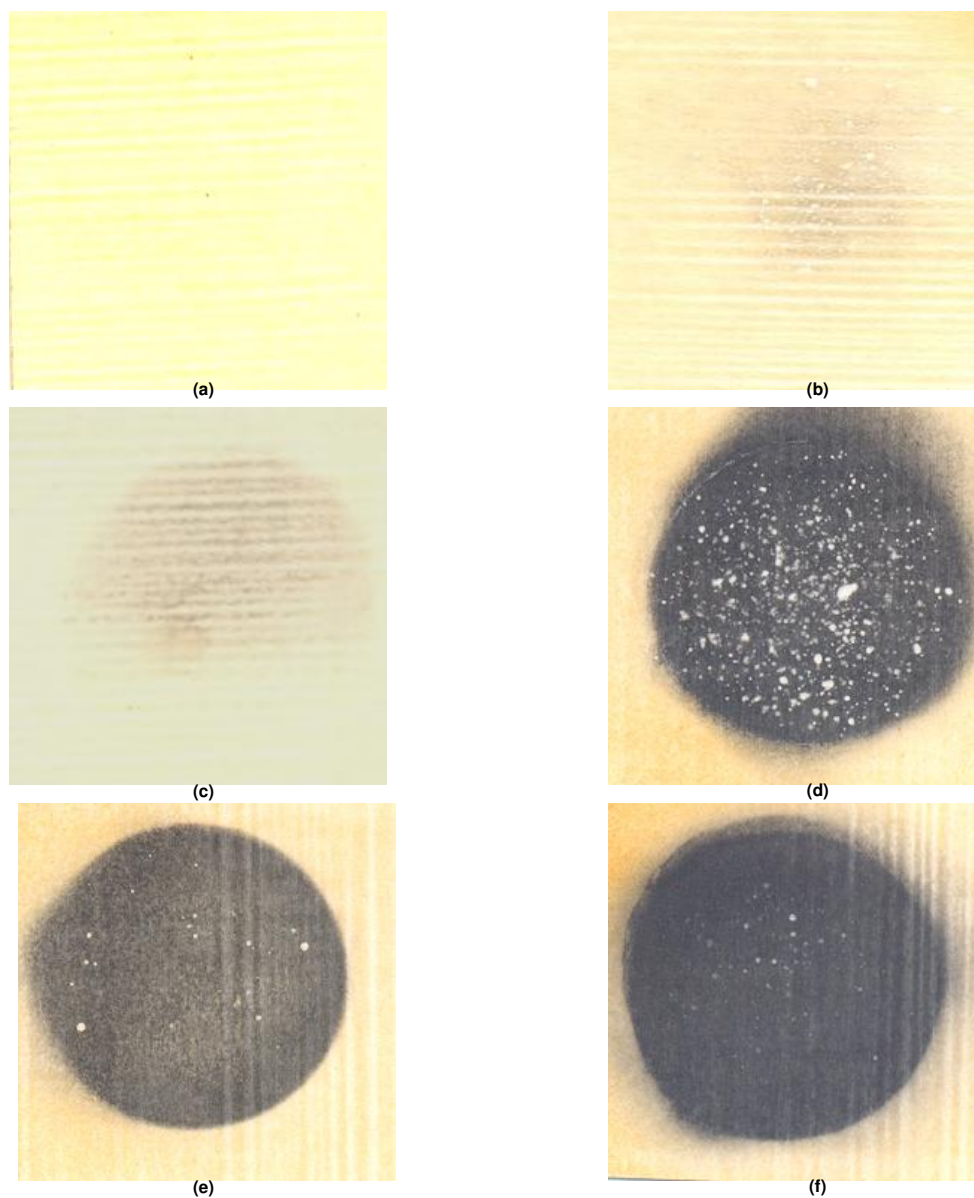


Figure 3 - Colour response of chitosan intelligent films at different H₂S gas exposition time (a) 0; (b) 30; (c) 60; (d) 90; (e) 120; (f) 180s.

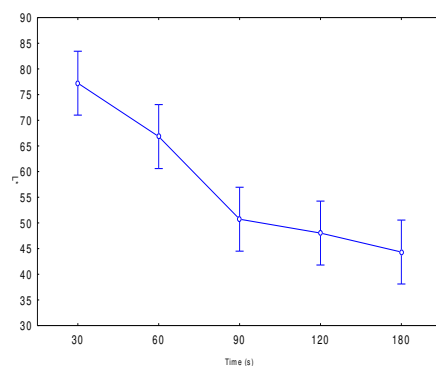


Figure 4 - L* parameter value vs. exposure time.

Sen *et. al.*^[18] developed a colorimetric sensor for detection of H₂S based on an inexpensive chemical sensor array (CSA) consisted of an array of chemoresponsive dyes manufactured by ChemSensing Inc.^[19] that undergoes a color change upon interacting with gases and vapors. They obtained to the lowest H₂S concentrations studied (50, 100, 250, 500 ppb) differences in magnitude of color change after 30 min of exposure, while 2 and 5ppm produce a initial response and reached saturation at 15 min.

There are several applications for this kind of intelligent system, from the petrochemical to food industries (e.g. indication of gas leaking of petrol processes to detection of H₂S a microbial metabolite released in conditions of anaerobiosis). The system communicates the presence of H₂S in case of leaks in the line of recovery, in critical points (e.g. joints, valves, connections), or informs the consumer about microbiological changes in the product during transportation and/or storage, indicating the state of freshness of the product.

The H₂S detection in low concentration is extremely important due to its effects on humans and animals. Concentrations of 10 ppm and above, causes conjunctival irritation, because sulfide and hydrogen sulfide anions are strong bases. Hydrogen sulfide affects the sensory nerves in the conjunctivae, so that pain is diminished rapidly and the tissue damage is greater. Serious eye damage is caused by a concentration of 50 ppm^[20]. Hydrogen sulfide causes odour nuisance at concentrations far below those that cause health hazards. On the basis of the scientific literature, it is not possible to state a specific concentration of hydrogen sulfide at which odour nuisance starts to appear. Half-hour average concentration exceeding 0.005 ppm is likely to produce substantial complaints among persons exposed^{[21],[22]}, however, at high concentrations, a person might lose their ability to smell it, this can make H₂S seriously dangerous^[23], so that the odour can no longer be recognized as a warning signal. At higher concentrations there is strong stimulation of the central nervous system (CNS)^[24], with hyperpnoea leading to apnoea, convulsions, unconsciousness, and death. At concentrations of over 940 ppm there is immediate collapse. In fatal human intoxication cases, brain oedema,

degeneration and necrosis of the cerebral cortex and the basal ganglia have been observed^[20].

CONCLUSIONS

New intelligent, biodegradable and fast indicator system was obtained to H₂S gas detection, comparing to methylene blue methodology which require longer times for response, the time needed just to sampling, in concentrations equal or larger than 7mg/m³, is 300 seconds and the reaction time can take up to an hour. This new intelligent system is at least 130 times faster. Chitosan intelligent system presents colour variation, from light yellow to black, in function of the H₂S gas contact. The chitosan intelligent system could offer an efficient alternative to petrochemical, chemical and foods industries to communicate the presence of H₂S in case of leaks in the line of recovery, in critical points (e.g. joints, valves, connections) and to food products, informing the safety and quality of product related to the H₂S variations during the transport and storage.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported both by FAPESP, CNPq and CAPES. The authors thank Primex for providing them chitosan samples.

REFERENCES

- [1] Ahvenainen, R. Active and Intelligent Packaging: an introduction. *In R. Ahvenainen (Ed) Novel Food packaging techniques*, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK, pp.5-21 (2003).
- [2] Rijk R, Proceedings of a conference on active and intelligent packaging development. *19th International Conference: Plastics & Polymers in Contact with foodstuffs*. Edinburgh, Scotland: Pira Intl (2002).
- [3] Srinivasa PC, Ramesh MN, Kumar KR and Tharanathan RN, Properties of chitosan films prepared under different drying conditions. *J. Food Eng.*, **63(1)**: 79-85 (2004).

- [4] Garcia MA, Pinotti A, Martino MN and Zaritzky NE, Characterization of composite hydrocolloid film. *Carbohydr. Polym.*, **56**: 339-345 (2004).
- [5] Pérez-Gago MB, Nadaud P, and Krochta JM, Water vapour permeability, solubility and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films. *J. Food Sci.*, **64** (6): 1034-1037 (1999).
- [6] Peter MG, Chitin and Chitosan from Fungi. *In: Biopolymers*, ed by Steinbüchel A, **6**: Polysaccharides II, *Weinheim: Wiley-VCH*, 123-157 (2002).
- [7] Muzzarelli RAA, Chitosan-based dietary foods. *Carbohydr. Polym.*, **29**: 306-316 (1996).
- [8] Tikhonov VE, Stepnova EA, Babak VG, Yamskov IA, Palma-Guerrero J, Jansson H-B, Lopez-Llorca LV, Salinas J, Gerasimenko DV, Avdienko ID and Varlamov VP, Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-2(3)-(dodec-2-enyl)succinoyl/-derivatives. *Carbohydr. Polym.*, **64**: 66-72 (2006).
- [9] Hon DN-S, Chitin and Chitosan: medical applications, *In: Polysaccharides in Medicinal Applications*, ed by Dumitriu S. Marcell Decker. New York, pp.794 (1996).
- [10] Aider M, Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Sci. Technol.*, **43**: 837–842 (2010).
- [11] Yoshida CMP, Bastos CEN and Franco TT, Modeling of potassium sorbate diffusion through chitosan films. *LWT - Food Sci. Technol.*, **43**: 584–589 (2010).
- [12] Yoshida CMP, Oliveira-Junior EN and Franco TT, Chitosan Tailor-Made Films: the effects of additives on barrier and mechanical properties. *Packaging Science and Technology*, **22**: 161-170 (2009).
- [13] Yam KL, Takhistov PT and Miltz J, Intelligent Packaging: Concepts and Applications, *J. Food Sci.*, **70**: n.1 (2005).

- [14] Kerry JP, O'Grady MN and Hogan SA, Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Sci.*, **74**: 113-130 (2006).
- [15] Poling BE, Thomson GH, Friend DG, Rowley RL and Wilding WV, Perry's Chemical Engineers' Handbook. 8TH Edition, Section 2 Physical and Chemical Data, The McGraw-Hill Companies, Inc., USA (2008).
- [16] Sobral PJA, Menegalli FC, Hubinguer MD and Roques MA, Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films, *Food Hydrocolloids*, **3-4**: n.15, 423-32 (2001).
- [17] Li H, Du Y, and Xu Y, Adsorption and complexation of chitosan wet-end additives in papermaking systems, *J. Appl. Polym. Sci.*, **91**: 2642-2648 (2004).
- [18] Sen A, Albarella JD, Carey JR, Kim P and McNamara III WB, Low-cost colorimetric sensor for the quantitative detection of gaseous hydrogen sulfide, *Sens. Actuators, B*, **134**: 234-237 (2008).
- [19] Rakow NA and Suslick KS, A colorimetric sensor array for odour visualization, *Nature*, **406**: 710-713 (2000).
- [20] Savolainen H, Nordiska expertgruppen for gransvardesdokumentation. 40. Dihydrogensulfid [Nordic expert group for TLV evaluation. 40. Hydrogen sulfide]. *Arbeta och halsa*, **31**: 1-27 (1982).
- [21] Lindvall T, On sensory evaluation of odorous air pollutant intensities. Measurements of odor intensity in the laboratory and in the field, with special reference to effluents of sulfate pulp factories. *Nordisk hygienisk tidskrift*, **51**(Suppl. 2): 36-39 (1970).
- [22] National Research Council. *Odors from stationary and mobile sources*. Washington, DC, National Academy of Sciences, 1979, p. 491.
- [23] ASTDR - Agency for toxic substances and disease registry (2006), *Toxicological profile for hydrogen sulfide*, US. Department of health and human services, Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease

Registry. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp114.html>. [Accessed in 28 april 2009].

[24] *Hydrogen sulfide*. Geneva, World Health Organization, 1981 (Environmental Health Criteria, No. 19).

4.3.3. Artigo publicado na revista indexada *Polymer International*, v.60, Issue 6, 2011 (Article first published online : 2 MAY 2011, DOI: 10.1002/pi.3095

Resumo

Um rápido sistema colorimétrico foi desenvolvido através da combinação de quitosana como uma matriz tridimensional e FeSO_4 como indicador colorimétrico do gás sulfídrico (H_2S). A novidade do presente trabalho foi a biodegradabilidade e a formação rápida de dispositivo para indicar a presença de H_2S . O sensor inteligente detectou a presença de H_2S , em concentrações iguais ou superiores a 100 ppm, em menos de 30 s de exposição e produziu uma cor preta como resposta colorimétrica à presença do H_2S .

Fast detection of hydrogen sulfide using a biodegradable colorimetric indicator system

Edison T Kato Jr,^a Cristiana MP Yoshida,^{a,b} Arlete B Reis,^{a,c} Itamar S Melo^d and Telma T Franco^{a*}

Abstract

A fast, colorimetric indicator system was developed by combining chitosan as a three-dimensional biopolymer matrix and ferrous sulfate (FeSO_4) as a colorimetric indicator of hydrogen sulfide (H_2S) gas. Chitosan filmogenic suspensions (3.0% w/w) were obtained and FeSO_4 was incorporated at 2.0 wt%. The colour parameters were measured using a colorimeter, after subjecting the system to various H_2S exposure times. The novelty of this work is the biodegradability, a test performed in soil, which showed a weight loss of about 67% after 60 days, and the fast device formation indicating the presence of H_2S gas. The chitosan- FeSO_4 system detected the presence of H_2S in concentrations equal to or greater than 100 ppm within 30 s of exposure and produced a visual black colour as a response to the presence of H_2S .

© 2011 Society of Chemical Industry

Keywords: chitosan; indicator; H_2S ; biodegradation

INTRODUCTION

Solid waste is a worldwide problem and the increasing demand for waste management of packaging materials has stimulated interest in biodegradable materials. The advantage of the application of natural polymers to the packaging industry is their rapid degeneration under compost and landfill conditions.^{1,2}

Chitosan is a polysaccharide derived from chitin by removing the acetyl groups with alkali. Chitin is very abundant in nature, as it is found in fungal cell walls and the exoskeletons of crustaceans and insects.³ Chitosan is an excellent film-forming linear polymer with a backbone consisting of β -(1-4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucose (N-acetyl glucosamine) residues and glucosamine residues. It is characterised by its degree of acetylation (DA) and its weight-average molecular weight (M_w), among other properties (e.g. degree of polymerisation).⁴ Chitosan has a low toxicity and is biodegradable. Also, depending on its molecular structure, size and concentration, it may inhibit the growth of fungi, bacteria and yeasts.⁵

A colorimetric sensor is defined as a substance that indicates the presence of another substance or the degree of a reaction between two or more substances with a colorimetric change using a receptor and a transducer. In contrast, indicators communicate information through direct visual change.⁶

Chitosan has been used as a matrix for several biosensors. Qiu *et al.*⁷ developed a methodology based on the characteristics of chitosan-branched ferrocene and gold nanoparticles to design a label-free amperometric immunosensor for the sensitive detection of the hepatitis B surface antigen as a model protein. Champaiboon *et al.*⁸ developed a colorimetric chemosensor for the naked eye detection of water-soluble aromatic compounds. With this chemosensor, a clean glass slide, used as a substrate, was dipped into a chitosan solution (0.1% w/v) and then rinsed, and then the glass slide was dipped into a polyelectrolyte multilayer film of poly(10,12-pentacosadiynoic acid). The slide was rinsed again

and then dipped into the chitosan solution to form another layer. The polyelectrolyte multilayer film changes from blue to red when immersed in a 10 mmol L⁻¹ α -cyclodextrin solution.

To Thévenot *et al.*⁹ and Justino *et al.*¹⁰ a chemical sensor is defined as a device that transforms chemical information, ranging from the concentration of specific components to the global properties of samples, into an analytically useful signal. Chemical sensors usually contain two basic components connected in series: a molecular recognition system (receptor) and a physicochemical transducer.

Hydrogen sulfide (H_2S) can be generated in a variety of industries, such as petrochemical, paper, food and many others.¹¹ It is a flammable and colourless gas with a sweet taste and a characteristic odour of rotten eggs, and it can be poisonous at high concentrations.¹² The ability to detect H_2S in low concentrations is extremely important because of the effects of the gas on humans. At high concentrations, a person might lose his or her ability to smell it, making H_2S very dangerous,¹³ because the odour can no longer be recognised as a warning signal. This

* Correspondence to: Telma T Franco, School of Chemical Engineering, State of University of Campinas, UNICAMP, Cep. 13083-970, Campinas, SP, Brazil. E-mail: franco@feq.unicamp.br

a School of Chemical Engineering, State of University of Campinas, UNICAMP, Cep. 13083-970, Campinas, SP, Brazil

b Federal University of São Paulo, UNIFESP, Department of Exact and Earth Science, Av. Prof. Artur Riedel, 275, Cep. 09.972-270, Diadema, SP, Brazil

c Federal University of Vales do Jequitinhonha e Mucuri, UFVJM, Technology and Science Institute, Campus II Rodovia MGT, Km 583 no. 5000, Cep. 39100-000, Diamantina, MG, Brazil

d EMBRAPA, Microbiologia, Rodovia SP-340, km 127.5, Tanquinho Velho 13820000, P.O. ox 69, Jaguariuna, SP - Brazil

gas stimulates the central nervous system,¹⁴ with hyperpnoea leading to apnoea, convulsions, unconsciousness and death. At concentrations over 940 ppm, a person immediately collapses upon exposure. In fatal human intoxication cases, brain oedema, degeneration and necrosis of the cerebral cortex and the basal ganglia have been observed.¹²

Chemical sensors for H₂S have been developed in recent years. Galardon *et al.*¹⁵ developed a fluorescent zinc complex by the reaction of Tp^{Ph,Me} (tris(pyrazolyl)borate ligand, where Ph represents phenyl and Me for methyl substitution) Zn(OH) with 7-mercapto-4-methylcoumarin, but in order to determine a gaseous concentration, aqueous solubilisation is required. The authors claim that it is the first selective sensor, based on fluorescence, for H₂S in a partially aqueous solution. Gaspara *et al.*¹⁶ synthesised and characterised thin films of TiO₂-NiO containing gold nanoparticles. The functional activity of the films as H₂S optical sensors is due to gold-localised surface plasmon resonance, which is reversible. The response and recovery times of the material are strongly related to the gas concentration. For concentrations higher than 100 ppm, the recovery behaviour is less efficient than it is at lower concentrations, indicating a desorption equilibrium. However, for very low concentrations (a few parts per million), the response time increases, and the absorption value between 10 and 100 ppm of H₂S exposure is almost the same. According to previous studies, this behaviour suggests a saturation of the reactive sites of the sample, even at 10 ppm, so an equilibrium between the absorption and desorption of H₂S over the active surface occurs.¹⁶ Tu *et al.*¹⁷ made a platinum-doped mesoporous indium oxide through a simple and effective *in situ* nanocasting method, which exhibited excellent H₂S-sensing properties with high sensitivity. The sensor response was measured under steady-state conditions and the sensitivity was defined as the ratio between sensor resistances in the absence (R_{air}) and the presence (R_{gas}) of H₂S. The authors stated that the sensitivity increased significantly with H₂S concentration, and an approximately linear relationship between the sensitivity and concentration was observed for the lower concentration range of 2 to 300 ppm. Sen *et al.*¹⁸ developed a colorimetric sensor for the detection of H₂S based on an inexpensive chemical sensor array that consisted of an array of chemoresponsive dyes manufactured by ChemSensing Inc.¹⁹ that undergo a colour change upon interacting with gases and vapours. They obtained differences in the magnitude of the colour change after 30 min of exposure with the lowest concentrations studied (50, 100, 250, 500 ppb), but concentrations of 2 and 5 ppm produced an initial response and reached saturation after 15 min.

There are several applications for this kind of indicator system, from those in the petrochemical to food industries. It can be used as an indication of gas leaking from petrol processing or to detect H₂S as a microbial metabolite released in conditions of anaerobiosis (e.g. *Clostridium* spp.). The system can communicate the presence of H₂S in the case of leaks in the line of recovery and at critical points (e.g. joints, valves, connections), or it can inform the consumer about microbiological changes in a product during transportation and/or storage, indicating the freshness of the product.

The aim of the study reported here was to develop a fast, colorimetric H₂S indicator using chitosan as the biodegradable polymer matrix, card paper as the support and ferrous sulfate (FeSO₄) as the colorimetric indicator. Initially, an FeSO₄-chitosan film system was studied, but the drying period to obtain the samples was a critical point in the process. Then, suspensions

were applied on a card paper surface, which reduced the drying period from 48 h to 90 s. The usual colour efficiency was verified in the chitosan-FeSO₄ (CH-Fe) card paper system. In this study the H₂S gas was obtained by chemistry reaction, and the lowest concentration achieved was 100 ppm. No report of a H₂S indicator based on a biodegradable matrix was found in the literature.

MATERIALS AND METHODS

Raw materials

Commercial chitosan used in this study was provided by Primex (Iceland), obtained from the exoskeleton of coldwater shrimps. It had a DA of 18%, M_w of 2.38×10^5 g mol⁻¹ (dn/dc of 0.135 mL g⁻¹) and polydispersity of 2.89.

Molecular weight and polydispersity determinations were performed using gel permeation chromatography. A 0.15 mol L⁻¹ ammonium acetate/0.2 mol L⁻¹ acetic acid buffer (pH = 4.5) was used as the eluent. A suspension of 0.1% (w/w) chitosan and 10% (w/w) acetic acid was prepared and left to stir with a magnetic bar for 15 h to ensure complete dissolution. Aliquots of 1000 μ L were filtered with Millex LCR 13 mm syringe filters (0.44 μ m; Millipore). This was followed by injecting 200 μ L of sample with a loop of 199 μ L for analysis using a TDA 302 equipped with a pump (Waters 515), a degasser (Viscotek 7510), an injector (Rheodyne 7725i) and a light scattering 90° (RALS) detector (Viscotek TDA 302) at room temperature. The columns used were Ultrahydrogel™ Linear (7.8 $\times$ 300 mm; Waters).

Glacial acetic acid (Synth, Brazil), iron(II) sulfate heptahydrate (Sigma, Germany; >99%), ferrous sulfide (Synth, Brazil; 25%), sodium carbonate (Synth, Brazil; >99%) and card paper (Triplex TP 250, 250 g m⁻², Suzano Papel e Celulose, Brazil) were also used.

CH-Fe system formation

Film solutions were prepared following the methodology proposed by Yoshida *et al.*²⁰ of dispersing chitosan (3.0 wt%) into aqueous acetic acid. The stoichiometric amount of acetic acid was calculated from the sample weight and the DA to achieve the protonation of all NH₂ sites.²¹ The chitosan suspensions were homogenised by magnetic stirring at room temperature for 60 min and then 2.0 wt% of FeSO₄ was added and homogenised for 1 min. The concentration of FeSO₄ used in this study was optimised in preliminary studies using an experimental design (independent parameters: concentration of colorimetric indicator (0.2–2.0 wt%), time of exposure to H₂S (30–180 s) and coating thickness (0.40–3.20 g m⁻²); dependent parameter: colorimetric response). The concentration of 2.0 wt% FeSO₄ corresponded to the optimum region. Aliquots of 9.0 mL were poured into Petri dishes (9.0 cm) and dried at room temperature for 48 h, forming CH-Fe film system. Two grams of the final suspension was applied as a coating on card paper sheets (16.5 $\times$ 27.5 cm²) using a bar coater of 25 μ m in thickness (TKB Erichsen Instruments, Brazil). The coated paper was dried in an oven at 150 °C for 90 s forming a CH-Fe card paper system.

Evaluation of microstructure of CH-Fe system

The microstructure and morphology of the CH-Fe system were characterised using SEM and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS). The SEM analysis was performed on fractured cross-sections and the surface of the gold-sputtered chitosan system using a LEO 440i SEM (LEO Electron Microscopy Ltd). The SEM analysis was performed with an acceleration voltage of 10 kV and a current

of 50 pA. The EDS analysis was performed with an acceleration voltage of 10 kV and a current of 600 pA.

CH-Fe card paper system response efficiency

The CH-Fe card paper system was placed in contact with H₂S gas for various exposure times. The gas was generated at room temperature by the reaction of 0.012 g of FeS with 1 mol L⁻¹ HCl, at a controlled solution temperature (40 °C) to accelerate the chemical reaction.

The amount to generate the H₂S was determined stoichiometrically to achieve a concentration of 100 ppm in the chamber. The calculation accounted for the chamber volume (8 L), the FeS purity and the precision of the analytical balance. It also assumed a total reaction, as shown in Eqns (1) and (2):

$$n_{\text{H}_2\text{S}} = \rho V \quad (1)$$

with $\rho = 0.04079 \text{ mol L}^{-1}$ (molar density at 278 K)²² and $V = 8 \times 10^{-4} \text{ L}$; and

$$m_{\text{FeS}} = \frac{MM_{\text{FeS}} \times n_{\text{H}_2\text{S}}}{\tau} \quad (2)$$

with $MM_{\text{FeS}} = 87.92 \text{ g mol}^{-1}$ and $\tau = 0.25$.

The reaction between the metal ions (Fe²⁺) of the CH-Fe system and H₂S gas results in FeS, which presents as a black colour on the CH-Fe system surface. The lowest concentration achieved was 100 ppm based on the limitation of precision of measurements.

The CH-Fe system response efficiency was measured using the variation in the colour parameters. After H₂S exposure, the colour lightness parameter (L^* , which ranged from 0 (black) to 100 (white)) of the biodegradable indicator system was measured at three different points, aimed at calculating the standard deviation, using a colorimeter (Konica Minolta Chroma Meter CR-400, Japan), according to Sobral *et al.*²³

Biodegradation test in soil

The methodology to test biodegradation in soil was adapted from Hosokawa *et al.*²⁴ A natural soil was used as the biodegradation environment. Dried samples (0.80 g) of paper, chitosan film and chitosan film–paper were enclosed separately in nylon meshes (10 × 10 cm) and then were buried about 10 cm beneath the soil. Gravimetric measurements were performed 1 to 60 days after the samples were buried. The degraded samples were removed from the nylon meshes, then dried in an oven at 105 °C and weighed using an analytical balance (Scientech, model SA 210).

Also, biofilm formation on sample surfaces was evaluated using SEM (Gemini Leo 982 Leica Zeiss) under an acceleration voltage of 10 kV. The samples tested were stored in plastic vials containing 10 mL of a solution of common soil and distilled water in the proportion of 100 g to 1 L, respectively, at room temperature to accelerate the biodegradation process. Samples were collected after 3, 8, 12 and 72 h. The SEM analysis was performed after treating the samples by submerging them in a fixative solution (Karnowisk), drying them with a CPD 030 critical point dryer (model BALZERS) and coating them with gold (Emitech sputter coater).

RESULTS AND DISCUSSION

A biodegradable indicator of the presence of H₂S was developed. The chitosan films made in our laboratory are flexible and resistant

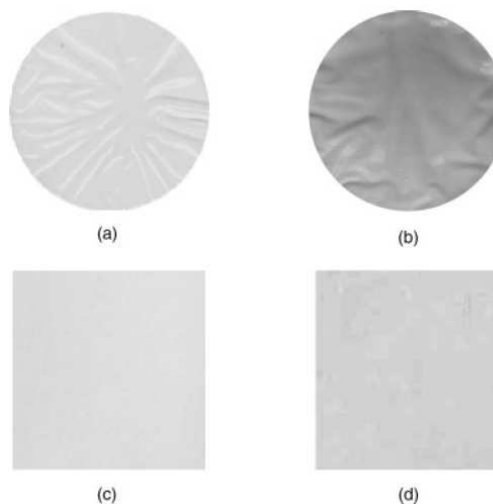


Figure 1. Images of (a) chitosan film, (b) chitosan–FeSO₄ film, (c) chitosan–card paper and (d) CH-Fe system.

and have a slightly yellow appearance before adding the indicator system (Fig. 1(a)). The presence of FeSO₄ changes the final colour of the chitosan indicator system to a dark yellow colour (Fig. 1(b)). The same colour difference is observed after coating a card paper surface with the chitosan suspension (Figs 1(c) and (d)). The application of the chitosan suspension on the card paper surface greatly reduces the time required for the drying process. The chitosan films are completed after 48 h at 25 °C and 70% relative humidity, whereas the CH-Fe system takes only 90 s for 'ready' samples.

The microstructure of the colorimetric sensor CH-Fe film and the CH-Fe card paper system indicates a compact and cohesive structure without pores or cracks (Fig. 2). Fernandes *et al.*²⁵ proposed that the distribution of chitosan on the chitosan-coated paper is uniform, that this macromolecule does not have a preferential way to cover the surface of the paper and that the penetration of chitosan into the sheets occurs progressively with the first layers. Gällstedt *et al.*²⁶ showed that Young's modulus decreases faster and the fracture stress, fracture strain and tear resistance increase faster with increasing coat weight of chitosan (chitosan–acetic acid salt) than those of proteins (whey protein isolate, whey protein concentrate and wheat gluten protein). This is probably due to the higher uniformity of the chitosan coating than the protein coating at comparable coat weights.

The homogeneity of the coating surface is an important characteristic that helps to maintain the integrity and properties of the CH-Fe system. The uniform distribution of the FeSO₄ onto the surface was verified using EDS, where the small dots in Figs 2(b) and (d) represent the metal ions (Fe²⁺) throughout the chitosan matrix. This would indicate that the CH-Fe system will change colour uniformly and that it will be possible to see the colour change across the entire surface area.

CH-Fe card paper system response efficiency

The CH-Fe card paper system efficiency was evaluated from colour variations. The colour of the CH-Fe card paper system visibly

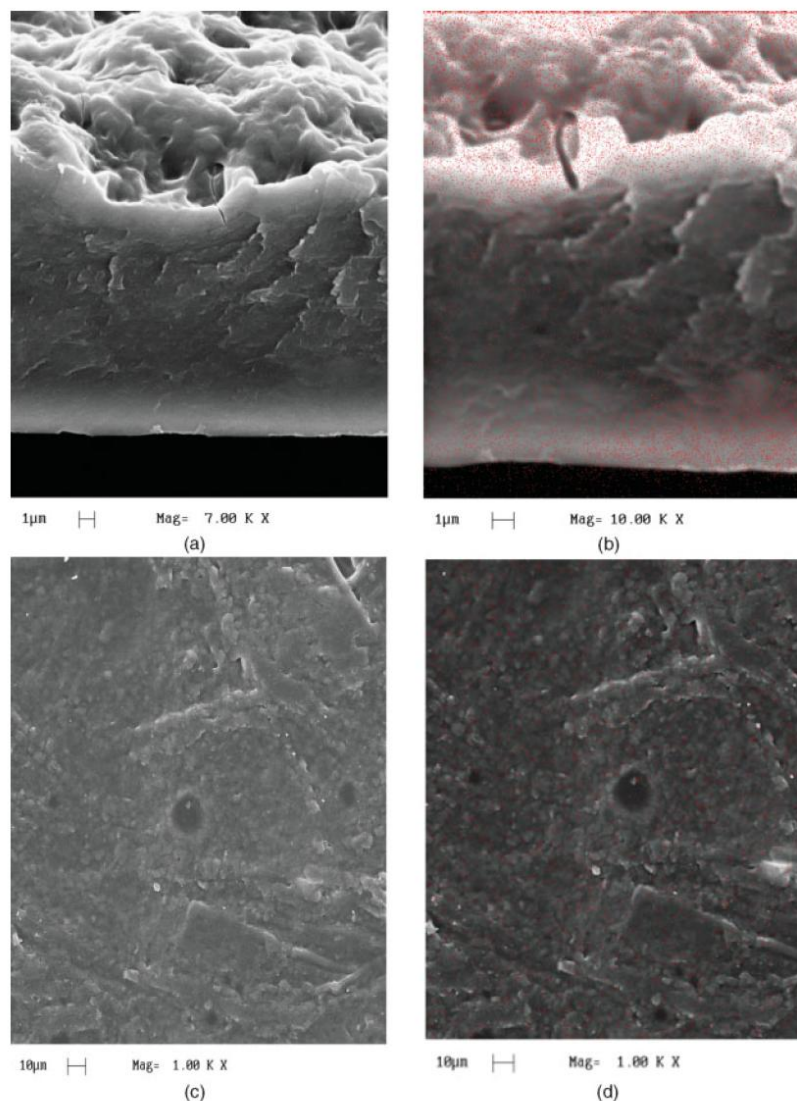


Figure 2. Microstructure of (a) SEM film cross-section view, (b) EDS colorimetric sensor film cross-section view, (c) SEM card paper surface view and (d) EDS CH-Fe system surface view. (The small dots in (b) and (d) represent the uniform distribution of Fe^{2+}).

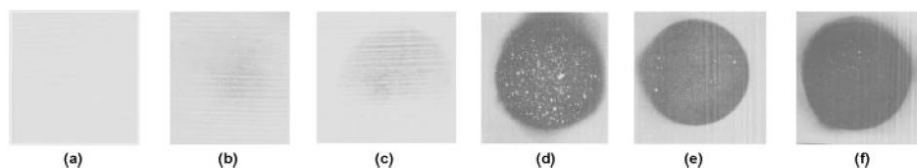
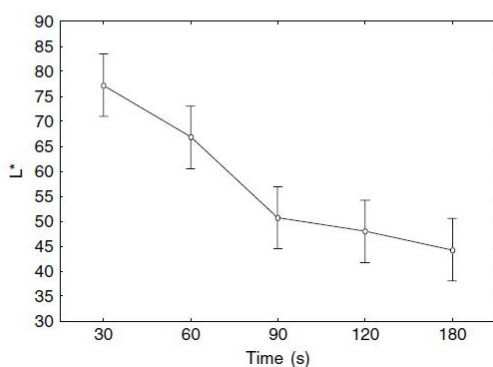


Figure 3. Colour response of the biodegradable indicator system after H_2S gas exposure, at 100 ppm, for various times: (a) 0 s; (b) 30 s; (c) 60 s; (d) 90 s; (e) 120 s; (f) 180 s.

Table 1. Weight loss of samples degraded in soil and subjected to gravimetric analysis

Sample	Weight loss, w_{loss} (%)					
	1 day	3 days	7 days	15 days	30 days	60 days
Chitosan film	74.2 ± 0.1 ^{aA}	96.9 ± 0.1 ^{bA}	89.6 ± 0.1 ^{cA}	97.1 ± 0.0 ^{dA}	100.0 ± 0.0 ^{eA}	100.0 ± 0.0 ^{eA}
Chitosan film–paper	4.7 ± 0.1 ^{aA}	4.9 ± 0.1 ^{aB}	13.9 ± 0.1 ^{bB}	21.5 ± 0.1 ^{cB}	42.8 ± 0.1 ^{dB}	67.6 ± 0.1 ^{eB}
Paper	5.6 ± 0.0 ^{aA}	4.8 ± 0.2 ^{bB}	12.1 ± 0.1 ^{cC}	21.6 ± 0.1 ^{dB}	38.5 ± 0.1 ^{eC}	62.7 ± 0.0 ^{fC}

^{a–f} Different letters on the same row stand for a significant difference ($p > 0.05$) concerning the averages obtained through Tukey's test.
^{A–C} Different upper-case letters in the same column stand for a significant difference ($p > 0.05$) concerning the averages obtained through Tukey's test.

**Figure 4.** Colour variation (L^* parameter), performed in triplicate, of the CH-Fe system as a function of exposure time to H₂S gas at 100 ppm.

changes from yellow to black after 30 s of H₂S exposure at 100 ppm. Figure 3 illustrates the colour variation with various exposure times of H₂S gas contact. Statistica 5.0 software was used to perform a Tukey test. The L^* values after 90 s are no different at a statistical significance of $p \leq 0.05$ (Fig. 4).

The CH-Fe card paper system indicates the presence of H₂S gas after 30 s. This is considered a fast detection in comparison to the usual method applied to identify H₂S gas, which is the methylene

blue method. The methylene blue method requires 300 s just to acquire the sample in concentrations equal to or greater than 4.66 ppm, and the reaction time can be up to an hour.

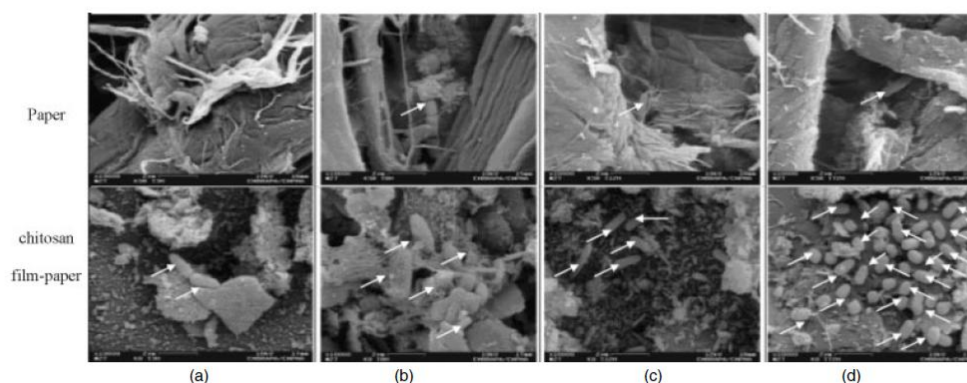
The CH-Fe card paper system does not show a colorimetric response when it is exposed to ammonia, formaldehyde, hydrogen chloride, carbon monoxide and carbon dioxide. This suggests that it has a highly selective response to H₂S gas.

Biodegradation test in soil

The weight loss, w_{loss} (%), of the samples in soil was calculated by the difference between the initial and final weights after periods of 1, 3, 7, 15, 30 or 60 days. A gradual reduction in weight is observed for all samples (Table 1).

The reduction is more evident in the chitosan film samples, which almost completely biodegrade after 3 days. The paper and chitosan film–paper samples show weight losses of about 38 and 42%, respectively, after 30 days and 62 and 67%, respectively, after 60 days. These results indicate that the chitosan film–paper follows the paper degradation time. According to Rutiaga *et al.*,²⁷ pectin and chitin films in soil took about 46 days to complete biodegradation. Wu²⁸ determined that polycaprolactone blended with 20 wt% chitosan showed 20% weight loss in 16 weeks.

The strongest evidence of biofilm formation, i.e. microbiological growth indicated by white arrows in Fig. 5, is observed in the chitosan film–paper samples (8 h), which may be associated with the beginning of paper degradation in the soil. A larger deposition of bacterial cells is observed in the paper–chitosan samples after

**Figure 5.** SEM micrographs of paper and paper–chitosan system with emphasis on biofilm formation (white arrows) as a function of biodegradation time: (a) 3 h; (b) 8 h; (c) 12 h; (d) 72 h.

72 h, indicating that the chitosan coating acts as a substrate for cell reproduction. This is also indicated by the increased formation of bacterial cells at the collection times compared to the paper samples (3, 8, 12 and 72 h).

CONCLUSIONS

The CH-Fe card paper system is an efficient indicator of the presence of H_2S . It is at least 130 times faster than the usual methods of H_2S detection because after 30 s of H_2S exposure, the indicator becomes black. The CH-Fe card paper system presents a visual colour change, changing from yellow to black, as a function of the H_2S gas contact at concentrations of 100 ppm. This indicator system could offer an efficient alternative for safety devices in the petrochemical, chemical and food industries to indicate the presence of H_2S . It could be used to identify leaks in the line of recovery, and at critical points (e.g. joints, valves, connections). For food products, it could yield useful information on the safety and quality of a product related to H_2S variations during transport and storage. Further studies are being conducted to expand the detection range of the CH-Fe system.

APPENDIX: ABBREVIATIONS AND PARAMETERS

CH-Fe	chitosan-iron system
DA	degree of acetylation (%)
L^*	colour lightness parameter
M_w	weight-average molecular weight ($g\ mol^{-1}$)
V	volume (m^3)
w_{loss}	weight loss (%)
ρ	molar density ($mol\ L^{-1}$)
τ	purity (%)

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by FAPESP, CNPq and CAPES. The authors thank Primex for providing the chitosan samples.

REFERENCES

- Ahvenainen R, Active and intelligent packaging, in *Novel Food Packaging Techniques*. Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 5–21 (2003).
- Rijk R, *Plastics & Polymers in Contact with Foodstuffs*. Pira International, Edinburgh (2002).

- Peter MG, Chitin and chitosan from fungi, in *Biopolymers*, vol. 6: *Polysaccharides II*, ed. by Steinbächel A. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 123–157 (2002).
- Muzzarelli RAA, *Carbohydr Polym* **29**:306–316 (1996).
- Tikhonov VE, Stepanova EA, Babak VG, Yamskov IA, Palma-Guerrero J, Jansson H-B, et al, *Carbohydr Polym* **64**:66–72 (2006).
- Kerry JP, O'Grady MN and Hogan SA, *Meat Sci* **74**:113–130 (2006).
- Qiu J-D, Liang R-P, Wang R, Fan L-X, Chen Y-W and Xia X-H, *Biosens Bioelectron* **25**:852–857 (2009).
- Champaiboon T, Tumcharern G, Potisatituenyong A, Wacharasindhu S and Sukwattanasinitt M, *Sens Actuators B* **139**:532–537 (2009).
- Thévenot DR, Toth K, Durst RA and Wilson GS, *Biosens Bioelectron* **16**:121–131 (2001).
- Justino CIL, Rocha-Santos TA and Duarte AC, *Trends Anal Chem* **29**:1172–1183 (2010).
- Svendsen K, *Arbete och Hälsa* **127**:1–310 (2001).
- Savolainen H, *Arbete och Hälsa* **31**:1–27 (1982).
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), *Toxicological Profile for Hydrogen Sulfide*. [Online]. US Department of Health and Human Services, Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2006). Available: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp114.html> [28 April 2009].
- Hydrogen Sulfide, Environmental Health Criteria*, no. 19. World Health Organization, Geneva (1981).
- Galaron E, Tomas A, Roussel P and Artaud I, *Dalton Trans* **9126**–9130 (2009).
- Gaspera ED, Guglielmi M, Agnoli S, Granozzi G, Post ML, Bello V, et al, *Chem Mater* **22**:3407–3417 (2010).
- Tu J, Li N, Lai X, Chi Y, Zhang Y, Wang W, et al, *Appl Surf Sci* **256**:5051–5055 (2010).
- Sen A, Albarella JD, Carey JR, Kim P and McNamara III WB, *Sens Actuators B* **134**:234–237 (2008).
- Rakow NA and Suslick KS, *Nature* **406**:710–713 (2000).
- Yoshida CMP, Oliveira-Junior EN and Franco TT, *Packag Technol Sci* **22**:161–170 (2009).
- Notin L, Viton C, David L, Alcouffe P, Rochas C and Domard A, *Acta Biomater* **2**:387–402 (2006).
- Poling BE, Thomson GH, Friend DG, Rowley RL and Wilding WV, Physical and chemical data, in *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, 8th edition, ed. by Green DW and Perry RH. McGraw-Hill, New York, section 2 (2008).
- Sobral PJA, Menegalli FC, Hubinguer MD and Roques MA, *Food Hydrocol* **3**–4:423–432 (2001).
- Hosokawa J, Nishiyama M, Yoshihara K and Kubo T, *Ind Eng Chem Res* **29**:800–805 (1990).
- Fernandes SCM, Freire CSR, Silvestre AJD, Pascoal Neto C, Gandini A, Desbrières J, et al, *Carbohydr Polym* **78**:760–766 (2009).
- Gallstedt M, Brottman A and Hedenqvist MS, *Packag Technol Sci* **18**:161–170 (2005).
- Rutiaga MO, Galan LJ, Morales LH, Gordon SH, Imam SH, Orts WJ, et al, *J Polym Environ* **13**:185–191 (2005).
- Wu C-S, *Polymer* **46**:147–155 (2005).

4.3.4. Trabalho completo apresentado na X Conferência Internacional da Sociedade Européia de Quitina – 10TH EUCHIS, São Petersburgo – Russia, realizado de 20 a 24 de maio de 2011.

Resumo

O sensor inteligente foi caracterizado quanto as propriedades mecânicas e de absorção de água. O modulo de Young, força de fratura e a resistência a tração não apresentaram alteração significativa quando comparados aos valores do papel cartão não recoberto. A resistência a torção na direção da máquina apresentou um aumento de 8% e na direção contraria um aumento de 10%. A absorção de água apresentou um aumento significativo de 86%.

Characterization of a new hydrogen sulfide indicator

E.T. KATO JR.¹, C.M.P. Yoshida² and T.T. Franco^{1*}

*1 School of Chemical Engineering –State of University of Campinas, UNICAMP,
CEP13083-852, Campinas – SP, Brazil.*

*2 Federal University of São Paulo-UNIFESP, Department of Exact and Earth Science, Av. Prof. Arthur Riedel, 275, CEP
09972-270, Diadema – SP, Brazil.*

** e-mail: franco@feq.unicamp.br*

The environmental concern over the use of synthetic materials on packaging industry influence the value of research projects on alternative packaging materials. A new, biodegradable, fast, simple manufacturing and colorimetric indicator of hydrogen sulfide gas (H₂S) was developed combining chitosan as tridimensional biopolymer matrix and a non toxic colorimetric indicator. The H₂S indicator system can be applied in different industries, as petrochemical, paper mills, food, etc. Chitosan is the very abundant natural biopolymer derived from chitin, which is discarded at tons by the fishing industry. Hydrogen sulfide (H₂S) is a flammable and colorless gas with a sweetish taste and characteristic odor of rotten eggs that can be poisonous at high concentrations. Card paper sheets were coated with chitosan suspension (2.0%, w/w) and colorimetric indicator (0.25%,

w/w) using a manual applicator. Mechanical and water absorption (Cobb Test) properties of the H₂S indicator system were studied. Young's modulus, fracture strain, stretching, traction resistance and resistance to bending were assessed. The Young's modulus, fracture strain and traction resistance of the H₂S indicator system were comparable to a non-coated card paper. The resistance to bending on cross direction increased 10 %, increased 8% on machine direction and water absorption significantly increases 86% when compared with a non-coated card paper. The results of mechanical tests showed that the colorimetric indicator system had the main characteristics very similar to coated card paper.

Keywords: Chitosan, hydrogen sulfide, colorimetric, biodegradable and indicator

1. INTRODUCTION

The environmental concern from consumers forced an increased demand to replace synthetic packaging for renewable derived polymers and cellulose based packaging applications is permanently increased. They are biodegradable and safe for the environment, although present lower water and gas barrier^[1].

Chitosan is a polysaccharide derived from chitin by removing the acetyl groups with alkali. ^[2] Chitosan is an excellent film-forming linear polymer with a backbone consisting of β -(1-4)- 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose (N-acetyl glucosamine - GlcNAc) residues and glucosamine residues (GlcN), which is characterized by the degree of acetylation (DA) and average molecular weight (MW), among other properties, *e.g.* degree of polymerization^[3]. Chitosan has a low toxicity and is biodegradable. Also, depending on its molecular structure, size and concentration, may inhibit the growth of fungi, bacteria and yeasts^[4].

The association of chitosan to paper provides specific functionalities and maintains the environment-friendly characteristic of the material. Chitosan associated with cellulose have been studied as additive on paper production and paper surface treatment by decades. Reis et al.^[5] studied the effects of chitosan coating on Kraft paper, according to the authors the application of chitosan coating

(3.5 g.m⁻², wet basis) on Kraft paper sheets provides a significantly lower WVPR (by ca 43%) and water absorption capacity (by ca 35%) as compared to uncoated Kraft paper. The association of chitosan to paper increases the mechanical resistance and improves the color retention of the cardpaper^{[6][7][8]}. The printability increases with the chitosan addition^[9], possible due to the reduction of water absorptiveness.

An hydrogen sulfide (H₂S) indicator system was characterized in this study. This system detects and indicates the presence of hydrogen sulfide (H₂S). This indicator system has wide application, since applications in control of leaks in the petrochemical industry communicating the presence of H₂S in case of leaks in the line of recovery in critical points (joints, valves, connections, etc.), even in quality control of food products informing the consumer a potential microbiological changes in the product during transportation and storage, indicating the state of product freshness.

The aim of this work was to investigate the tensile properties and water absorption of the H₂S indicator system.

2. MATERIALS and METHODS

2.1. MATERIALS

Commercial chitosan used in this study was provided by Primex (Island), obtained from the exoskeleton of coldwater shrimps with a DA of 18 % and a molecular weight, MW, of 2.38 x 10⁵ g mol⁻¹ (dn/dc of 0.135 mL.g⁻¹) and polydispersivity of 2.89. Glacial acetic acid (Synth – Brazil), iron(II) sulphate heptahydrate (Sigma – Germany; 99 +%), ferrous sulphide (Synth – Brazil; 25 %), sodium carbonate (Synth – Brazil, 99 +%) and card paper (Triplex TP 250) (250 g m⁻², Suzano Papel e Celulose, Brazil) were also used.

2.2. METHODS

2.2.1 PRECONDITIONING

The H₂S indicator system and uncoated card paper sheets were preconditioned at 23 ± 1 °C and $50 \pm 2\%$ relative humidity before analysis, in accordance with the ASTM D685^[10] standard method.

2.2.2. MECHANICAL CHARACTERIZATION

2.2.2.1. STIFFNESS EVALUATION

The stiffness of the indicator system containing ferrous sulphate (FeSO₄) as colorimetric indicator of H₂S was measured in accordance with the ASTM D5342^[11] standard method. The samples, of dimensions 38.1 ± 0.3 mm by 70 ± 1 mm, in both directions: machine direction (MD) and cross-machine direction (CMD) were pre-conditioned in desiccators containing silica for 72 hours at room temperature ($25^\circ \pm 2^\circ$ C) and analyzed with the stiffness instrument, RI- 5000, manufactured by Regmed - Brazil.

2.2.2.2. TENSILE PROPERTIES

The tensile properties (mean force, elongation, tensile energy absorption, tensile strength, breaking length and tensile index) of H₂S indicator system were measured in accordance with the ASTM D828^[12] standard method. The samples, of dimensions 15 mm by 210 ± 1 mm, machine direction (MD) and cross-machine direction (CMD) were pre-conditioned in desiccators containing silica for 72 hours at room temperature ($25^\circ \pm 2^\circ$ C) and analyzed with an automatic dynamometer, DI-21, manufactured by Regmed - Brazil.

2.2.3. WATER ABSORPTION (*COBB TEST*)

Water absorption capacity was determined in accordance with standard T441om-90.^[13] The weight gain was measured using Mettler AE 163 analytical scales. The results are expressed in g.m^{-2} . The samples of dimensions, 125 mm x 125 mm, were pre-conditioned in desiccators containing silica for 72 hours at room temperature ($25 \pm 2^\circ \text{C}$). They were individually weighed on an analytical balance, fixed on Cobb equipment (Regmed, Brazil) for analysis of water absorptiveness. A volume of 100 mL of distilled water was put in contact with the area bounded by the ring of the device (internal diameter of 11.28 ± 0.02 cm corresponding to an area of approximately 100 cm^2) for 120 s. Excess water was then quickly removed and sample was again weighed to calculate the water absorptiveness. There were at least 10 replicates per experiment.

2.2.4. STATISTICAL ANALYSES

Statistical analyses were carried out with the Statistic version 5.0 program (Statisc Inc., USA). Differences between the means were detected using a multiple comparison Tukey test.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

Card paper sheets (250 g.m^{-2}) were used to prepare H_2S indicator system and their surfaces were coated with chitosan suspension. The concentration of chitosan was 3.0 % w/w and concentration of indicator was 1.50 % w/w in coating suspension. The H_2S indicator system presents a slightly continuous and homogeneous yellow color.

3.1. MECHANICAL CHARACTERIZATION

Mechanical characterization is an important property of packaging materials that measures the ability of the studied packaging to resist the process of production.

3.1.1. STIFFNESS EVALUATION

The values obtained for both directions of the paper (MD and CMD) of stiffness are averages of ten (10) measures (Table 1).

Table 1. Stiffness (g.cm) comparison between H₂S indicator system and uncoated card paper.

Sample	CD				CMD			
	R	L	Bending moment (g.cm)	Bending moment (mN.m)	R	L	Bending moment (g.cm)	Bending moment (mN.m)
Uncoated Card paper	60±3.12 ^a	84.5±2.85 ^b	72.25±2.19 ^d	7.09±0.21 ^f	135±4.32 ^a	172±3.39 ^c	153.33±3.30 ^e	15±0.34 ^g
H ₂ S indicator system	65±8.88 ^a	94±6.70 ^c	79.48±2.79 ^e	7.80±0.30 ^g	140±7.19 ^b	187±6.43 ^d	163.44±4.89 ^f	16.18±0.29 ^h

a-h: different letters in the same column are statistically different with 95% of confidence. Tukey's test p<0,05.

The bending moment in the CMD of H₂S indicator system showed an increase from 72.25 to 79.48 g.cm, on direction MD showed a increase from 153.33 to 163.44 g.cm, when compared with the uncoated card paper. According to Rhim and Kim^[14] the stiffness of card paper increased with a PLA coating, Samyn et al.^[15] reported that card paper coated with styrene maleic anhydride (SMA) had stiffness similar to uncoated card paper and Reis et al.^[5] reported that Kraft paper coated with chitosan emulsion film presented lower stiffness than uncoated Kraft paper.

3.1.2. TENSILE PROPERTIES

The results of tensile properties (force, elongation, tensile energy absorption, tensile strength, breaking length and tensile index) showed in Table 2 are averages of ten (10) measures.

Table 2. Mechanical properties comparison between H₂S indicator system and uncoated card paper.

Sample	Mean force (N)	Elongation (%)	Tensile energy absorption (J.m ⁻²)	Tensile strength (kN.m ⁻¹)	Breaking length (km)	Tensile index (kN.m.kg ⁻¹)
Intelligent sensor (MD)	244,53±4,37	3,69	368,21	16,30	6,65	2,65
Uncoated card paper (MD)	236,31±7,47	3,55	342,75	15,75	6,43	2,66
Intelligent sensor (CMD)	135,82±2,85	7,04	446,38	9,22	3,76	0,79
Uncoated card paper (CMD)	138,25±3,65	7,11	440,78	9,05	3,69	0,76

The mechanical properties remained almost unchanged, according to Bordenave et al.^[16] this system was modified by the introduction of chitosan, but the cellulose fibers network still drive the mechanical behavior of the materials, i.e. the amount of chitosan was not enough to disturb the interactions between the potentially negatively charged cellulose fibers.

In agreement with Samyn et al.^[15] and Kibirkštis & Kabelkaitė^[17] the mean force in MD is higher compared to CMD due to anisotropy of the paper. Reis et al.^[5] reported that the mechanical properties of chitosan coated kraft paper remained almost unchanged with a 13.3 % reduction in the elongation of CMD.

3.2. WATER ABSORPTION (*COBB TEST*)

The water absorption was determined for the H₂S indicator system and uncoated card paper (Table 3). According to Reis et al.^[5] in cellulosic materials, water absorption depends on the type of cellulose and the coating material. The water absorptiveness provides information about the quantity of water absorbed by the card paper, in grams per square meter, when in direct contact with water.

Tabela 3. Water absorptiveness comparison between H₂S indicator system and uncoated card paper.

Sample	Absorption (g/m ²)
Intelligent sensor	100,75±3,10
Uncoated card paper	54,09±20,37

The water absorptiveness was increased with the biopolymer coating in the H₂S indicator system when compared with the uncoated card paper, the same was observed by Rhim, Lee & Hong^[18], this effect is due to hydrophilicity of the chitosan. Reis et al.^[5] reported a reduction in water absorption by up to 35% even using chitosan as coating.

4. CONCLUSIONS

Coating of chitosan suspension to the H₂S indicator system lead to an increase in stiffness compared with the uncoated card paper. The tensile properties did not change when compared to uncoated card paper, i.e. the cellulose fibers network still drive the mechanical behavior of the materials. The water absorptiveness increased almost 100% compared to uncoated card paper it was associated with the hydrophilicity of the polymer matrix. The impact of the humidity on the H₂S sensibility response should therefore be studied.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by FAPESP, CNPq and CAPES. The authors thank Primex for providing chitosan.

5. REFERENCES

- [1]Gällstedt, M.; Hedenqvist, M.S. **PACKAGING-RELATED MECHANICAL AND BARRIER PROPERTIES OF PULP-FIBER-CHITOSAN SHEETS**. Carbohydrate Polymers 63: 46–53, 2006.
- [2]Peter, M.G. **CHITIN AND CHITOSAN FROM FUNGI**, in: A. Steinbüchel (Ed.), *Biopolymers, Vol. 6: Polysaccharides II* , Weinheim: Wiley-VCH, **2002**, pp. 123 - 157 (ISBN 3-527-30227-1).
- [3]Muzzarelli R.A.A. **CHITOSAN-BASED DIETARY FOODS**, *Carbohydr. Polym.*, 29: 306-316, 1996.
- [4]Tikhonov V.E, Stepnova EA, Babak VG, Yamskov IA, Palma-Guerrero J, Jansson H-B, Lopez-Llorca LV, Salinas J, Gerasimenko DV, Avdienko ID and Varlamov VP, **BACTERICIDAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF A LOW MOLECULAR WEIGHT CHITOSAN AND ITS N-2(3)-(DODEC-2-ENYL)SUCCINOYL/-DERIVATIVES**. Carbohydrate Polymers. Vol. 64. Pp. 66-72, 2006.
- [5] Reis, A.B.; Yoshida, C.M.P.; Reis, A.P.C. and Franco, T.T. **APPLICATION OF CHITOSAN EMULSION AS A COATING ON KRAFT PAPER**. (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/pi.3023. Society of Chemical Industry, 2011.
- [6]Allan,G.G.,Carroll, J. P.,Hirabayashi,Y.,Muvundamina,M.,&Winterown, J. G. **CHITOSAN-COATED FIBERS ADVANCES IN CHITIN AND CHITOSAN**, Proceedings of international conference, fourth, pp. 765–76, 1989.
- [7]Makino, Y., & Hirata, T. **MODIFIED ATMOSPHERE PACKAGING OF FRESH PRODUCE WITH A BIODEGRADABLE LAMINATE OF CHITOSAN-CELLULOSE AND POLYCAPROLACTONE**. Postharvest Biology and Technology, 10, 247–254, 1997.
- [8]Struszczyk, H. & Kivekäs, O. (1990). **MICROCRYSTALLINE CHITOSAN - SOME AREAS OF APPLICATION**. British Polymer Journal, 23, 261–265. Technologies, v.6, n.4, p.459-464, 2005.

- [9]Thomson, G. **MAKING BETTER PAPER WITH SHRIMPS**. Pulp and Paper International, 26, 33, 1985.
- [10] ASTM, **STANDARD PRACTICE FOR CONDITIONING PAPER AND PAPER PRODUCTS FOR TESTING** Annual Book of ASTM Standards. American Society for Testing and Materials, Atlanta, D685, 1993.
- [11]ASTM. **RESISTANCE TO BENDING OF PAPER AND PAPERBOARD (TABER-TYPE TESTER IN BASIC CONFIGURATION)**. Annual Book of ASTM Standards. American Society for Testing and Materials, Atlanta, D5342, 1993.
- [12]ASTM. **TENSILE PROPERTIES OF PAPER AND PAPERBOARD USING CONSTANT-RATE-OF-ELONGATION APPARATUS**. Annual Book of ASTM Standards. American Society for Testing and Materials, Atlanta, D828, 1997.
- [13] **TAPPI TEST METHODS**. Technical Association of the Pulp and Paper Industry, Atlanta, GA, 1994.
- [14]Rhim, J.-W. and Kim, J.-H. **PROPERTIES OF POLY(LACTIDE)-COATED PAPERBOARD FOR THE USE OF 1-WAY PAPER CUP**. Journal of Food Science—Vol. 74, Nr. 2, 2009.
- [15]Samyn, P.; Deconinck, M.; Schoukens, G.; Stanssens, D.; Vonck, L. and Abbeele, H. V. **MODIFICATIONS OF PAPER AND PAPERBOARD SURFACES WITH A NANOSTRUCTURED POLYMER COATING**. Progress in Organic Coating. 69, p. 442-454, 2010.
- [16] Bordenave, N. Grelier, S. Pichavant, F. and Coma V. **WATER AND MOISTURE SUSCEPTIBILITY OF CHITOSAN AND PAPER-BASED MATERIALS: STRUCTURE-PROPERTY RELATIONSHIPS**. J. Agric. Food Chem. 55, p. 9479–9488, 2007.
- [17]Kibirkštis, E.; Kabelkaitė, A. **RESEARCH OF PAPER/PAPERBOARD MECHANICAL CHARACTERISTICS**. Mechanika. Nr.3(59), p. 34-41, 2006.
- [18]Rhim, J.W.; Lee J.H. and Hong, S.I. **WATER RESISTANCE AND MECHANICAL PROPERTIES OF BIOPOLYMER (ALGINATE AND SOY**

PROTEIN) COATED PAPERBOARDS. LebensmWiss Technol. 39: p.806–13, 2006.

4.3.5. Trabalho completo apresentado no VI Simpósio Ibero-Americano de Quitina – VI SIAQ e XII Conferencia Inernacional de Quitina e Quitosana – XII ICCC, Fortaleza – Brasil, realizados de 2 a 5 de setembro de 2012.

Resumo

Foi avaliada a influência da umidade na resposta colorimétrica do sensor inteligente, a alteração colorimétrica mostrou-se independente da umidade quanto à intensidade da cor produzida, porém observou-se uma diminuição no tempo de detecção. O sensor inteligente apresentou como característica a reversibilidade na ausência do gás H_2S , ou seja, uma vez findada a presença do H_2S o sensor retorna a sua coloração inicial. Apesar de sua reversibilidade uma análise qualitativa indicou que 67,8% da concentração dos compostos sulfurados permaneciam ligados a matriz após o processo de reversibilidade.

Characterization of a new H_2S chitosan intelligent sensor and study of the influence of moisture content

E.T. KATO JR.¹, E. Guibal³, C.M.P. Yoshida^{2*} and T.T. Franco¹

¹ School of Chemical Engineering –State of University of Campinas, UNICAMP, CEP13083-852, Campinas – SP, Brazil.

² Federal University of São Paulo-UNIFESP, Department of Exact and Earth Science, Av. Prof. Arthur Riedel, 275, CEP 09972-270, Diadema – SP, Brazil.

³ Laboratoire Génie de l'Environnement Industriel, Ecole des Mines d'Alès, 6 avenue de Clavières, 30319 Alès cedex, France.

**E-mail address: cristiana.yoshida@unifesp.br*

ABSTRACT

A new, biodegradable, fast, simple manufacturing and colorimetric indicator of hydrogen sulfide gas (H_2S) was developed combining chitosan as tridimensional biopolymer matrix and a non toxic colorimetric indicator. The H_2S indicator system

has application in a different kind of industries (petrochemical, paper mills, food, etc). Chitosan is a very abundant natural biopolymer, which is discarded at tons by the fishing industry. Hydrogen sulfide (H_2S) is a flammable and colorless gas with a sweetish taste and characteristic odor of rotten eggs that can be poisonous at high concentrations. Card paper sheets were coated adapted from Kato *et al.*^[1] with chitosan suspension (2.0%, w/w) containing the colorimetric indicator (0.25%, w/w). The water sensibility of the intelligent sensor was characterized by adsorption isotherms and water absorption capacity (Cobb Test). After different relative humidity conditions exposition, the samples were exposed to hydrogen sulfide gas (100 ppm) in a closed gas chamber to evaluated the colour variation. The mechanical properties (Young's modulus, fracture strain, stretching, traction resistance and resistance to bending results indicated that the intelligent sensor presented similar characteristics as compared to the cardpaper. In a range of 10% to 100% of RH, the sensor changes the colour with the same intensity at different times, indicating that the humidity influenced in the time response. Chitosan sensor is characterized by reversibility of color indication. A quantitative analysis study showed that the chitosan matrix keep an important amount of sulfur compounds (67,8% of the concentration after the first exposure). Despite of the presence of this sulfur compounds the chitosan matrix of the intelligent sensor it remain workable. This work is innovative and has derived in a patent request deposited at the INPI (2009) and the Patent Cooperation Treaty (PCT-2010).

Keywords

Chitosan, H_2S sensor, colourimetric, hydrogen sulfide gas.

INTRODUCTION

Chitosan is a polysaccharide derived from chitin by removing the acetyl groups with alkali. Chitin is very abundant in nature, as it found in fungal walls and the exoskeletons of crustaceans and insects^[2]. Chitosan is an excellent film-forming linear polymer with a backbone consisting of β -(1-4)- 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose (*N*-acetyl glucosamine - GlcNAc) residues and glucosamine

residues (GlcN). It is characterised by the degree of acetylation (DA) and the average molecular weight (MW), among other properties, *e.g.* degree of polymerization^[3]. Chitosan has a low toxicity and is biodegradable. Also, depending on its molecular structure, size and concentration, may inhibit the growth of fungi, bacteria and yeasts^[4].

The association of chitosan to paper sheets provides interesting functionalities and maintains the environment-friendly characteristic of the material. Chitosan associated with cellulose have been studied as additive on paper production and paper surface treatment by decades. This combination increases the mechanical resistance and improves the color retention of the cardpaper^{[5][6][7]}. The printability increases with the chitosan addition^[8], possible due to the reduction of water absorptiveness.

An hydrogen sulfide (H₂S) indicator system was characterized in this study. This system detects and indicates the presence of hydrogen sulfide (H₂S). This indicator system has wide application, since applications in control of leaks in the petrochemical industry communicating the presence of H₂S in case of leaks in the line of recovery in critical points (joints, valves, connections, etc..), even in quality control of food products informing the consumer a potential microbiological changes in the product during transportation and storage, indicating the state of product freshness.

Objectives

The aim of this work was to investigate the influence of humidity on the efficiency response, tensile properties and water absorption of the H₂S indicator system.

MATERIALS and METHODS

Materials

Commercial chitosan used in this study was provided by Primex (Island), obtained from the exoskeleton of coldwater shrimps with a DA of 18 % and a molecular weight, MW, of $2.38 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ (dn/dc of 0.135 mL.g^{-1}) and polydispersity of 2.89. Glacial acetic acid (Synth – Brazil), iron(II) sulphate heptahydrate (Sigma – Germany; 99 +%), ferrous sulphide (Synth – Brazil; 25 %), sodium carbonate (Synth – Brazil, 99 +%) and card paper (Triplex TP 250) (250 g m^{-2} , Suzano Papel e Celulose, Brazil) were also used.

Methods

Chitosan sensor production

The methodology of the film suspension producing was adapted from Yoshida *et al.*^[9]. Chitosan (3.0%, w/w) was dispersed in aqueous acetic acid. The dispersions were homogenized by magnetic stirring at room temperature for 60 minutes until complete dissolution. After the FeSO_4 aqueous solution (1.5%) was added and the chitosan suspension was supplemented to 100g. The sheets of cardboard were coated with aliquots of 2.0g of the chitosan film suspensions according to the methodology described by Kato *et al.*^[1]. Cardboard sheets (0.045m^2) were previously superficially impregnated with 3mL of sodium carbonate (Na_2CO_3) solution (4%, w/w).

Mechanical characterization

The stiffness and tensile properties (mean force, elongation, tensile energy absorption, tensile strength, breaking length and tensile index) of the indicator system was measured in accordance with the ASTM^[10] standard method. The

samples were cut in both directions: machine direction (MD) and cross-machine direction (CMD).

Water absorption (*COBB TEST*)

Water absorption capacity was determined in accordance with standard T441om-90.^[11] The weight gain was measured using Mettler AE 163 analytical scales.

Sorption Isotherms

Adsorption isotherms were determined following procedure adapted from the COST 90 Project^[12]. The samples were cut (squares of 3 mm) and dried over silica in a desiccator during at least 7 days. Approximately 1g of each samples were weighted and placed in hermetic chambers containing saturated salt solutions with different water activity (a_w): 0.11 (LiCl), 0.33 (MgCl₂), 0.43 (K₂CO₃), 0.54 (Mg(NO₃)₂), 0.59 (NaBr), 0.76 (NaCl), 0.85 (KCl), 0.90 (BaCl₂), 0.94 (CuSO₄) at temperature of 25 ±2°C. The initial moisture content of each samples was measured in triplicate on dry basis by drying in an oven with renewal and air circulation (Mod TE-394/2, TECNAL, Brazil) at 105°C until constant weight^[13]. Equilibrium moisture content of the films was measured in triplicate. Isotherms models (GAB, BET, HALSEY, HENDERSON and OSWIN)^[14] were used for fitting the sorption data. Equations parameters were estimated by non linear regression (Statistic version 5.1) in terms of regression coefficient (R^2) values.

Scanning electron microscopy with X-ray energy dispersive spectrometer (SEM-EDS)

SEM-EDS determinations were performed at the *Centre de Recherche Louis Leprince-Ringuet – Laboratoire de Génie de l'Environnement Industriel* with copeoration of *Centre des Matériaux de Grande Diffusion – CMGD (École des*

Mines d'Alès – France). The instrument was a Quanta 200 FEG (FEI Company) operated at 15 kV and 0.60 torr equipped a backscattered electrons detector (BSE) integrated into an X-ray energy dispersive spectrometer (INCA Energy 350 – Oxford Instruments). Samples of the colorimetric sensor with about 10x10 mm in size were cut from the central part and mounted on SEM aluminium stubs using double-sided carbon tape. EDS spectra (working distance 10 mm) were collected for 50 s and the elemental composition obtained.

Evaluation of humidity influence on the efficiency of H₂S indicator system response

The samples were stored in desiccators with controlled relative humidity of 54% (Mg(NO₃)₂) 85% (KCl) and 100% humidity until the equilibrium were reached. The samples were exposed to H₂S gas (74.5 ppm) in a closed system, to determine the influence of moisture content in the time of detection of the gas in function of the concentration of indicator in the chitosan matrix. Initially, vacuum was made in the reactor system (230 mL) and after it was reached (-600 mmHg) the H₂S gas was introduced into the system and starts the counting of time until a color change from yellow to black was noted.

Statistical analyses

Statistical analyses were carried out with the Statistic version 5.0 program (Statistic Inc., USA). Differences between the means were detected using a multiple comparison Tukey test.

RESULTS and DISCUSSION

The H₂S indicator system presents a slightly continuous and homogeneous yellow color. Mechanical characterization is an important property of materials that

measures the ability to resist the process of production. The values obtained for both directions of the cardpaper (MD and CMD) of stiffness are shown in Table 1.

Table 1. Stiffness (g.cm) of H₂S indicator system and uncoated card paper.

Sample	CMD				MD			
	R	L	Bending moment (g.cm)	Bending moment (mN.m)	R	L	Bending moment (g.cm)	Bending moment (mN.m)
Uncoated Card paper	60±3.12 ^a	84.5±2.85 ^b	72.25±2.19 ^d	7.09±0.21 ^f	135±4.32 ^a	172±3.39 ^c	153.33±3.30 ^e	15±0.34 ^g
Intelligent sensor	65±8.88 ^a	94±6.70 ^c	79.48±2.79 ^e	7.80±0.30 ^g	140±7.19 ^b	187±6.43 ^d	163.44±4.89 ^f	16.18±0.29 ^h

a-h: different letters in the same column are statistically different with 95% of confidence. Tukey's test $p < 0,05$.

The bending moment in the CMD of intelligent sensor showed an increase from 72.25 to 79.48 g.cm, on direction MD showed an increase from 153.33 to 163.44 g.cm, when compared with the uncoated card paper. According to Rhim and Kim^[15] the stiffness of card paper increased with a PLA coating. Samyn et al.^[16] reported that card paper coated with styrene maleic anhydride (SMA) had stiffness similar to uncoated card paper and Reis et al.^[17] reported that Kraft paper coated with chitosan emulsion film presented lower stiffness than uncoated Kraft paper. The mechanical properties remained almost unchanged, according to Bordenave et al.^[18] the system chitosan/cellulose was modified by the introduction of chitosan, but the cellulose fibers network still drive the mechanical behavior of the materials, i.e. the amount of chitosan was not enough to disturb the interactions between the potentially negatively charged cellulose fibers.

Table 2. Mechanical properties and Water absorptiveness of H₂S indicator and uncoated card paper.

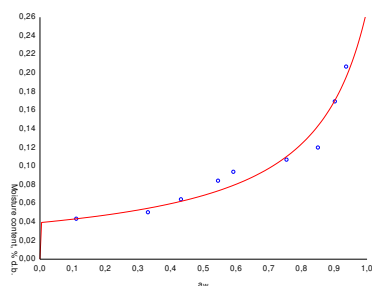
Sample		Mean force (N)	Elongation (%)	Tensile energy absorption (J.m ⁻²)	Tensile strength (kN.m ⁻¹)	Breaking length (km)	Tensile index (kN.m.kg ⁻¹)	Absorption (g/m ²)
Intelligent (MD)	sensor	244.53±4.37	3.69	368.21	16.30	6.65	2.65	100,75±3,10
Intelligent (CMD)	sensor	135.82±2.85	7.04	446.38	9.22	3.76	0.79	
Uncoated paper (MD)	card	236.31±7.47	3.55	342.75	15.75	6.43	2.66	54,09±20,37
Uncoated paper (CMD)	card	138.25±3.65	7.11	440.78	9.05	3.69	0.76	

In agreement with Samyn et al.^[16] and Kibirkštis & Kabelkaitė^[19] the mean force in MD is higher compared to CMD due to anisotropy of the paper. Reis et al.^[17] reported that the mechanical properties of chitosan coated kraft paper remained almost unchanged with a 13.3 % reduction in the the elongation

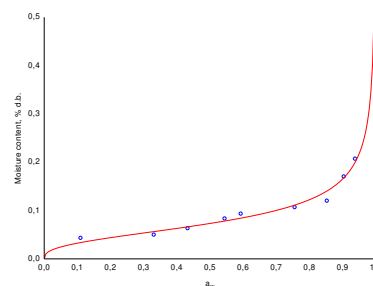
The water absorption was determined for the H₂S indicator system and uncoated card paper (Table 2). In cellulosic materials, water absorption depends on the type of cellulose and the coating material^[17]. The water absorptiveness was increased with the biopolymer coating when compared with the uncoated card paper. The same result was observed by Rhim, Lee & Hong^[20], which was associated to hydrophilicity of the chitosan. Reis et al.^[17] reported a reduction in water absorption by up to 35% even using chitosan as coating.

Sorption Isotherms

Sorption isotherms were obtained at 25°C, GAB and Oswin models (Figure 1) were best fit to the experimental data of sorption.



(a)



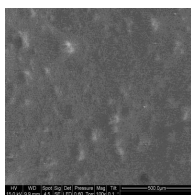
(b)

Figure 1 - Sorption isotherm of the H₂S indicator system at 25°C (a) GAB and (b) Oswin.

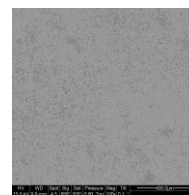
The GAB and Oswin models showed higher values of R^2 and explained variance in relation to other models. It also follows that the H₂S indicator system presents a behavior similar to the cardpaper, i.e. their sorption isotherms exhibit the same profile as the isotherms of the uncoated paperboard.

Evaluation of humidity influence on the efficiency response of the H₂S indicator

The distribution of the adsorbed specie Fe³⁺ in the chitosan matrix was performed for the H₂S indicator system, Figure 2 shows (a) a SEM image and (b) a BSE image of the H₂S indicator system.



(a)



(b)

Figure 2 – SEM image of the H₂S indicator system, (a) SEM image and (b) BSE image

In the phase image (Figure 2b) is noticed the well distribution of the Fe^{3+} ions, i.e. areas of Fe^{3+} concentration, represented by white spots are not observed.

In Figure 3 the column represents a different concentration of the colorimetric indicator in the chitosan matrix. The moisture content acts as a facilitator in the indication of the presence of H_2S gas. Independent of the concentration of the H_2S indicator added to the chitosan matrix an increase in humidity decreases the time of detection of H_2S gas. It was possibly due to swelling of the chitosan polymer matrix thereby facilitating H_2S gas inlet and the subsequent interaction with the colorimetric indicator.

After a short period of absence of the H_2S gas the H_2S indicator system return to its original color (yellow), due to this reversibility a quantitative analysis were performed to evaluate the presence of sulfur compounds, the quantitative results of the EDS analysis showed that after 2 months of no contact with the H_2S gas, i.e. after the H_2S indicator system turn-back to its original colour (yellow), almost 87% of the concentration of sulfur content detected after the first exposure to the gas remains in the chitosan matrix. Even with this high concentration of sulfur content in the H_2S indicator system, it remain functional, i.e. once exposed to a H_2S gas source it become black indicating the H_2S gas presence.

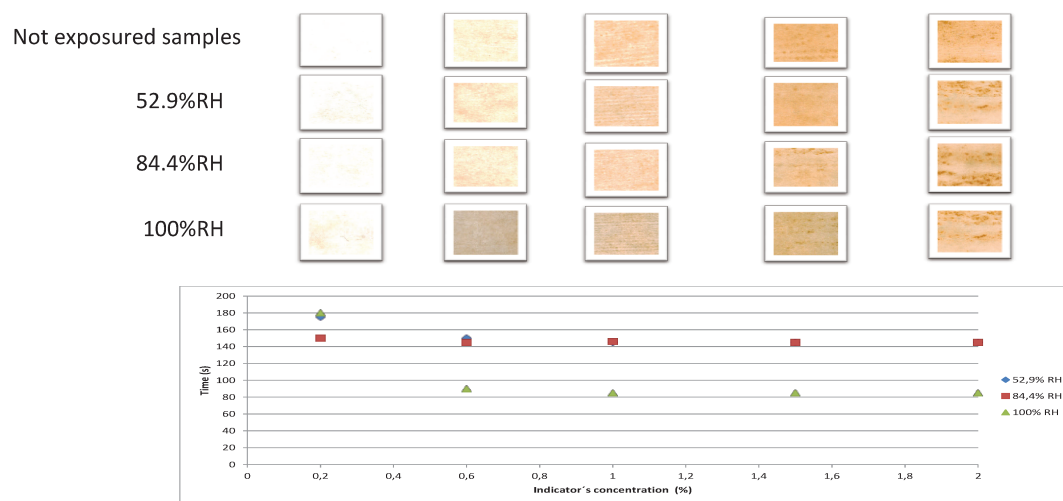


Figure 3 - Effect of moisture content in function of the concentration of the indicator in the H_2S indicator system response.

CONCLUSIONS

The H₂S indicator system changes the colour with the same intensity at the different times according to the RH, indicating that the humidity influenced in the time response. It was probably due to the swelling of the chitosan matrix facilitating the interaction between the H₂S gas and the iron entrapped in the chitosan matrix. Despite of the presence of this sulfur compounds the chitosan matrix of the intelligent sensor it remain workable, i.e. with a novel contact with H₂S gas the H₂S indicator system turn black indicating its presence. The application of chitosan suspension coating on the production of H₂S indicator system lead to an increase in stiffness compared with the uncoated card paper and the tensile properties did not change. The water absorptiveness increased almost 100% compared to uncoated card paper it was associated with the hydrophilicity of the polymer matrix. The distribution of metal ions (Fe³⁺) in the chitosan matrix was homogeneous.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by FAPESP, CNPq and CAPES. The authors thank Primex for providing the chitosan samples.

REFERENCES

- [1]Kato Junior, E.T.; Yoshida, C.M.P.; Reis, A.B.; Melo I.S. and Franco, T.T., 2011. Fast detection of H₂S using a biodegradable colorimetric indicator system, *Polymer International*, v.60, Issue 6. (Article first published online : 2 MAY 2011, DOI: 10.1002/pi.3095).
- [2]Peter, M.G. *CHITIN AND CHITOSAN FROM FUNGI*, in: A. Steinbüchel (Ed.), *Biopolymers*, Vol. 6: Polysaccharides II , Weinheim: *Wiley-VCH*, 2002, pp. 123 - 157 (ISBN 3-527-30227-1).
- [3]Muzzarelli R.A.A. CHITOSAN-BASED DIETARY FOODS, *Carbohydr. Polym.*, 29: 306-316, 1996.

- [4]Tikhonov V.E, Stepnova EA, Babak VG, Yamskov IA, Palma-Guerrero J, Jansson H-B, Lopez-Llorca LV, Salinas J, Gerasimenko DV, Avdienko ID and Varlamov VP, BACTERICIDAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF A LOW MOLECULAR WEIGHT CHITOSAN AND ITS N-2(3)-(DODEC-2-ENYL)SUCCINOYL/-DERIVATIVES. Carbohydrate Polymers. Vol. 64. Pp. 66-72, 2006.
- [5]Allan,G.G.,Carroll, J. P.,Hirabayashi,Y.,Muvundamina,M.,&Winterown, J. G. CHITOSAN-COATED FIBERS ADVANCES IN CHITIN AND CHITOSAN, Proceedings of international conference, fourth, pp. 765–76, 1989.
- [6]Makino, Y., & Hirata, T. MODIFIED ATMOSPHERE PACKAGING OF FRESH PRODUCE WITH A BIODEGRADABLE LAMINATE OF CHITOSAN–CELLULOSE AND POLYCAPROLACTONE. Postharvest Biology and Technology, 10, 247–254, 1997.
- [7]Struszczyk, H. & Kivekäs, O. (1990). MICROCRYSTALLINE CHITOSAN - SOME AREAS OF APPLICATION. British Polymer Journal, 23, 261–265. Technologies, v.6, n.4, p.459-464, 2005.
- [8]Thomson, G. MAKING BETTER PAPER WITH SHRIMPS. Pulp and Paper International, 26, 33, 1985.
- [9]Yoshida, C.M.P.; Oliveira-Junior, E.N.; Franco, T.T., 2009. Chitosan Tailor-Made Films: the effects of additives on barrier and mechanical properties. Packaging Science and Technology, 22, 161-170.
- [10]ASTM. Annual Book of ASTM Standards. American Society for Testing and Materials, Atlanta, 1993.
- [11] TAPPI TEST METHODS. Technical Association of the Pulp and Paper Industry, Atlanta, GA, 1994.
- [12]Jowitt, R.; Escher, F.; Hallstom, B.; MEFFERT, H. F. T.; SPIESS, W. E. L. e VOS, G. Physical properties of foods. Applied Science Publishers, London and New York, 1983.

- [13]AOAC. 1990. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15th edition. Washington, DC, Association of Official Analytical Chemists.
- [14]Miranda, M.; Vega-Gálvez, A.; Sanders, M.; López, J.; Lemus-Mondaca, R.; Martínez, E. and Di Scala, K. Modelling the water sorption isotherms of quinoa seeds (*chenopodium quinoa willd.*) and determination of sorption heats. *Food Bioprocess Technol*, 2012. 5:1686–1693.
- [15]Rhim, J.-W. and Kim, J.-H. PROPERTIES OF POLY(LACTIDE)-COATED PAPERBOARD FOR THE USE OF 1-WAY PAPER CUP. *Journal of Food Science*—Vol. 74, Nr. 2, 2009.
- [16]Samyn, P.; Deconinck, M.; Schoukens, G.; Stanssens, D.; Vonck, L. and Abbeele, H. V. MODIFICATIONS OF PAPER AND PAPERBOARD SURFACES WITH A NANOSTRUCTURED POLYMER COATING. *Progress in Organic Coating*. 69, p. 442-454, 2010.
- [17] Reis, A.B.; Yoshida, C.M.P.; Reis, A.P.C. and Franco, T.T. APPLICATION OF CHITOSAN EMULSION AS A COATING ON KRAFT PAPER. (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/pi.3023. Society of Chemical Industry, 2011.
- [18] Bordenave, N. Grelier, S. Pichavant, F. and Coma V. WATER AND MOISTURE SUSCEPTIBILITY OF CHITOSAN AND PAPER-BASED MATERIALS: STRUCTURE–PROPERTY RELATIONSHIPS. *J. Agric. Food Chem.* 55, p. 9479–9488, 2007.
- [19]Kibirkštis, E.; Kabelkaitė, A. RESEARCH OF PAPER/PAPERBOARD MECHANICAL CHARACTERISTICS. *Mechanika*. Nr.3(59), p. 34-41, 2006.
- [20]Rhim, J.W.; Lee J.H. and Hong, S.I. WATER RESISTANCE AND MECHANICAL PROPERTIES OF BIOPOLYMER (ALGINATE AND SOY PROTEIN) COATED PAPERBOARDS. *LebensmWiss Technol*. 39: p.806–13, 2006.

4.4. Etapa 4 – Avaliação do sensor inteligente em sistema real

Na Etapa 4 os sensores colorimétricos CH-Fe foram avaliados em sistema real, aplicando um dispositivo quadrado de 3 cm em sistema de carnes acondicionadas em embalagem a vácuo. A avaliação do CH-Fe em sistema real foi realizado em um período de 5 meses de estocagem.

4.4.1. Avaliação do sensor inteligente de H₂S: CH-Fe em sistema real

O sensor desenvolvido neste trabalho representa uma importante ferramenta no combate de casos de toxiinfecção alimentar, uma vez que o consumidor não consegue detectar visualmente se um alimento é ou não adequado para o consumo.

A avaliação do sensor inteligente contendo Fe em sistema real foi realizado em um período de 5 meses. Inicialmente verificou-se a funcionalidade do sensor inteligente em escala reduzida, apenas 4 amostras por temperatura (4° e 15°C). Obtida a resposta positiva procedeu-se para análise em escala real, 20 amostras e mais 2 controles negativos por temperatura de estudo, a 15°C e em seguida a 4°C.

Os resultados positivos para presença de H₂S em alimentos embalados a vácuo obtidos com a análise em sistema real demonstram que o CH-Fe pode realizar a detecção de eventuais defeitos na embalagem e falhas nas condições de estocagem garantindo a integridade dos produtos, evitando que cheguem ao consumidor com qualidade inadequada, de forma que reduzam consideravelmente os riscos à saúde relacionados com toxiinfecção alimentar.

A alteração colorimétrica foi visual e bem definida, mesmo com a aparência típica de um produto embalado à vácuo, ou seja, coloração anóxica da carne e presença de *dripping* na embalagem, o sensor inteligente indicou a contaminação microbiológica pela mudança de cor de amarelo para preto, indicando um produto impróprio ao consumo (Figura 34).

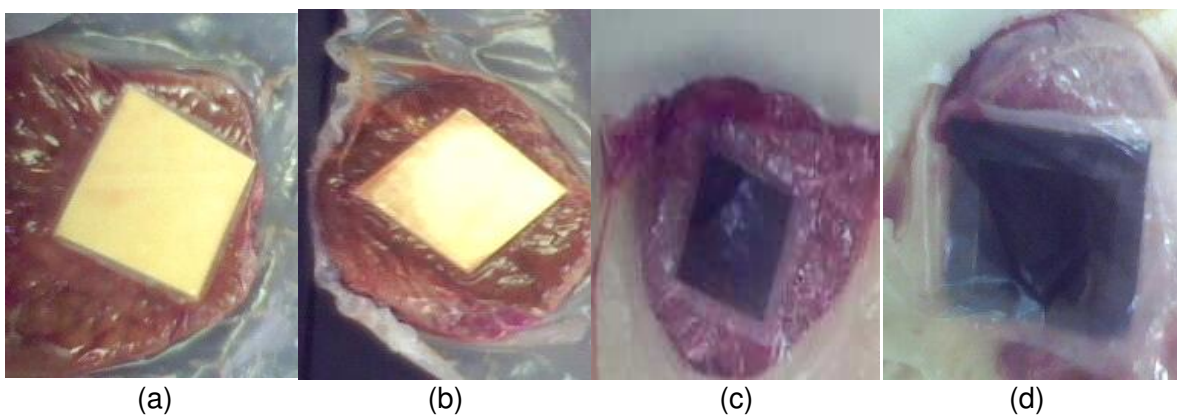


Figura 34. Avaliação em sistema real do sensor inteligente, (a) - (b) aparência do sensor logo após a inoculação e (c) - (d) sensores com resposta positiva a presença de H₂S armazenados a 4° e 15°C respectivamente.

Nas temperaturas estudadas, 4° e 15°C, foram realizadas leituras do parâmetro L* no início e após a obtenção da resposta positiva (Tabela 15). As amostras armazenadas a 4°C começaram a apresentar resposta positiva após 30 dias do início do experimento já as amostras armazenadas a 15°C com duas semanas de armazenamento já se observava resposta positiva à presença do gás H₂S.

Tabela 15 - Parâmetro L* antes e após resposta positiva à presença do gás H₂S.

Amostra	T (°C)	Início	Após resposta positiva	ΔL*	Média	Desvio Padrão
<i>Clostridium estertheticum</i>	15	74,62	26,51	48,12	46,32	1,89
		72,41	28,06	44,35		
		73,65	27,15	46,50		
		79,84	47,97	31,87	31,25	1,43
		73,00	40,72	32,27		
		79,27	49,66	29,61		
	4	75,06	29,74	45,32	40,10	4,56
		74,52	37,66	36,85		
		76,91	38,78	38,13		
		74,22	41,49	32,74	31,10	1,60
		70,44	40,91	29,54		
		74,82	43,79	31,04		
	15	76,95	35,36	41,59	43,58	3,00
		81,02	38,90	42,12		
		78,47	31,44	47,03		
		77,65	32,85	44,80	39,44	5,93
		77,25	36,80	40,46		
		76,45	43,37	33,08		
		74,41	42,29	32,12	27,52	4,01
		74,83	49,11	25,72		
		73,83	49,10	24,73		
<i>Clostridium gasigenes</i>	15	62,41	51,75	10,65	12,30	2,48
		65,07	53,97	11,10		
		62,51	47,36	15,15		
		79,15	47,09	32,07	28,08	4,71
		78,75	49,46	29,29		
		63,40	40,52	22,88		
	4	77,71	39,15	38,56	37,12	2,13
		77,08	38,95	38,13		
		76,76	42,08	34,68		
		76,64	25,02	51,62	52,11	1,53
		77,16	23,34	53,82		
		77,58	26,70	50,88		
		81,87	47,37	34,50	31,83	3,86
		76,60	49,20	27,40		
		77,87	44,30	33,57		
Controle negativo	15	74,72	38,68	36,04	32,07	3,54
		77,62	48,39	29,23		
		74,38	43,44	30,94		
		74,32	25,10	49,22	46,01	4,57
		77,58	29,54	48,04		
		76,10	35,32	40,78		

Sete amostras inoculadas a 15°C e 6 amostras a 4°C apresentaram resposta positiva, possivelmente devido a característica do microrganismo (estritamente anaeróbios) necessitando de manipulação rápida em ambiente aeróbio, i.e., o tempo entre a inoculação e o processo de evacuação da embalagem pode ter levado a morte dos microrganismos e conseqüentemente resultando na resposta negativa a presença do gás H₂S. Observou-se também uma resposta positiva em um dos controles negativos das amostras armazenadas a 15°C, este fato pode ser explicado pela contaminação naturalmente presente em carnes associado à temperatura abusiva de armazenamento.

4.4.2. Determinação do nível de contaminação das embalagens cujos sensores apresentaram resposta positiva a presença do gás H₂S.

Os sensores detectaram a presença dos microrganismos, e como uma forma de quantificar a resposta colorimétrica, ensaios foram realizados para determinação do nível de contaminação a partir da contagem em placas (Tabela 16).

O nível de contaminação médio determinado nos sensores que apresentarão resposta positiva a presença de H₂S foi de 10⁴ UFC/50 cm², nível normalmente encontrado em carnes.

Tabela 16 - Contagem microbiológica para determinação do nível de contaminação das embalagens cujos sensores responderam positivamente à presença de H₂S.

Amostra	Diluição	Placa 1	Placa 2	Contagem (UFC/50cm ²)	Contagem média (UFC/50cm ²)
<i>Clostridium estertheticum</i>	-1	TNTC	TNTC	-	2,69x10 ⁴
	-2	241	170	2,06x10 ⁴	
	-3	37	33	3,50x10 ⁴	
	-4	3	2	2,5x10 ⁴	
	0	TNTC	TNTC	-	2,16x10 ⁴
	-1	TNTC	TNTC	-	
	-2	285	187	2,36x10 ⁴	
	-3	15	24	1,95x10 ⁴	
	0	TNTC	TNTC	-	1,30x10 ⁴
	-1	TNTC	TNTC	-	
<i>Clostridium gasigenes</i>	-2	TNTC	TNTC	-	
	-3	13	13	1,30x10 ⁴	
	0	TNTC	TNTC	-	2,21x10 ⁴
	-1	TNTC	TNTC	-	
	-2	187	265	2,26x10 ⁴	
	-3	18	25	2,15x10 ⁴	
	0	TNTC	TNTC	-	1,08x10 ⁴
	-1	TNTC	TNTC	-	
	-2	106	126	1,16x10 ⁴	
	-3	11	9	1,00x10 ⁴	
	-1	TNTC	TNTC	-	2,80x10 ⁴
	-2	TNTC	TNTC	-	
	-3	31	25	2,80x10 ⁴	

A análise em sistema real demonstrou que o sensor inteligente pode realizar a detecção de eventuais defeitos na embalagem e falhas nas condições de estocagem garantindo a integridade dos produtos, evitando que cheguem ao consumidor com qualidade inadequada, de forma que reduzam consideravelmente os riscos à saúde relacionados com toxinfecção alimentar.

Os resultados da análise em condições reais de contaminação microbiológica em alimentos realizada sob a co-orientação da Professora Dr^a. Pilar Rodriguez de Massaguer na Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello resultaram no artigo intitulado “*A new freshness sensor to detect SRB contamination in meat*” em fase de submissão.

4.4.3. Trabalho em fase de submissão “*A new contamination sensor to detect SRB contamination in meat*”.

Resumo

Um novo sensor de frescor que detecta rapidamente e indica a presença de bactérias sulfito redutoras (SRB) foi desenvolvido. A novidade do presente trabalho está na biodegradabilidade completa do sensor e a compreensão fácil do sensor de resposta quanto ao estado de frescor do alimento. O sensor inteligente foi avaliado em alimentos embalados de vácuo pré-inoculados com *C. gasigenes* e *C. estertheticum*, armazenados a 4 °C e 15 °C. O sensor inteligente indicou claramente a presença de SRB através da alteração colorimétrica de amarelo para preto após duas semanas em amostras armazenadas a 15 ° C e depois de 30 dias em amostras armazenadas a 4 ° C. A mudança de cor indicou que o produto estava inadequado para o consumo.

A new contamination sensor to detect SRB contamination in meat

E.T. Kato Jr.¹, A.R. da S. Marques³, R.D. Chaves³, P.R. de Massaguer¹, C.M.P. Yoshida^{2*} and T.T. Franco¹

¹ *School of Chemical Engineering –University of Campinas, UNICAMP, Av. Albert Einstein, 500 Cep. 13083-852, Campinas – SP, Brazil*

² *Federal University of São Paulo-UNIFESP, Department of Exact and Earth Science, Av. Prof. Artur Riedel, 275, Cep. 09972-270, Diadema – SP, Brazil*

³*School of Food Engineering –University of Campinas, UNICAMP, R. Monteiro Lobato, 80 Cep. 13083-852, Campinas – SP, Brazil*

**e-mail: cristiana.yoshida@unifesp.br*

**Telephone: +55-11-3319-3588 / Fax: +55-11-4043-6428*

A new contamination sensor to detect SRB contamination in meats

Abstract

A novel contamination sensor that rapidly detects and indicates the presence of sulphate-reducing bacteria (SRB) was studied. The novelty of this work lies in the complete biodegradability of the sensor and the easy comprehension of the H₂S gas positive response sensor. With a small instruction label, anyone can identify whether the response is positive, indicating the presence of or contamination by microorganisms. The intelligent sensor was developed using a chitosan matrix with FeSO₄ as a colourimetric indicator. The advantages of using chitosan are its complete biodegradability, its ability to form a resistant and flexible film and its low toxicity. FeSO₄ was selected as the indicator because it produces a colourimetric signal in response to the presence of H₂S gas that is faster than the response of standard methods of detection. For decades, foodborne pathogens have been recognised as an important public health issue in many countries, and spoilage-causing microorganisms lead to economic losses. The tested system can indicate the presence of H₂S gas, a metabolic product of sulphate-reducing bacteria, providing information to the consumer about the safety and quality of the food product and indicating the product's freshness. The sensor was created by coating a cardboard surface with a chitosan-FeSO₄ suspension. In this study, the intelligent sensor was placed into a vacuum-package of fresh meat pre-inoculated with *C. estertheticum* and *C. gasigenes*, and the meat was stored at 4 °C or 15 °C. The intelligent sensor clearly indicated the presence of sulphate-reducing bacteria by a colour change from yellow to black after two weeks in the samples stored at 15 °C and after 30 days in the samples stored at 4 °C. The colour change indicated that the product was inappropriate for consumption.

Keywords: chitosan, H₂S gas, colorimetric sensor, biodegradable

1. Introduction

Consumers demand high food quality and have high expectations that such quality will be maintained during the period between purchase and consumption. Many factors can influence product shelf life, such as pH value, water activity, nutrients and available oxygen. Quality assurance could be provided by an intelligent quality control system that enables more efficient production, higher product quality and, as a result, a reduced number of complaints from retailers and consumers (Ahvenainen, 2003).

According to Moschonas *et al.* (2011), foodborne illness has been associated with psychrophilic and psychrotrophic anaerobic clostridia. Carcasses and derived meat products can be potentially contaminated by these microorganisms during ordinary operations in slaughterhouses.

The U.S. Food and Drug Administration (FDA) has reported that *perfringens* food poisoning is a common foodborne illness caused by *Clostridium perfringens* and that food contaminated with Type C strains causes a serious but rare foodborne illness. Normally, *perfringens* poisoning is characterised by intense abdominal cramps and diarrhoea, which begin 8-22 hours after the consumption of contaminated foods. A few deaths due to dehydration and other complications have been reported. The most severe form caused by *C. perfringens*, necrotic enteritis (pig-bel syndrome), is often fatal, with infection and necrosis of the intestines and septicaemia.

Vacuum-packaged raw meats can be spoiled by *Clostridium estertheticum* at the early stages of storage at chilled temperatures. This spoilage is usually associated with the production of large volumes of gas with consequent gross swelling of the packs (Yang, Balamurugan and Gill, 2011). This type of spoilage is responsible for significant economic losses to the meat industry. Other species of cold-tolerant *Clostridium* have been reported to cause spoilage of vacuum-packed meat, including *C. gasigenes* and *C. algidicarnis* (Silva *et al.*, 2011).

Pires *et al.* (2012) suggested that between 1993 and 2010, 24.1% of disease caused by *C. perfringens* could be attributed to the general category 'meat', 15.7% to chicken, 13.9% to beef, 13.6% to vegetables, 11.2% to pork and 9.2% to seafood. *Clostridium* was the most frequently isolated bacterial population recovered from beef abattoir environments and/or samples (Moschonas *et al.*, 2011). According to Yang, Balamurugan and Gill (2011), *C. estertheticum* has commonly been detected in samples of blown vacuum-packaged beef in extensive commercial testing.

According to Nychas *et al.* (2008), meat spoilage is not always evident, and the main qualitative criteria for meat rejection are gross discoloration, strong off-odours and the development of slime. Generally, spoilage is a subjective judgment by the consumer, influenced by cultural and economic factors and background.

Dainty (1996) reported that the production of H₂S can be used as an indication of *Enterobacteriaceae*, and hence, there are hygienic problems in anaerobically stored meat.

Several methods and techniques have been proposed to evaluate the freshness of fish. For example, an electronic tongue was developed by Gil *et al.* (2008) to analyse fish freshness, and an electrochemical sensing of trimethylamine based on polypyrrole–flavin-containing monooxygenase was developed by Bourigua *et al.* (2011). Pacquit *et al.* (2006) developed a volatile amine sensor for the monitoring of fish spoilage. Patange, Mukundan and Kumar (2005) developed a simple and rapid chemical method for the determination of histamine in fish flesh to determine seafood quality. According to those authors, histamine is a significant chemical hazard in fish that is derived from the bacterial decarboxylation of the amino acid histidine, which is present in large amounts in fish from the Scombridae family. Histamine is considered to be a good indicator of temperature abuse and can be used to assess manufacturing practices in the handling of fish in the Scombridae family, among others.

Biodegradable packaging films continue to be important for food and pharmaceutical research targets, owing to the significant potential commercial

applications of these films (Yoshida and Antunes, 2004; Cheng *et al.*, 2002; Yoshida, Bastos and Franco, 2010; Maciel, Yoshida and Franco, 2012; Reis *et al.*, 2011). Currently, there is considerable and increasing interest in reducing environmental pollution from plastic wastes. According to Doi *et al.* (1998), the treatment of plastic waste has become a serious problem because of the difficulty of ensuring reclaimed land and burning by incineration; this problem has initiated the search for alternative approaches to the treatment of plastic waste. Natural polymer films have been investigated for their ability to retard the transport of moisture, gases, flavour and lipids (Pérez-Gago, Nadaud & Krochta, 1999).

Chitosan is a polysaccharide derived from chitin after removing acetyl groups with alkali. Chitin is very abundant in nature; it is found in fungal walls and the exoskeletons of crustaceans and insects (Peter, 2002). Chitosan is an excellent film-forming linear polymer with a backbone consisting of β -(1-4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucose (*N*-acetyl glucosamine - GlcNAc) residues and glucosamine residues (GlcN). It is characterised by its degree of acetylation (DA) and average molecular weight (Mw), among other properties (Muzzarelli, 1996). It has low toxicity, is biodegradable and, depending on its molecular structure, size and concentration, may inhibit the growth of fungi, bacteria and yeasts. It is soluble in dilute acid because it contains a free amine group (-NH_2) that is protonated in acidic solutions to form an ammonium group (-NH_3^+) (Hon, 1996). These useful properties make chitosan a promising biodegradable polymer for active food packaging (Suyatma *et al.*, 2004; Abdullah *et al.*, 2006). Chitosan showed different film properties when different additives were used to prepare the film-forming solutions (Yoshida, Oliveira-Junior and Franco, 2009).

In the study presented here, a biodegradable contamination sensor for H_2S was tested in fresh meat and vacuum-packed meat products because they can be contaminated by sulphate-reducing bacteria.

The objective of this paper was to determine the efficiency response of the new contamination sensor as a quality control tool for vacuum-packaged meat.

2. Material and methods

2.1. *Raw materials*

Chitosan was supplied by Primex (degree of acetylation of 18%, Siglufjörður, Island); acetic acid was provided by Synth (Brazil); FeSO_4 and Na_2CO_3 were provided by Synth (Brazil); card paper Triplex TP250 (250 g/m^2) was provided by Suzano Papel e Celulose Ltda. (Brazil); reinforced clostridial medium (RCM) was provided by Acumedia (USA); glucose was provided by Synth (Brazil); agar was provided by Acumedia (USA); and Anaerobac was provided by Probac do Brasil.

2.2. *Methods*

2.2.1. *Chitosan film suspensions*

The production of the film suspension was adapted from Yoshida *et al.* (2009) by dispersing chitosan (3.0 %, w/w) in aqueous acetic acid. The stoichiometric amount of acetic acid was calculated from the weight of the sample, taking into account the value of the degree of acetylation (DA) to achieve the protonation of NH_2 sites (Notin *et al.*, 2006). The dispersions were homogenised by magnetic stirring at room temperature for 60 minutes until complete dissolution. Then, an aqueous solution of FeSO_4 (1.5 %) was added, and the chitosan suspension was supplemented to 100 g.

2.2.2. *Contamination sensor production*

Cardboard sheets (0.045 m^2) were superficially impregnated with 3 mL of sodium carbonate (Na_2CO_3) solution (4 %, w/w) using a 40- μm -thick bar extension (TKB Erichsen Instruments, Brazil); then, they were dried in an oven at 150°C for

90 seconds. The sheets of cardboard were coated with aliquots of 2.0 g of the chitosan film suspensions according to the method described by Kato *et al.* (2011). After drying, the intelligent sensor was normalised to 3.0 x 3.0 cm, and the lower face was covered with PVC plastic film to decrease the liquid adsorption process and protect the physical structure of the system.

2.2.3. Assessment of the detection potential of the intelligent sensor

The method used to assess the detection potential of the intelligent sensor was adapted from Broda *et al.* (1996). All procedures were carried out in a laminar flow cabinet. Twenty-two samples of fresh sirloin muscle (*Longissimus dors*), ten for each microorganism and two as negative control, were purchased in a local market. The surface fat was trimmed. Steaks measuring approximately 10 x 5 x 2 cm were cut, and both faces were sterilised by searing with a hot iron. The samples were placed individually into CryovacTM (BB2800) laminate bags. For inoculation, cultures of *Clostridium gasigenes*, DSM-12272, previously isolated from fresh cuts of vacuum-packed sirloin steak (Silva *et al.*, 2011) and a culture of *Clostridium estertheticum*, DSM-8809, (positive control) were used. A 1 mL volume with a cell concentration of approximately 6.0×10^8 CFU/mL was pipetted on one side of a steak and distributed evenly on the surface. A intelligent sensor was then added to the meat surface. The inoculated meat packs were immediately evacuated to a vacuum level of 6 mbar and sealed using a CryovacTM controlled atmosphere/vacuum packaging machine. The twenty inoculated steaks and two uninoculated controls were stored at 4 °C and 15 °C in an incubator (BOD, Tecnal model TE-391, Brazil) and examined weekly for 30 days or until a positive response was noted.

2.2.4. Colour response of intelligent sensor

The colour parameters were measured using a colourimeter (Konica Minolta Chroma Meter CR-400, Japan). The delta values were calculated as

shown in Equation 1, according to Sobral *et al.* (2001), at the beginning of the analysis and after the positive response.

$$\Delta(\alpha) = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i}{n}, \text{Equation 1}$$

where $\alpha = a^* \text{ (axis coordinate of red – green)}, b^* \text{ (axis coordinate of blue – yellow)}$ or $L^* \text{ (luminosity)}$

2.2.5. Enumeration of *C. gasigenes* and *C. estertheticum*

The enumeration essay was performed with the samples stored at 4 °C. The other temperature used, 15 °C, represents an abusive storage temperature and is the optimum growth temperature for psychrophilic microorganisms, which could lead to an erroneous result. For the samples that responded positively to the intelligent sensor, the exposed meat surface (approximately 50 cm²) was swabbed. The swabs were broken into test tubes containing 9 mL of peptone water. Dilutions at a range of 10⁰ – 10⁻⁴ were obtained, 1 mL of the prior dilution was transferred into test tubes containing 9 mL of pure peptone water, and 0.1 mL of the serial decimal dilution was spread onto plates containing Reinforced Clostridium Media – RCM (Acumedia, USA) with 0.5 % glucose (Synth, Brazil) and 2 % agar (Acumedia, USA). The plates were incubated in an anaerobic chamber with anaerobic generators (Anaerobac – Probac do Brasil) at 4 °C and 15 °C for 30 days, and colonies were counted following the incubation.

2.2.6. Statistical analyses

Statistical analyses were carried out with the Statistic software program, version 5.0 (Statisc Inc., USA). Differences between the means were detected using Tukey's multiple comparison test.

3. Results and discussion

Initially, the intelligent sensor presented a light yellow colour. After coming in contact with the meat dripping, the sensor became slightly reddish yellow due to the natural process of liquid absorption in the paper. After coming in contact with the H₂S gas (microorganism metabolite), the sensor changed from slightly reddish yellow to a black colour; in other words the dripping did not interfere with the colour response of the sensor. In previous studies, at conditions previously simulated, the sensor showed a fast colour response of less than 30 s to the presence of H₂S gas (Kato *et al.*, 2011; Franco, Yoshida and Kato, 2010).

3.1. *Assessment of the intelligent sensor detection potential*

The evaluation of the intelligent sensor in the real system (fresh meat) was conducted over five months. In this study, 20 samples and 2 negative controls were stored at two different temperatures: 10 samples and 1 negative control were stored at 4 °C, which is the standard storage temperature of unfrozen raw products, and the other 10 samples and 1 negative control were stored at 15 °C, which represents an abusive storage temperature.

The appearance of the 18 vacuum-packed samples analysed in this study was typical of an unspoiled product, with the normal anoxic colour of vacuum-packed sirloin (Fig. 1 a – c). Four vacuum-packed samples presented a ‘blown pack’ spoilage characteristic (Fig. 1 d). Packaging was tightly applied around the meat, and little drip accumulated in the packs (Fig. 1 a – c); *i.e.*, to a regular customer, a contaminated product would not be different from a non-contaminated one. According to Yang, Balamurugan and Gill (2011), some organisms can cause blown pack spoilage involving only a modest distension of the packs.

Only half of the sensors on the twenty inoculated samples gave a positive response, most likely due to the characteristics of the microorganisms used in this study (strict anaerobes). In other words, the period between the inoculation and the

evacuation procedure could lead to the death of microorganisms and a low number of sensors with a positive response.

At the temperatures used in this study, 4 °C and 15 °C, the ΔL^* , Δa^* and Δb^* of the colour parameters were calculated as the difference between the beginning of the experiment and after the point at which a positive response was obtained (Table 1). Samples stored at 4 °C began to show a positive response at 30 days after the beginning of the experiment, and the samples stored at 15 °C showed a positive response within two weeks of storage, including one negative control. The earlier positive response for the latter group can be explained by the natural presence of microorganism contamination in the meat associated with the improper storage temperature.

The process of liquid adsorption of the meat dripping changed the original colour of the intelligent sensor to slightly reddish yellow but did not affect the functionality of the sensor because the colour change to black was still easily observed.

As shown in Table 1, the change in colour from light to dark (white to black) was clearly visible to the naked eye, but the colour analysis (performed with the colorimeter) revealed important changes in other colour parameters. The changes in colour from green to red (a^*) and blue to yellow (b^*) were statistically significant, indicating the importance of the additional analysis using the colourimeter.

3.2. Enumeration of *C. gasigenes* and *C. estertheticum*

The sensors detected the presence of microorganism contamination. To correlate the colorimetric response with the contamination level, a count analysis was conducted to determine the levels of contamination (Table 2).

At both temperatures studied (4°C and 15°C), the intelligent sensors registered a positive response to the presence of sulphate-reducing bacteria. An average level of contamination of 10^4 CFU/50 cm² was observed. Silva *et al.* (2011)

found populations of 10^{10} CFU/ 100 cm² in 'blown pack' samples and 10^5 CFU/ 100 cm² in unspoiled samples.

4. Conclusions

This intelligent sensor is ideal for monitoring the quality of modified-atmosphere and/or vacuum-packaged products. This packaging prevents the growth of aerobic microorganisms, however, microaerophiles, facultative anaerobes and anaerobic microorganisms are able to grow during storage. This intelligent sensor is able to indicate the spoilage (or the lack of freshness) of the product, in addition to temperature abuse or a package leak, in a shorter period of time compared with the standard methods of detection, such as methylene blue, ASTM D4323-84, D4468-85, D4810-06, D4084-07 and D5504-08 (ASTM, 2006-09, 2011).

The intelligent sensor can efficiently indicate the presence of H₂S gas by changing from yellow to black in vacuum-packed meat products. Even with an apparently typical vacuum-packed product, anoxic staining or the presence of beef dripping in the packaging, the intelligent sensor was able to indicate sulphate-reducing bacteria contamination by a colour change, demonstrating that the product was unfit for consumption. The intelligent sensor proved to be effective even at the level of contamination that is normally found in unspoiled samples.

Acknowledgements

We are grateful to the State of São Paulo Research Foundation, the National Council of Technological and Scientific Development, and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel for funding our research expenses. We also express our gratitude to Labtermo, to the André Tosello Foundation for Tropical Research and Technology, Campinas, SP, Brazil, and to Suzano Papel e Celulose, Suzano, SP, Brazil.

References

Abdullah, J.; Ahmad, M.; Karuppiyah, N.; Heng, L.Y.; Sider, H., 2006. Immobilization of tyrosinase in chitosan film for an optical detection of phenol. *Sensors and Actuators B*, 115, 604-609.

Ahvenainen, R., 2003. Active and Intelligent Packaging: an introduction. In R. Ahvenainen (Ed) *Novel Food packaging techniques* (pp.5-21). Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd.

ASTM Standard D4084-07, "Standard Test Method for Analysis of Hydrogen Sulfide in Gaseous Fuels (Lead Acetate Reaction Rate Method)." DOI: 10.1520/D4084-07, www.astm.org.

ASTM Standard D4323-84(2009), "Standard Test Method for Hydrogen Sulfide in the Atmosphere by Rate of Change of Reflectance." DOI: 10.1520/D4323-84R09, www.astm.org.

ASTM Standard D4468-85(2011), "Standard Test Method for Total Sulfur in Gaseous Fuels by Hydrogenolysis and Rateometric Colorimetry." DOI: 10.1520/D4468-85R11, www.astm.org.

ASTM Standard D4810-06, "Standard Test Method for Hydrogen Sulfide in Natural Gas Using Length-of-Stain Detector Tubes." DOI: 10.1520/D4810-06, www.astm.org.

ASTM Standard D5504-08, "Standard Test Method for Determination of Sulfur Compounds in Natural Gas and Gaseous Fuels by Gas Chromatography and Chemiluminescence." DOI: 10.1520/D5504-08, www.astm.org.

Bourigua, S., Ichi, S.E., Korri-Youssoufi, H., Maaref, A., Dzyadevych, S., Renault, N.J., Electrochemical sensing of trimethylamine based on o-lypyrrole-flavin-containing monooxygenase (FMO₃) and ferrocene as redox probe for evaluation of fish freshness. *Biosensors and Bioelectronics*, In Press, Corrected Proof, Available online 13 July 2011

- Broda, D.M., DeLacy, K.M., Bell, R.G., Braggins, T.J., Cook, R.L., 1996. Psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with 'blown pack' spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. *International Journal of Food Microbiology* 29, 335-352.
- Cheng, L.H.; Karim, A.A.; Norziah, M.H. & Seow, C.C., 2002. Modification of the microstructural and physical properties of konjac glucomannan-based films by alkali and sodium carboxymethylcellulose. *Food Research International*; 35, pp. 829-836.
- Dainty, R.H., 1996. Chemical/biochemical detection of spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 19–33.
- Doi, Y., Takmaki, A., Kunioka, M., & Soga, K., 1998. Production of esters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric acid and pentanoic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28, 330–334.
- Franco, T.T.; Yoshida, C.M.P. and Kato Junior, E.T. Biodegradable sensor containing H₂S indicators and method for producing same. Pub. No. WO/2011/072349. International Application No. PCT/BR2010/000394. Pub. Date: 23.06.2011. International Filing Date: 24.11.2010.
- Gil, L., Barat, J.M., Escriche, I., Garcia-Breijo, E., Martinez-Manez, R., Soto, J., 2008. An electronic tongue for fish freshness analysis using a thick-film array of electrodes. *Microchim Acta*, 163, 121–129.
- Hon, D.N-S., 1996. Chitin and Chitosan: medical applications. In: *Polysaccharides in Medicinal Applications*. Edited Dumitriu, S. Marcell Decker. New York, pp.794.
- Kato Junior, E.T.; Yoshida, C.M.P.; Reis, A.B.; Melo I.S. and Franco, T.T., 2011. Fast detection of H₂S using a biodegradable colorimetric indicator system, *Polymer International*, v.60, Issue 6. (Article first published online : 2 MAY 2011, DOI: 10.1002/pi.3095).
- Maciel, V.B.V.; Yoshida, C.M.P.; Franco, T.T., 2012. Development of a prototype of a colourimetric temperature indicator for monitoring food quality. *Journal of Food Engineering*, 11, 21-27.

- Moschonas, G.; Bolton, D.J.; McDowell, D.A. and Sheridan, J. J., 2011. Diversity of Culturable Psychrophilic and Psychrotrophic Anaerobic Bacteria Isolated from Beef Abattoirs and Their Environments. *applied and Environmental Microbiology*, p. 4280–4284.
- Muzzarelli, R.A.A., 1996.Chitosan-based dietary foods. *Carbohydrate Polymer*; 29, 306-316.
- Notin, L.; Viton, C.; David, L.; Alcouffe, P.; Rochas, C.; Domard, A., 2006. Morphology and mechanical properties of chitosan fibers obtained by gel-spinning: Influence of the dry-jet-stretching step and ageing. *ActaBiomaterialia*, Volume 2, Issue 4, 387-402.
- Nychas, G.-J.E.; Skandamis, P.N.; Tassou, C.C.; Koutsoumanis, K.P., 2008.Meat spoilage during distribution.*Meat Science* 78, 77–89.
- Pacquit, A., Lau, K.T., McLaughlin, H., Frisby, J., Quilty, B. and Diamond, D., 2006.Development of a volatile amine sensor for the monitoring of fish spoilage.*Talanta*, Volume 69, Issue 2, 15, Pages 515-520.
- Patange, S.B., Mukundan, M.K., Kumar, K.A., 2005.A simple and rapid method for colorimetric determination of histamine in fish flesh. *Food Control*, Volume 16, Issue 5, Pages 465-472.
- Pérez-Gago, M.B.; Nadaud, P. &Krochta, J.M., 1999.Water vapour permeability, solubility and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films. *Journal of Food Science*; 64 (6), 1034-1037.
- Peter, M.G., 2002.Chitin and Chitosan from Fungi. In: *Biopolymers*, A. Steinbüchel (Ed.), Vol. 6: Polysaccharides II ,Weinheim: Wiley-VCH, 123 – 157.
- Pires, S.M.; Vieira, A.R.; Perez, E.; Wong, D.L.F. and Hald, T., 2012.Attributing human foodborne illness to food sources and water in Latin America and the Caribbean using data from outbreak investigations.*International Journal of Food Microbiology*, 152, 129–138.

Reis, A.B.; Yoshida, C.M.P.; Reis, A.P.C. and Franco, T.T., 2011. Application of chitosan emulsion as a coating on Kraft paper. *Polymer International*; 60 (6), 963-969.

Silva, A.R.; Paulo, É.N.; Sant'Ana, A.S.; Chaves, R.D. and Massaguer, P.R., 2011. Involvement of *Clostridium gasigenes* and *C. algidicarnis* in 'blown pack' spoilage of Brazilian vacuum-packed beef. *International Journal of Food Microbiology*; 148, 156-163.

Sobral, P.J.A.; Menegalli, F.C.; Hubinguer, M.D. and Roques, M.A., 2001. Mechanical, Water Vapor Barrier and Thermal Properties of Gelatin Based Edible Films. *Food Hydrocolloids*, 15: 423-32.

Suyatma, N.E.; Copinet, A.; Tighzert, L. & Coma, V., 2004. Mechanical and barrier properties of biodegradable films made from chitosan and poly (lactic acid) blends. *Journal of Polymer and Environmental*; 12(1),1-6.

Yang, X.; Balamurugan, S.; Gill, C.O., 2011. Effects on the development of blown pack spoilage of the initial numbers of *Clostridium estertheticum* spores and *Leuconostoc mesenteroides* on vacuum packed beef. *Meat Science*; 88, 361–367.

Yoshida, C.M.P.; Bastos, C.E.N.; Franco, T.T., 2010. Modeling of potassium sorbate diffusion through chitosan films. *Food Science and Technology: LWT*; 43 (4), 584-589.

Yoshida, C.M.P.; Antunes, A.J., 2004. Water vapour permeability of whey protein emulsion films. *Milchwissenschaft*, 59(1/2), 48-51.

Yoshida, C.M.P.; Oliveira-Junior, E.N.; Franco, T.T., 2009. Chitosan Tailor-Made Films: the effects of additives on barrier and mechanical properties. *Packaging Science and Technology*, 22, 161-170.

Figure Captions

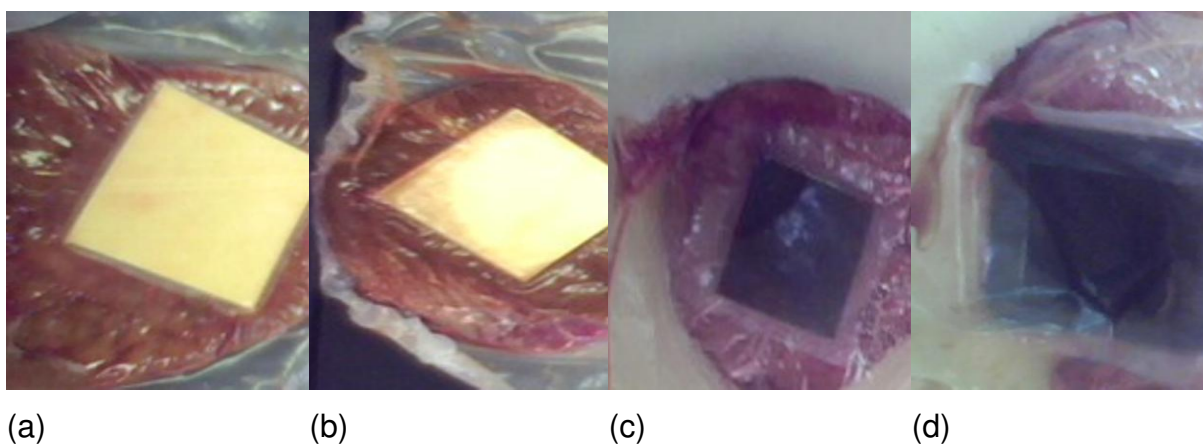


Fig. 1. Evaluation in a real system of the intelligent sensor; (a) - (b) appearance of the sensor immediately after inoculation; (c) - (d) sensors registering a positive response to the presence of H₂S (after two weeks at a storage temperature of 15 °C), *i.e.*, detection of sulphate-reducing bacterial contamination. Fig. 1 d shows a blown pack with a positive sensor.

Table Captions

Table 1. Means of colour parameters of the intelligent sensors.

Temperature	4°C			15°C		
Sample	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔL^*	Δa^*	Δb^*
<i>Clostridium estertheticum</i> (positive control)	44.01±8.65 ^a	9.79±7.54 ^a	28.51±0.34 ^a	21.65±4.21 ^a	0.25±4.11 ^{ac}	17.53±4.04 ^a
<i>Clostridium gasigenes</i> (sample)	27.62±8.57 ^a	-10.36±4.03 ^b	14.76±3.73 ^b	31.10±1.60 ^b	-7.70±0.51 ^b	22.60±3.01 ^a
Negative control	-	-	-	45.59±5.70 ^c	5.43±2.24 ^c	33.05±2.98 ^b

Same letters in the same column are not significantly different from each other (Tukey test, $p>0.05$).

Table 2. Microbiological psychrotrophic *Clostridium* count to determine the level of meat package contamination for intelligent sensors that responded positively.

Sample	Dilution	Count (CFU/50 cm ²)	Mean (CFU/50 cm ²)
<i>Clostridium estertheticum</i>	-1	TNTC	2.69x10 ⁴
	-2	2.06x10 ⁴	
	-3	3.50x10 ⁴	
	-4	2.50x10 ⁴	
<i>Clostridium gasigenes</i>	0	TNTC	2.16x10 ⁴
	-1	TNTC	
	-2	2.36x10 ⁴	
	-3	1.95x10 ⁴	
	0	TNTC	1.30x10 ⁴
	-1	TNTC	
	-2	TNTC	
	-3	1.30x10 ⁴	
	0	TNTC	2.21x10 ⁴
	-1	TNTC	
	-2	2.26x10 ⁴	
	-3	2.15x10 ⁴	
	0	TNTC	1.08x10 ⁴
	-1	TNTC	
	-2	1.16x10 ⁴	
	-3	1.00x10 ⁴	
	-1	TNTC	2.80x10 ⁴
	-2	TNTC	
	-3	2.80x10 ⁴	

TNTC, Too Numerous To Count

Highlights

- A new intelligent meat sensor was developed
- A new and fast sensor that indicates SRB contamination was evaluated
- The ease of understanding of the sensor response was provided by visual colour variation

4.5. Etapa 5 – Análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente, investigação do elemento e/ou composto ligado a matriz de quitosana e avaliação de possíveis alterações químicas resultantes do processo de produção do sensor inteligente.

O sensor mostrou-se reversível, pois após um curto período, no máximo 2 dias, sem exposição ao gás H_2S o sensor inteligente volta a sua coloração inicial (levemente amarelado), devido a observação deste processo de reversibilidade na Etapa 5 foi realizado uma análise quantitativa para avaliar e quantificar a presença de compostos sulfurosos.

4.5.1. Análise quantitativa dos elementos do sensor inteligente

A análise quantitativa dos elementos químicos presentes no papel cartão revestido com quitosana foi realizada para certificar-se que a matriz física não apresentava contaminação por ferro e/ou compostos de enxofre (Figura 35).

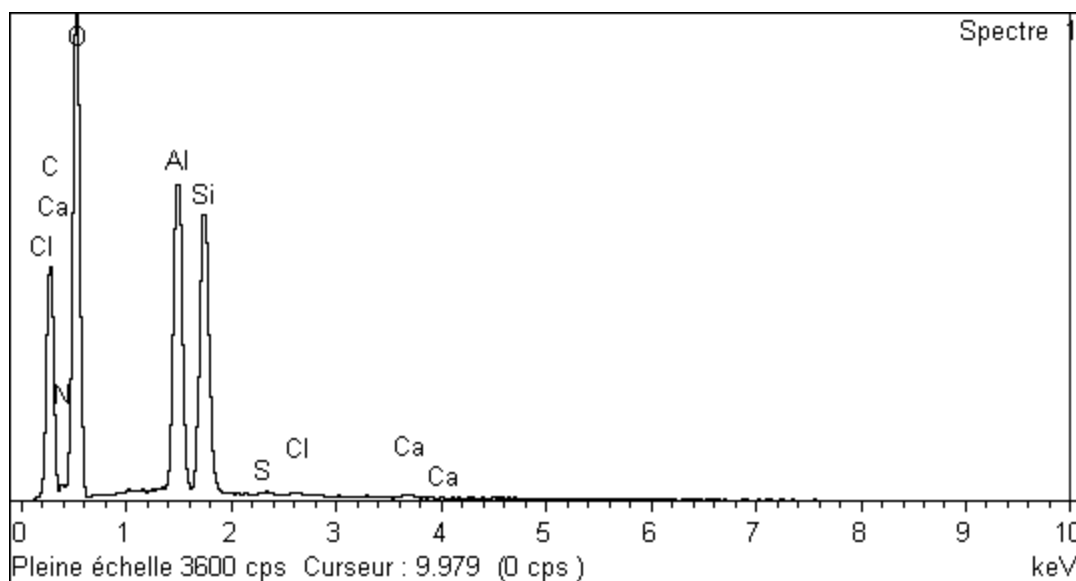


Figura 35. Espectro de EDS, análise quantitativa dos elementos presentes no papel cartão revestido com quitosana.

As Figuras 36 – 40 representam a análise quantitativa dos elementos do sensor inteligente em todas as formulações inicialmente estudadas antes da exposição ao gás H_2S .

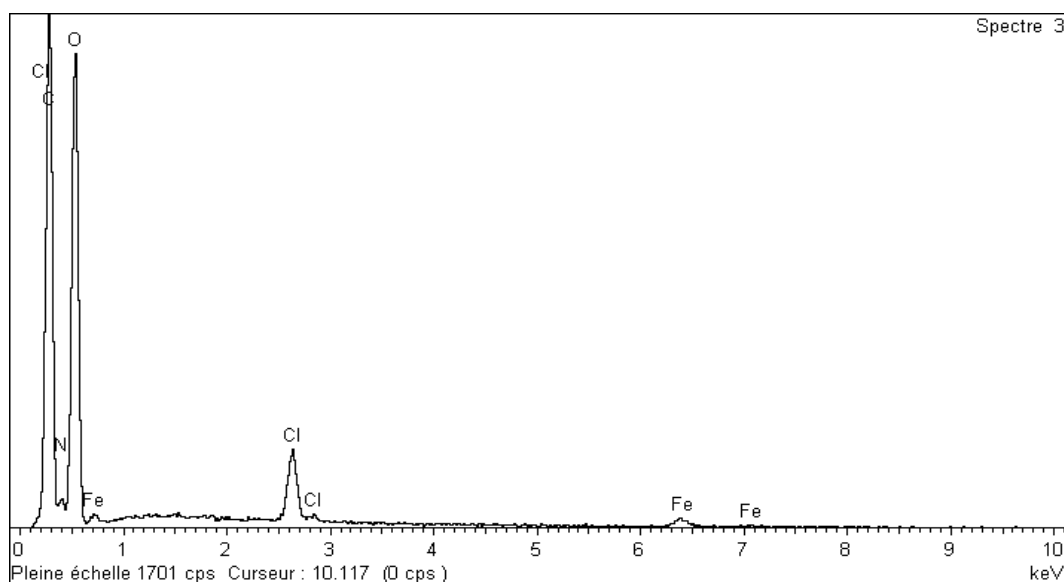


Figura 36. Espectro de EDS, análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente contendo 0,2 % em sais de ferro antes de ser exposto ao H_2S .

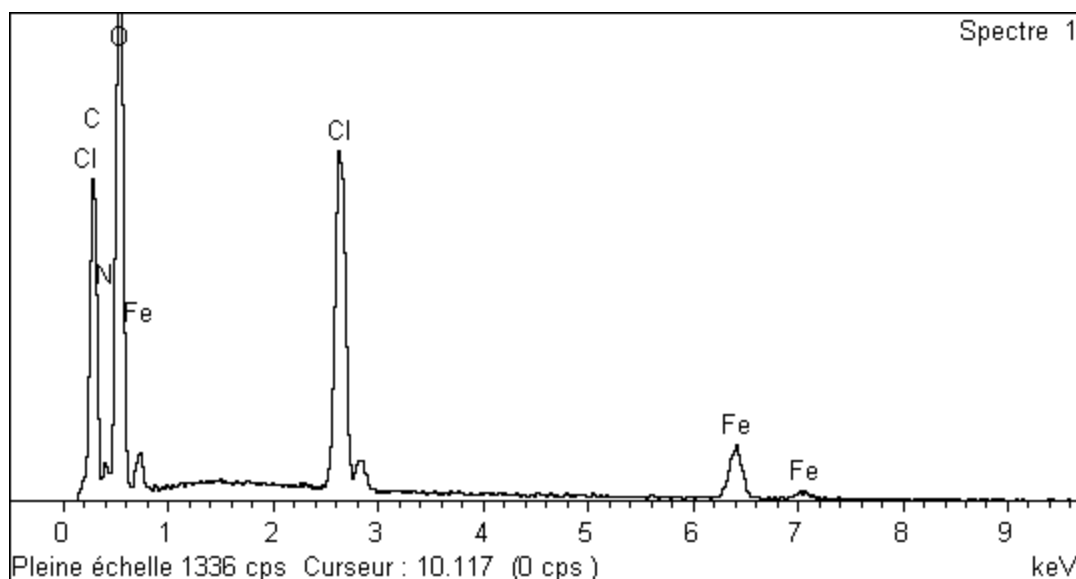


Figura 37. Espectro de EDS, análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente contendo 0,6 % em sais de ferro antes de ser exposto ao H_2S .

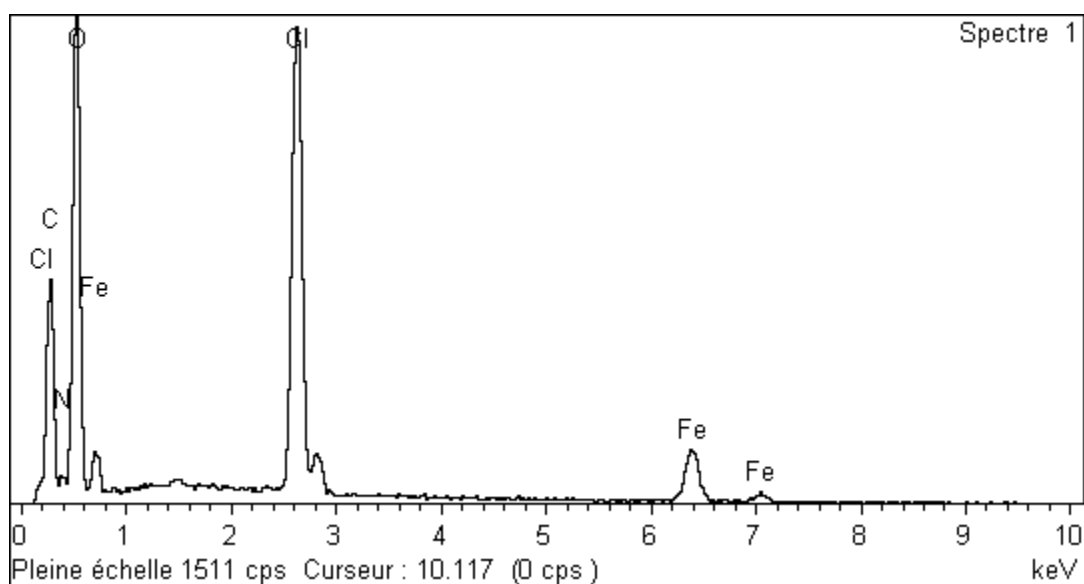


Figura 38. Espectro de EDS, análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente contendo 1,0 % em sais de ferro antes de ser exposto ao H_2S .

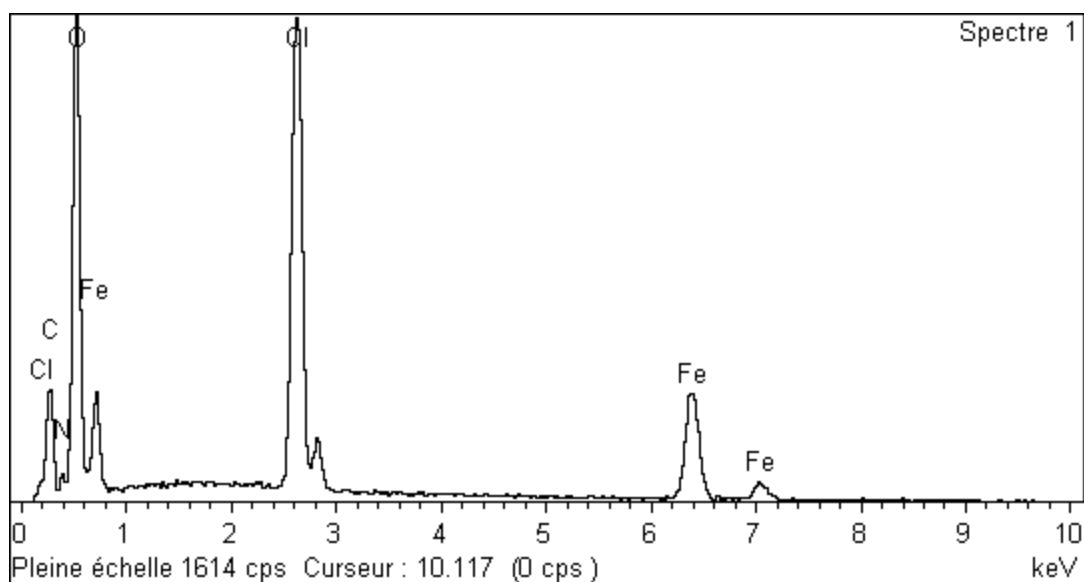


Figura 39. Espectro de EDS, análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente contendo 1,5 % em sais de ferro antes de ser exposto ao H_2S .

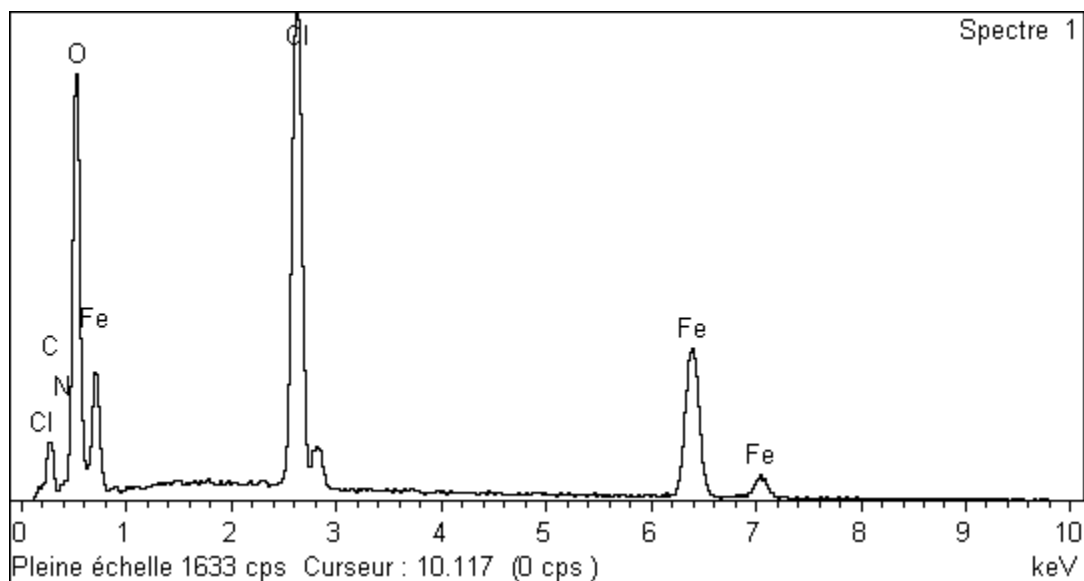


Figura 40. Espectro de EDS, análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente contendo 2,0 % em sais de ferro antes de ser exposto ao H_2S .

As Figuras 41 – 45 representam a análise quantitativa dos elementos do sensor inteligente em todas as formulações inicialmente estudadas imediatamente após a exposição ao gás H_2S .

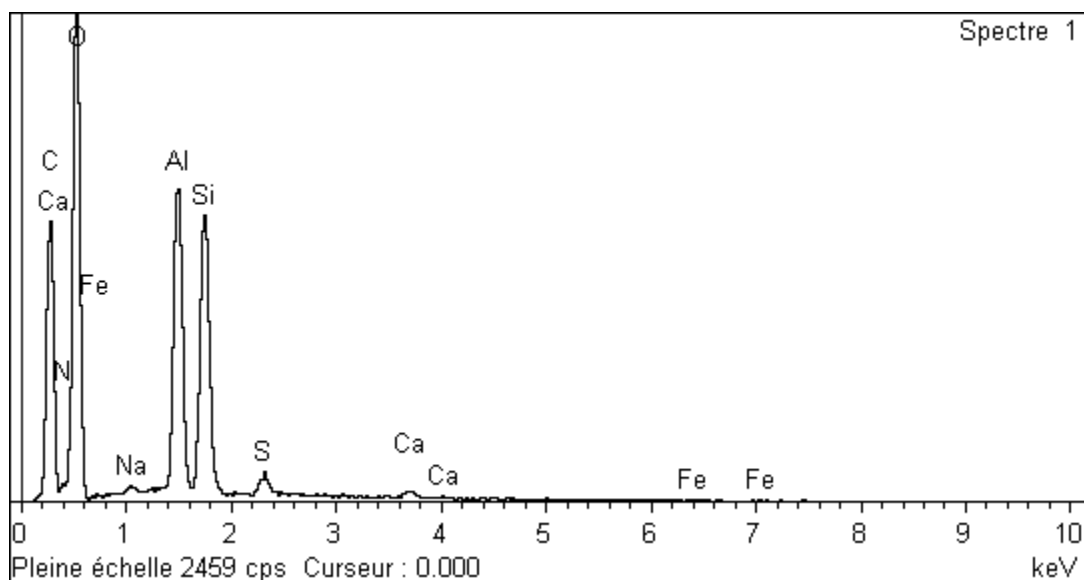


Figura 41. Espectro de EDS, análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente contendo 0,2 % em sais de ferro imediatamente após ser exposto ao H_2S .

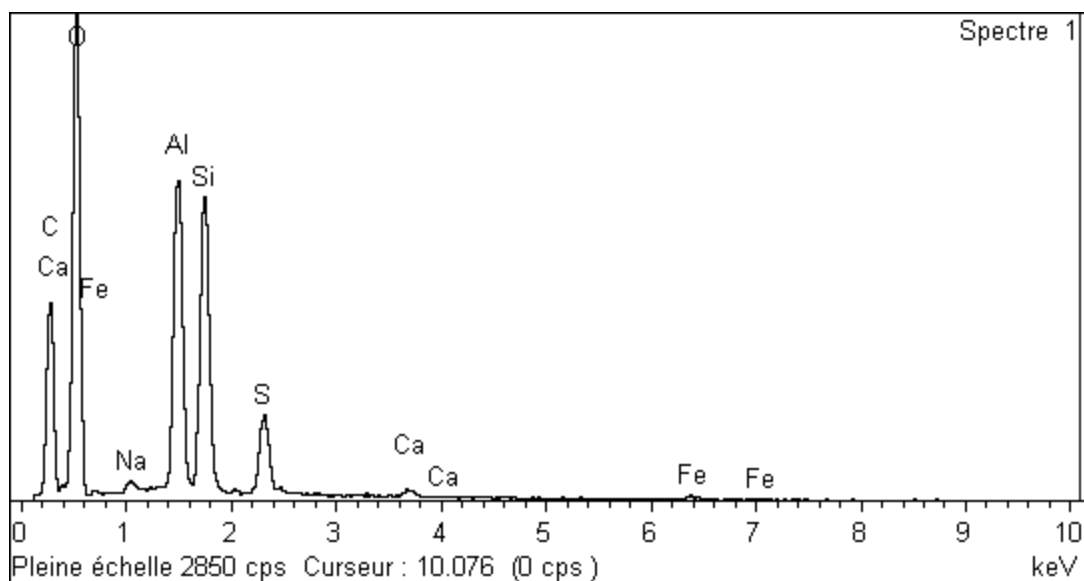


Figura 42. Espectro de EDS, análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente contendo 0,6 % em sais de ferro imediatamente após ser exposto ao H_2S .

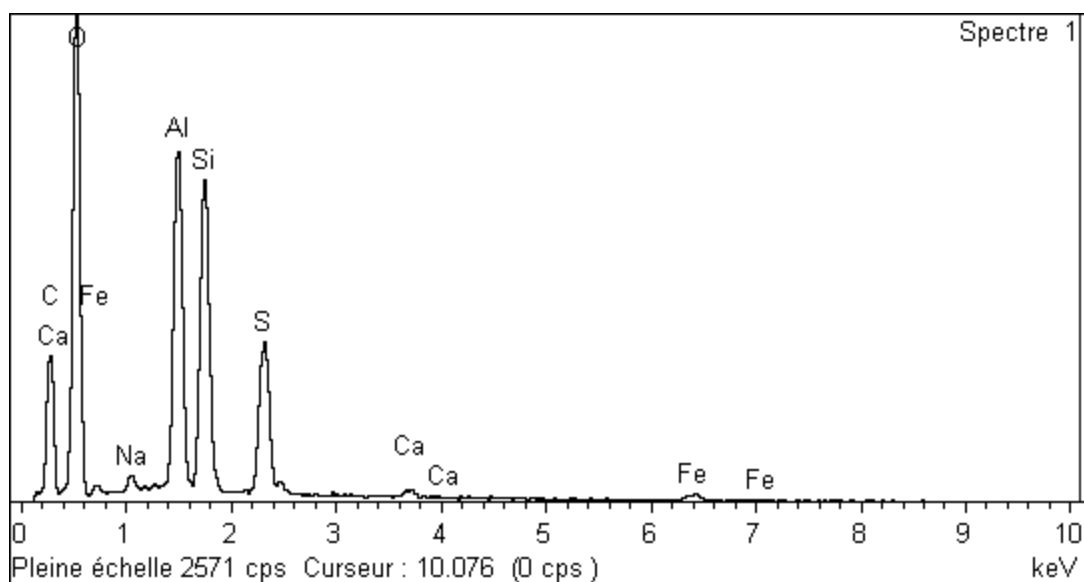


Figura 43. Espectro de EDS, análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente contendo 1,0 % em sais de ferro imediatamente após ser exposto ao H_2S .

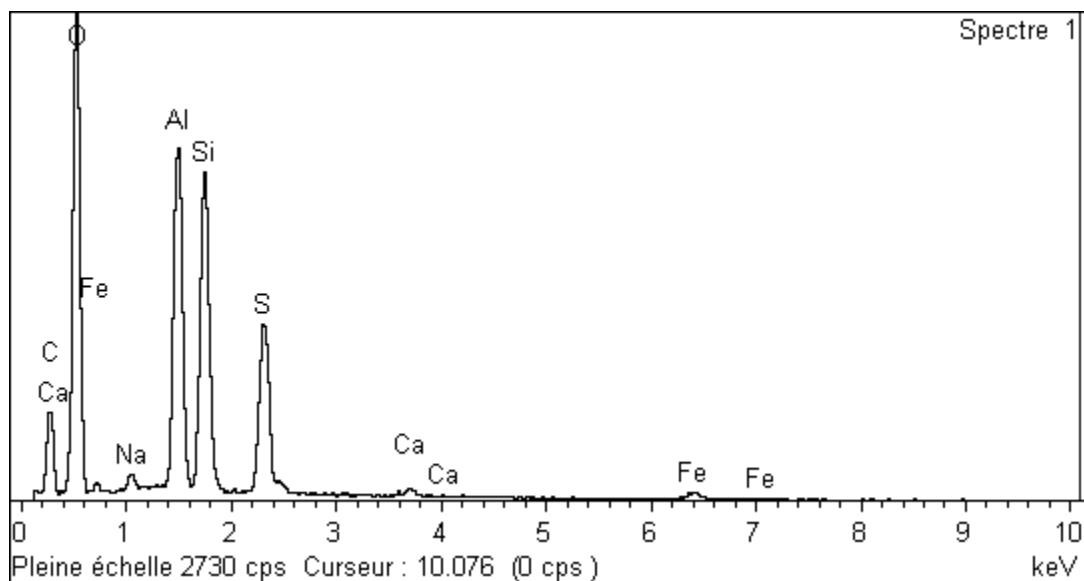


Figura 44. Espectro de EDS, análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente contendo 1,5 % em sais de ferro imediatamente após ser exposto ao H_2S .

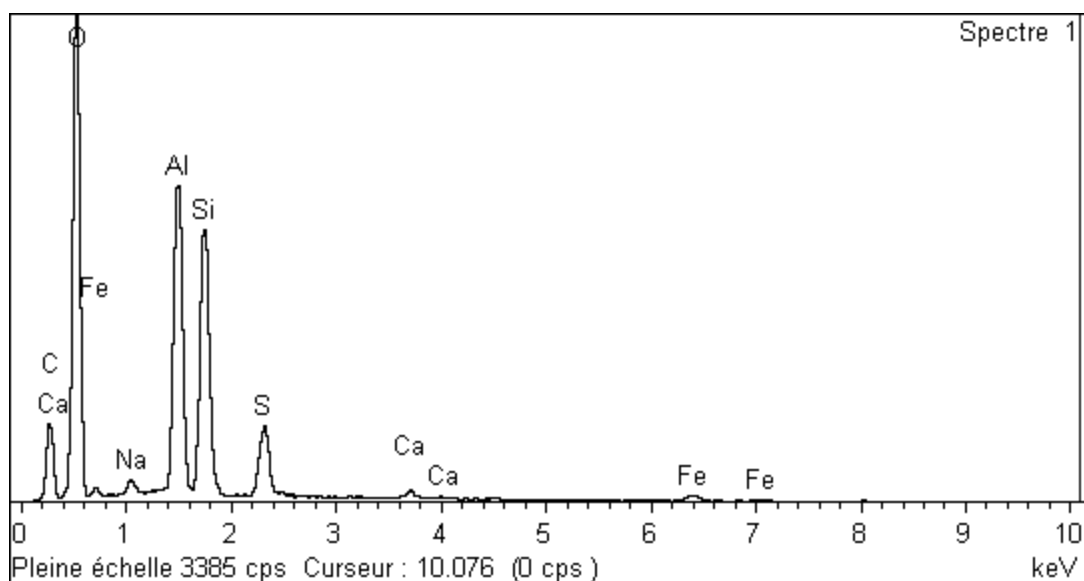


Figura 45. Espectro de EDS, análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente contendo 2,0 % em sais de ferro imediatamente após ser exposto ao H_2S .

As Figuras 46 – 50 representam a análise quantitativa dos elementos do sensor inteligente em todas as formulações inicialmente estudadas 10 dias após a exposição ao gás H_2S .

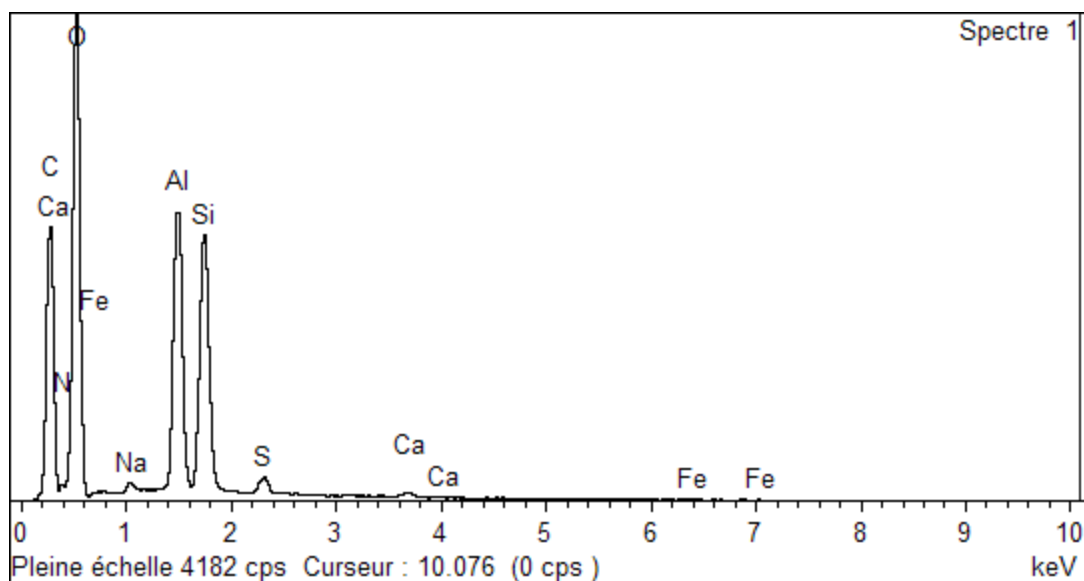


Figura 46. Espectro de EDS, análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente contendo 0,2 % em sais de ferro 10 dias após ser exposto ao H_2S .

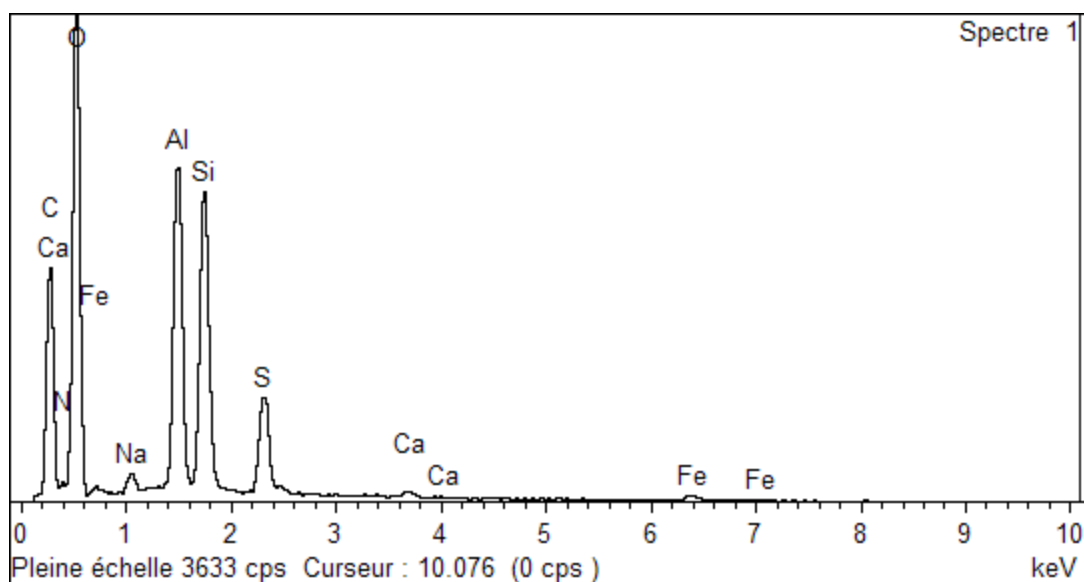


Figura 47. Espectro de EDS, análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente contendo 0,6 % em sais de ferro 10 dias após ser exposto ao H_2S .

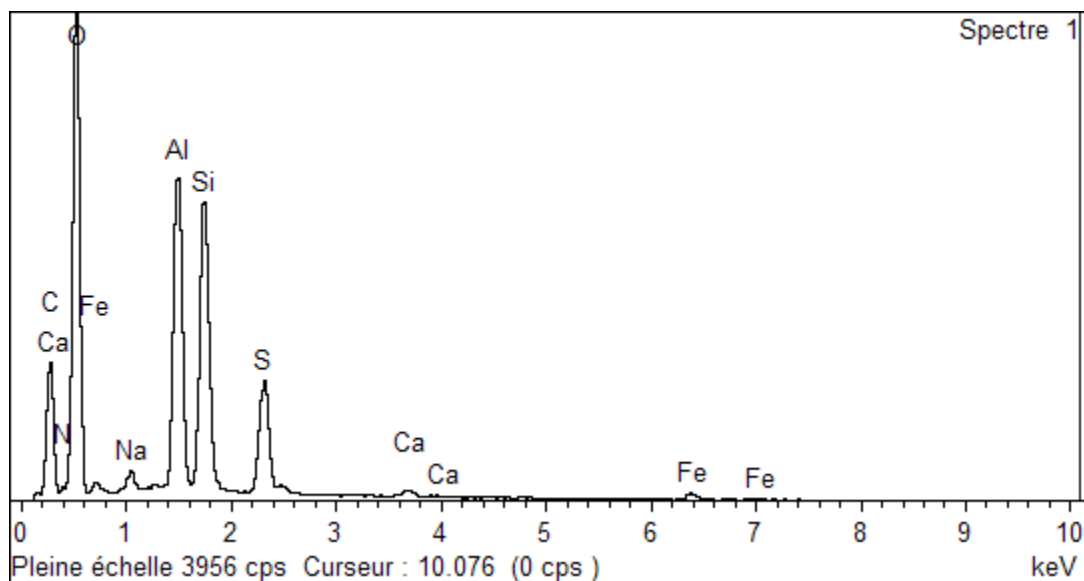


Figura 48. Espectro de EDS, análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente contendo 1,0 % em sais de ferro 10 dias após ser exposto ao H_2S .

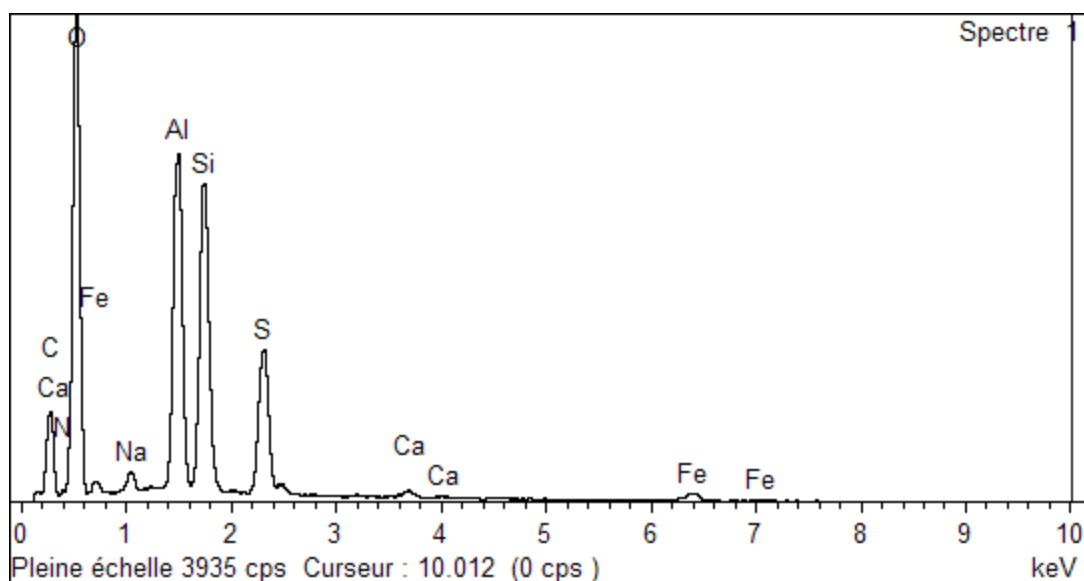


Figura 49. Espectro de EDS, análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente contendo 1,5 % em sais de ferro 10 dias após ser exposto ao H_2S .

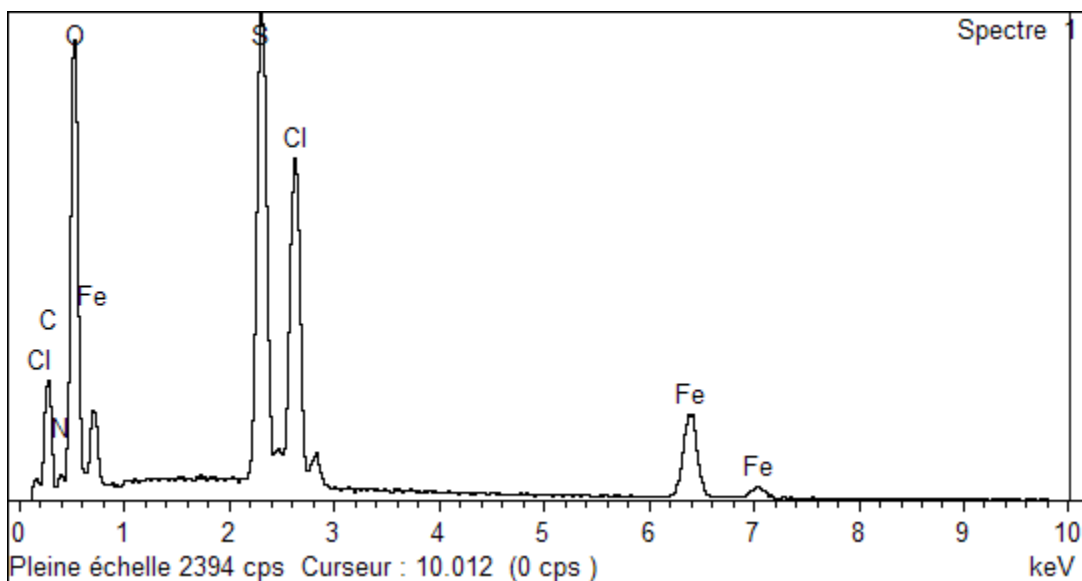


Figura 50. Espectro de EDS, análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente contendo 2,0 % em sais de ferro 10 dias após ser exposto ao H_2S .

As Figuras 51 – 55 representam a análise quantitativa dos elementos do sensor inteligente em todas as formulações inicialmente estudadas 2 meses após a exposição ao gás H_2S .

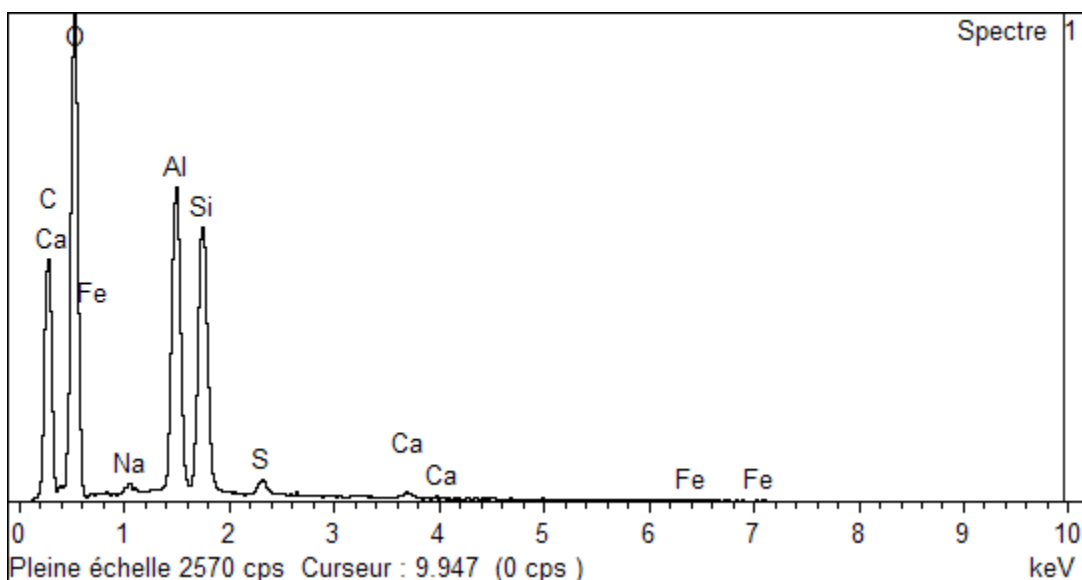


Figura 51. Espectro de EDS, análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente contendo 0,2 % em sais de ferro 2 meses após ser exposto ao H_2S .

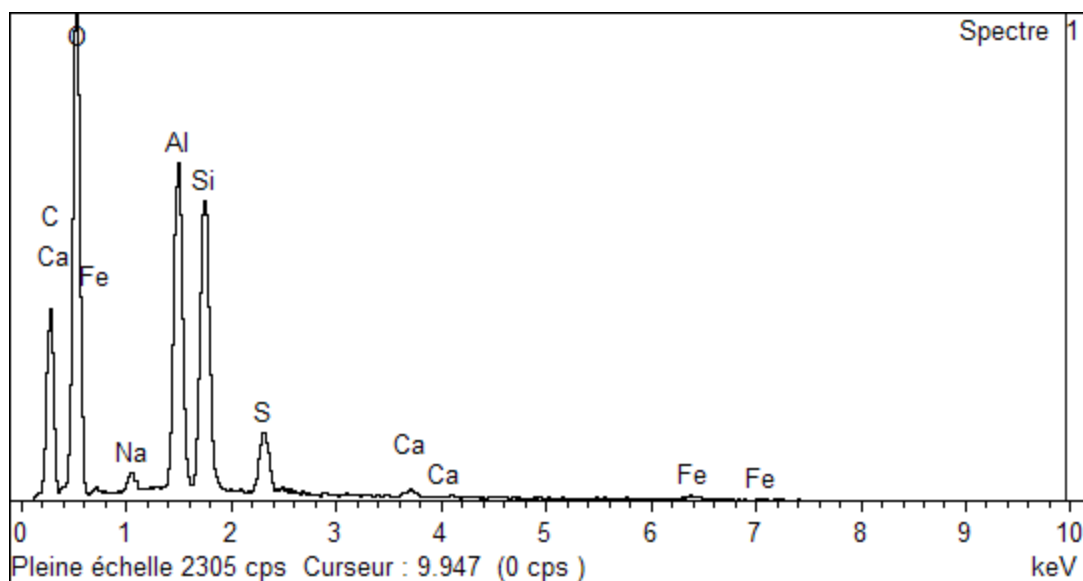


Figura 52. Espectro de EDS, análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente contendo 0,6 % em sais de ferro 2 meses após ser exposto ao H_2S .

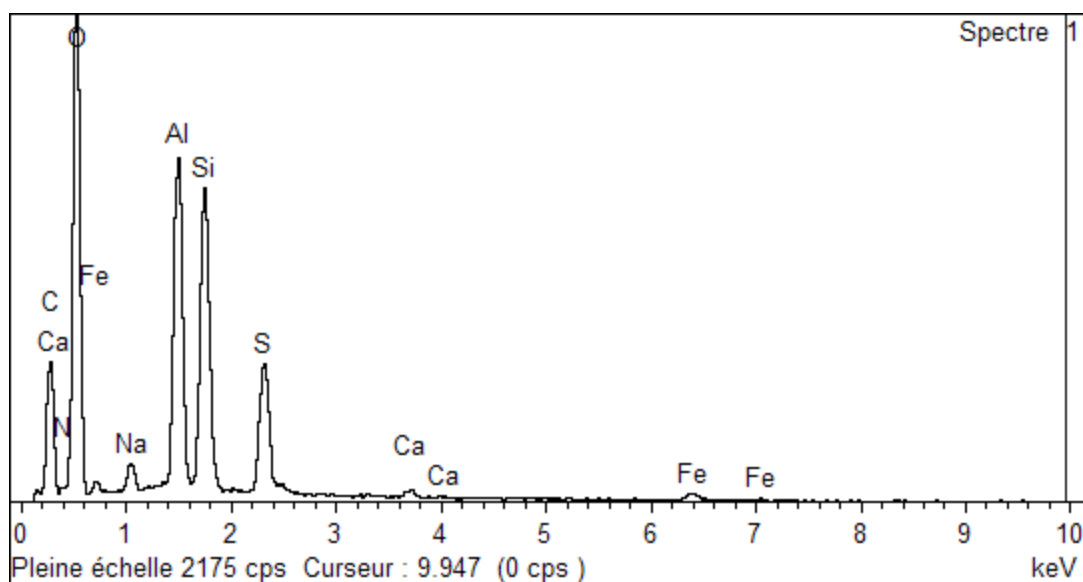


Figura 53. Espectro de EDS, análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente contendo 1,0 % em sais de ferro 2 meses após ser exposto ao H_2S .

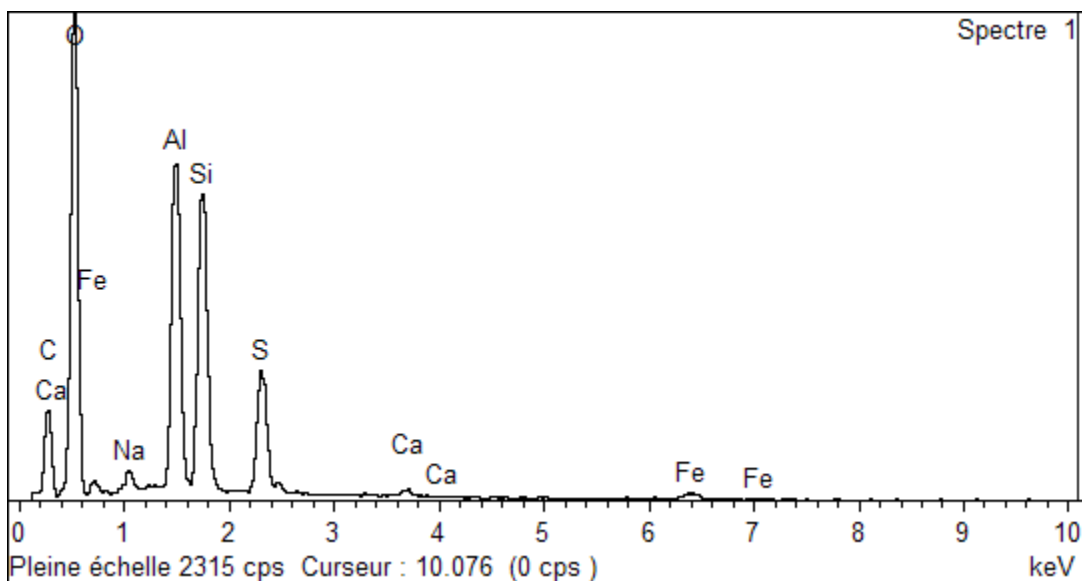


Figura 54. Espectro de EDS, análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente contendo 1,5 % em sais de ferro 2 meses após ser exposto ao H_2S .

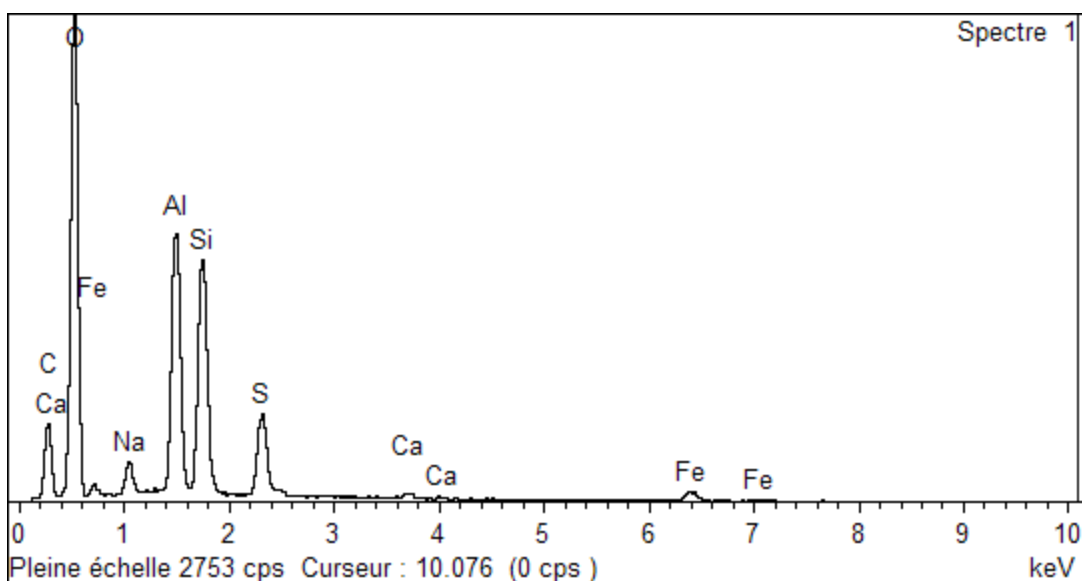


Figura 55. Espectro de EDS, análise quantitativa dos elementos presentes no sensor inteligente contendo 2,0 % em sais de ferro 2 meses após ser exposto ao H_2S .

Os resultados da análise realizadas no espectrômetro de raios-X por dispersão de energia, mostraram que mesmo após 2 meses sem contato com o gás H_2S aproximadamente 67,8% da concentração de enxofre determinada logo

após a exposição ao gás H_2S ainda estava retida na matriz de quitosana, Tabela 17. Apesar da alta concentração de enxofre na matriz do sensor inteligente o mesmo permanece funcional, ou seja, quando novamente exposto a uma fonte do gás H_2S o sensor fica negro indicando a presença do gás H_2S .

Tabela 17 - Análise quantitativa dos elementos antes e após a exposição ao gas H_2S .

Elemento	Papel cartão não recoberto		Papel cartão recoberto com quitosana		Antes da exposição ao gas H_2S		Após a exposição ao gas H_2S		10 dias após a exposição ao gas H_2S		2 meses Após a exposição ao gas H_2S	
	%Massica	%Atomica	%Massica	%Atomica	%Massica	%Atomica	%Massica	%Atomica	%Massica	%Atomica	%Massica	%Atomica
C K	23,75	32,92	30,98	39,37	21,67	29,64	24,20	35,02	18,47	26,31	20,89	29,94
N K			12,29	13,39	7,73	9,07			5,97	7,29		
O K	48,43	50,40	39,65	37,83	45,42	46,65	40,73	44,24	45,95	49,13	47,93	51,58
Na K					0,83	0,59	0,66	0,50	0,77	0,57	0,87	0,65
Al K	12,72	7,85	7,97	4,51	10,66	6,49	10,86	7,00	9,81	6,22	10,56	6,74
Si K	14,46	8,57	8,73	4,75	11,78	6,89	12,42	7,68	10,43	6,35	11,77	7,22
S K			0,10	0,05	0,16	0,08	8,79	4,77	6,35	3,39	5,96	3,2
Ca K	0,65	0,27	0,17	0,07	0,53	0,22	0,54	0,23	0,46	0,19	0,45	0,19
Fe K					1,22	0,36	1,80	0,56	1,79	0,55	1,57	0,48

Com o intuito de determinar-se qual composto químico apresentava-se ligado à matriz de quitosana foram realizadas análises de difração de raios-X.

4.5.2. Investigação do possível elemento ou composto químico ligado a matriz de quitosana.

As Figuras 56 – 60 representam os difratogramas de raios -X do sensor inteligente em todas as formulações inicialmente estudadas.

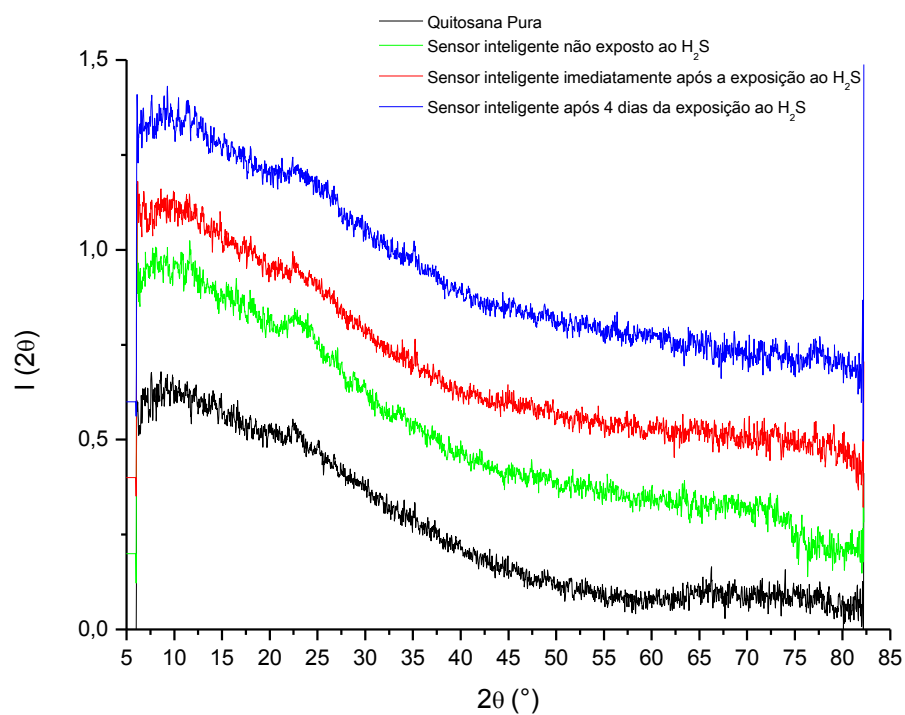


Figura 56. Difratoograma de raios-X do sensor inteligente contendo 0,2 % de sais de ferro.

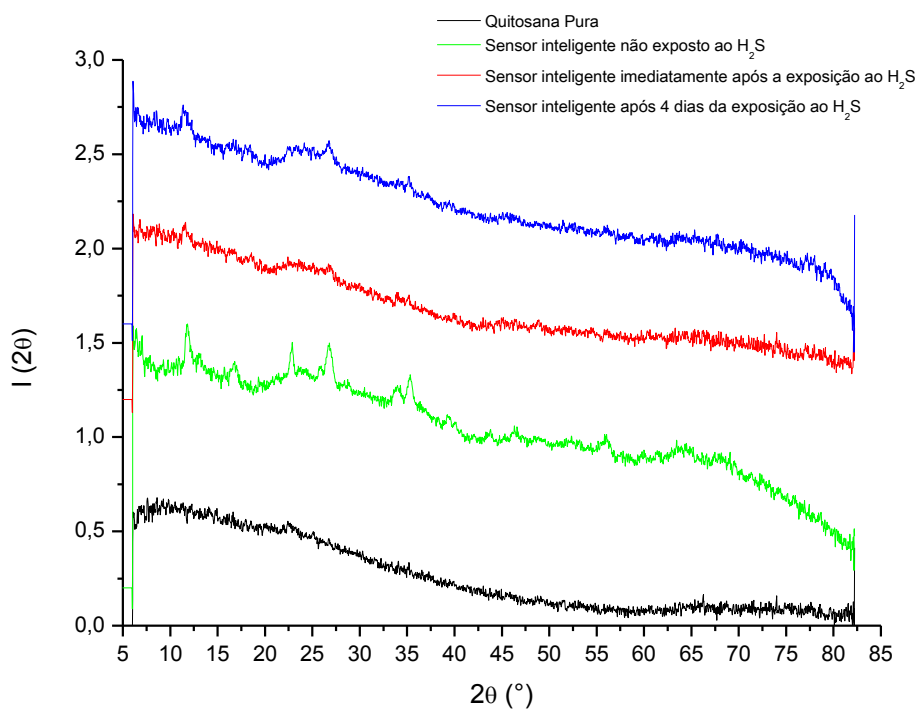


Figura 57. Difratoograma de raios-X do sensor inteligente contendo 0,6 % de sais de ferro.

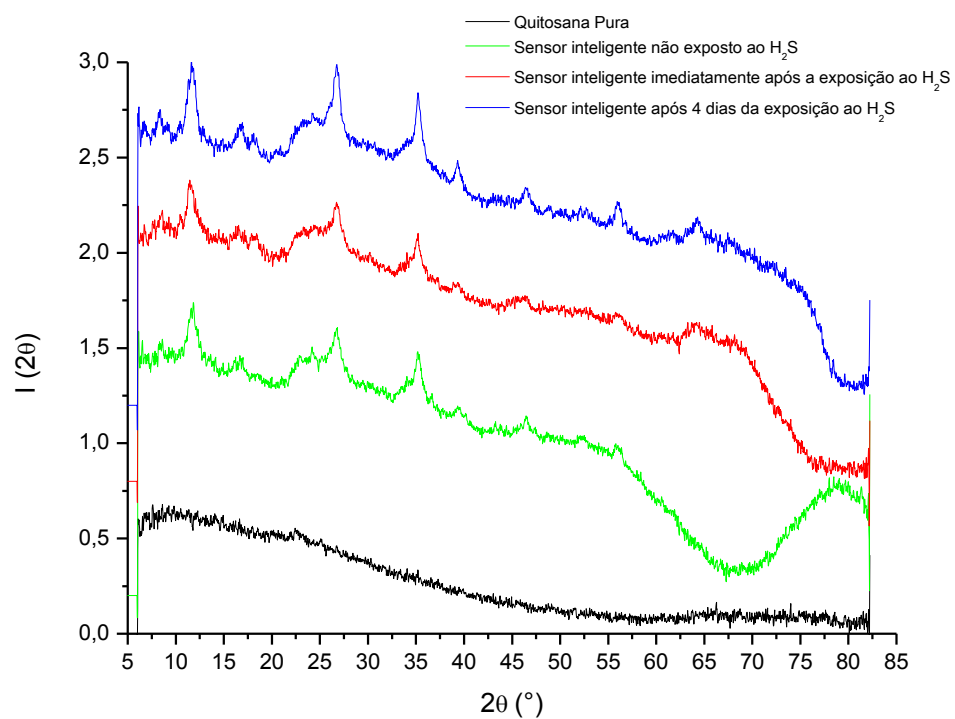


Figura 58. Difrátograma de raios-X do sensor inteligente contendo 1,0 % de sais de ferro.

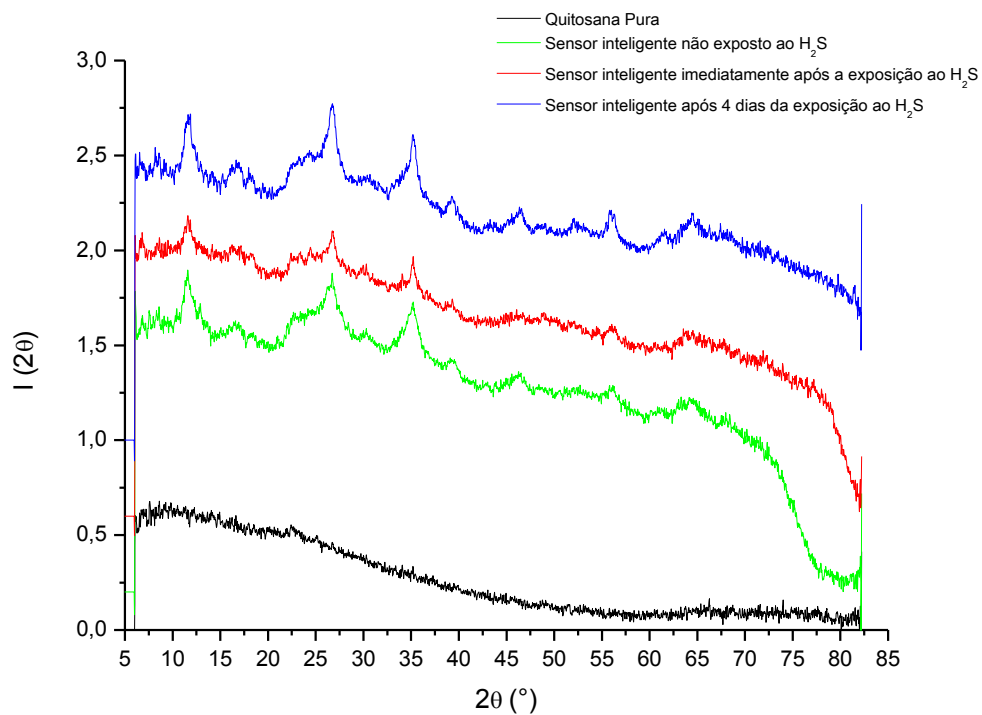


Figura 59. Difrátograma de raios-X do sensor inteligente contendo 1,5 % de sais de ferro.

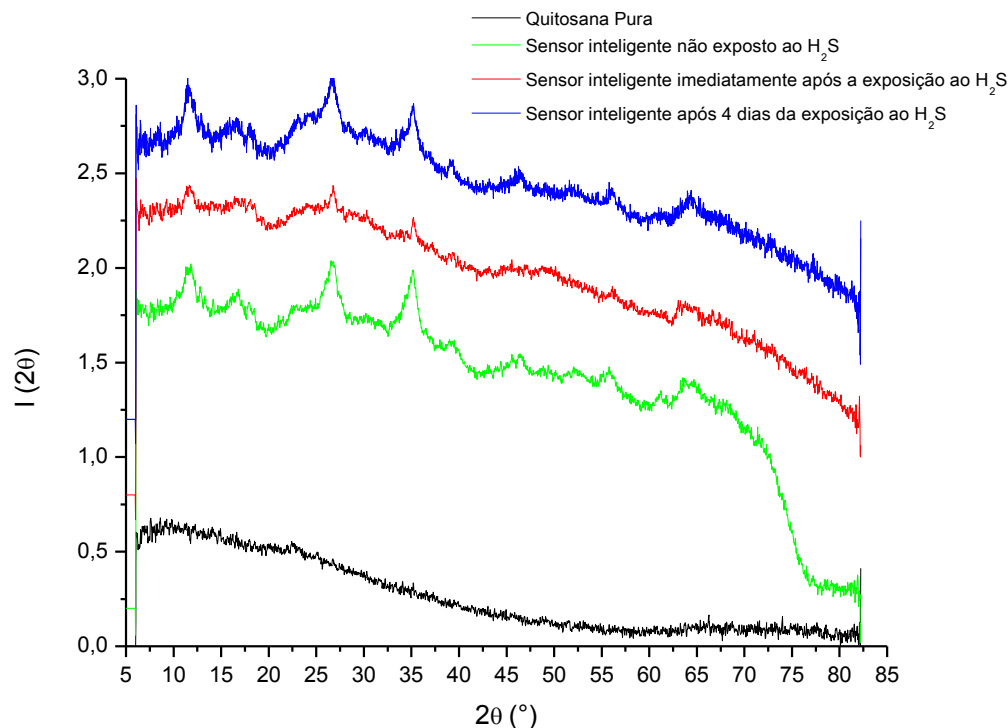


Figura 60. Difratoograma de raios-X do sensor inteligente contendo 2,0 % de sais de ferro.

Nas Figuras 56 – 60 é possível observar a presença constante e sistemática dos picos com valores de $d(\text{\AA})$: 7,47276; 5,30581; 3,33235; 2,54420; 1,95884 e 1,64430. Estes picos correspondem ao composto de ferro Akaganéite, $\beta\text{-FeO(OH)}$, os valores são correspondentes com o banco de dados da *Joint Committee for Powder Diffraction Standards* (JCPDS, 2011). Os picos agudos na região entre $2\theta = 33\text{--}85^\circ$ representam a região cristalina da quitosana. Os dois picos entre $2\theta = 9\text{--}13^\circ$ e $2\theta = 10\text{--}23^\circ$ vem da região amorfa da quitosana (Webster, Halling and Grant, 2007). Segundo Sugimoto e Muramatsu (1996) a $\beta\text{-FeO(OH)}$ é formada pelo processo de agregação desagregação das nanopartículas amorfas de Fe(OH)_3 nanoparticles. Yu et al. (2007) observaram a presença de interações da akaganéite com a quitosana na síntese de nanobarras ocas de $\beta\text{-FeO(OH)}$. Xu et al. (2012) também identificaram por RDX a presença de $\beta\text{-FeO(OH)}$ em seus estudos.

4.5.3. Análise termogravimétrica do sensor inteligente.

As análises térmicas foram realizadas para avaliar possíveis alterações químicas na matriz de quitosana.

As Figuras 61 – 65 representam os termogramas do sensor inteligente em todas as formulações inicialmente estudadas.

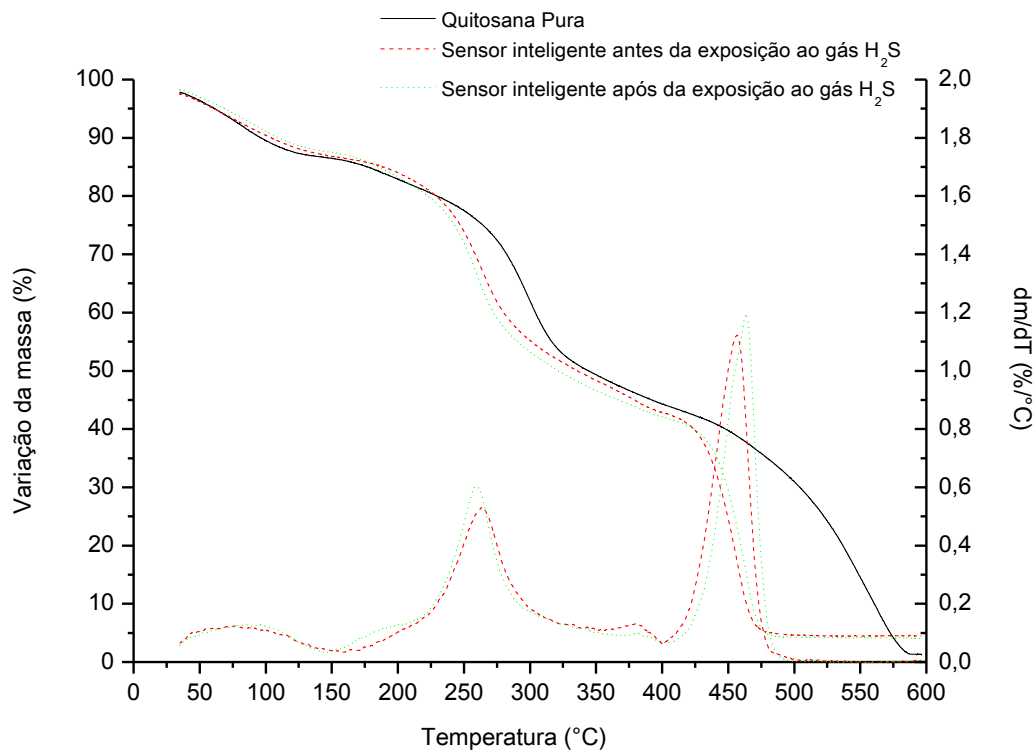


Figura 61. Termograma do sensor inteligente contendo 0,2 % de sais de ferro.

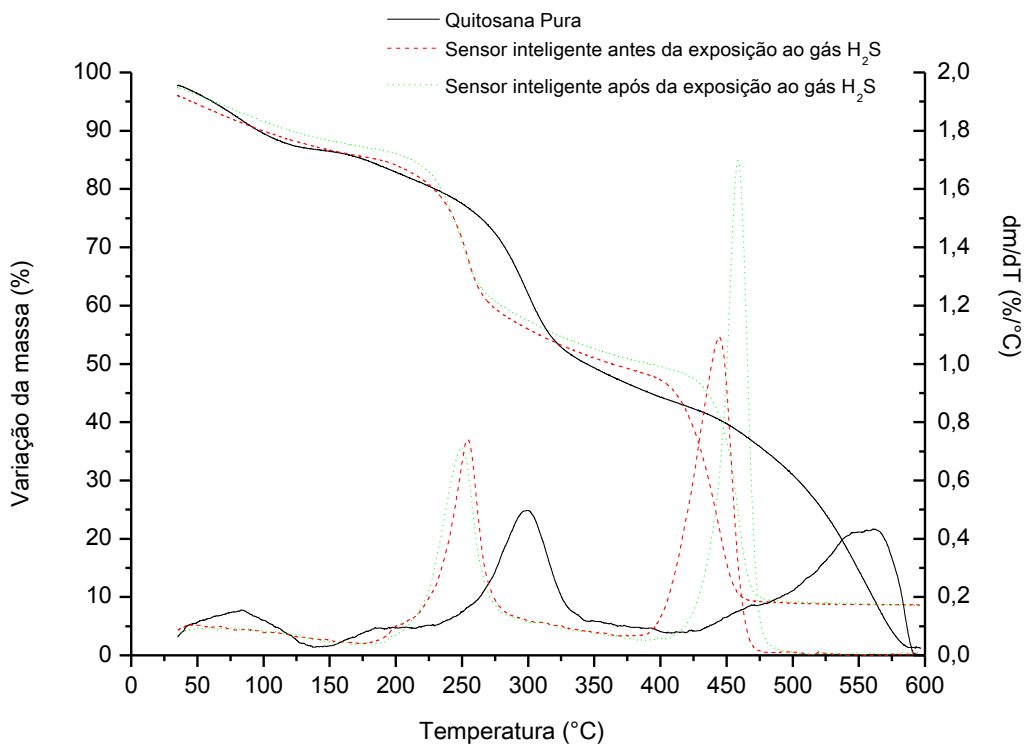


Figura 62. Termograma do sensor inteligente contendo 0,6 % de sais de ferro.

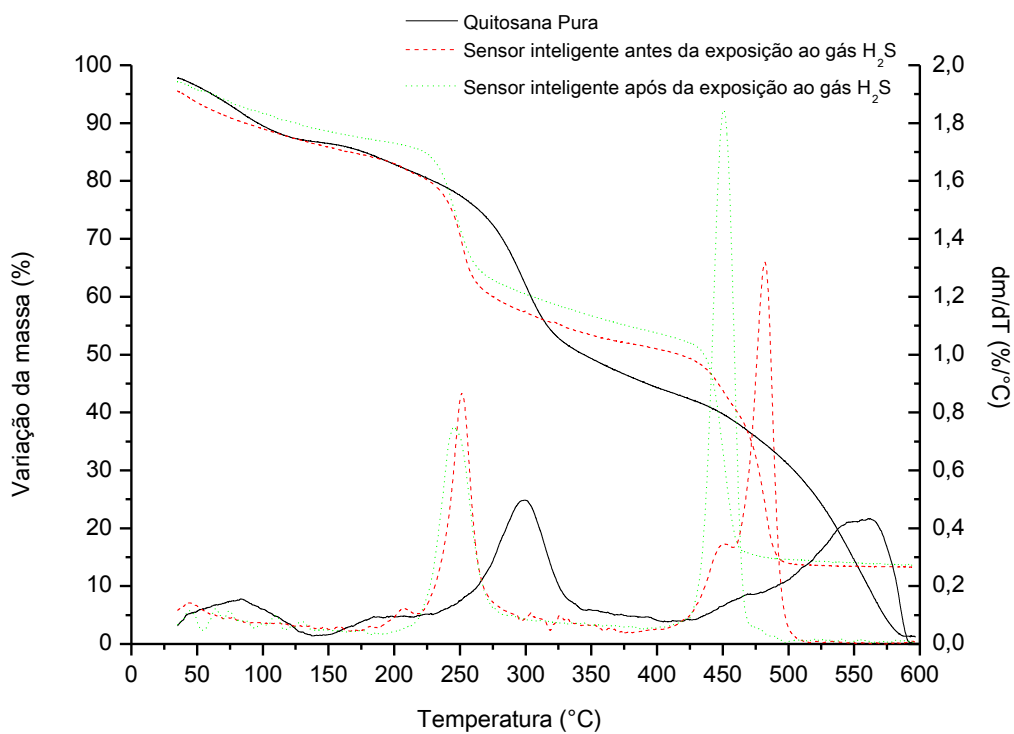


Figura 63. Termograma do sensor inteligente contendo 1,0 % de sais de ferro.

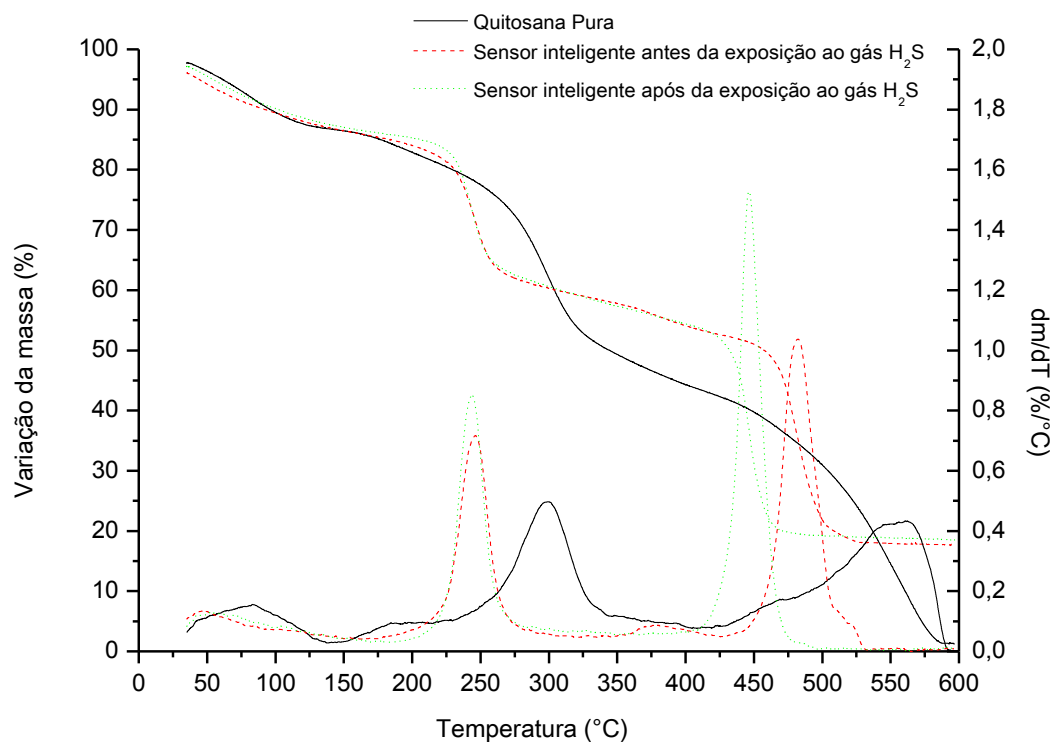


Figura 64. Termograma do sensor inteligente contendo 1,5 % de sais de ferro.

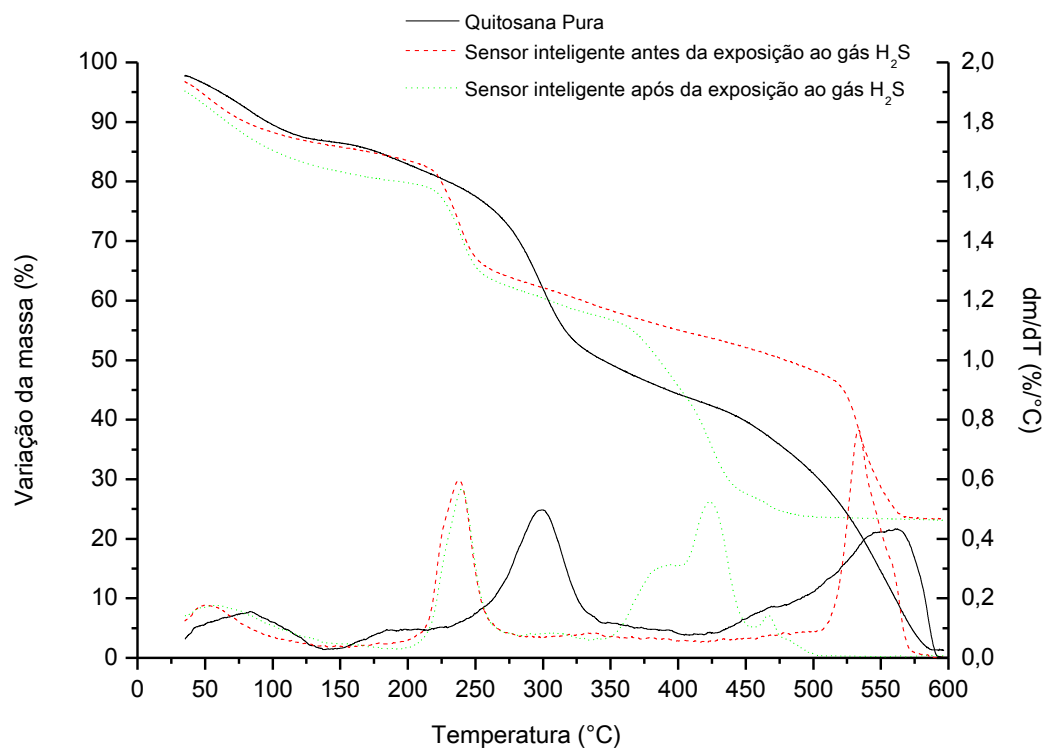


Figura 65. Termograma do sensor inteligente contendo 2,0 % de sais de ferro.

Analisando-se as Figuras 61 – 65 observa-se a que a presença de ferro e/ou compostos sulfúricos acarreta em uma diminuição significativa na temperatura de degradação da faixa de 500 °C – 600 °C para 400 °C – 500 °C. Krishnapriya e Kandaswamy (2010) observaram uma mudança similar na análise térmica em seu trabalho. Segundo Jabłońska-Pikus, *et al* (2000) estas diferenças nos termogramas da quitosana e do sensor inteligente pode ser resultado de modificações químicas possivelmente devido a diminuição do número de grupamentos amino.

Concluiu-se que o possível composto químico presente no sensor inteligente é a akaganeita (β -FeO(OH)) e que o mesmo está quimicamente ligado a matriz de quitosana. Os resultados resultaram no artigo intitulado “*A new H₂S intelligent sensor: synthesis and characterization*” em fase de submissão.

4.5.4. Trabalho em fase de submissão “*A new H₂S intelligent sensor: synthesis and characterization*”.

Resumo

O sensor inteligente é caracterizado pela mudança de cor de amarelo para preto quando em contato com gás H₂S. A indicação de cor é reversível. Um estudo de análise quantitativa mostrou que a matriz de quitosana mantém uma quantidade importante de compostos de enxofre (67,8%), após a primeira exposição. Os resultados de XRD apresentaram seis picos característicos para Akaganéita, β -FeO(OH). A análise termogravimétrica indicou uma diminuição significativa na temperatura de degradação de cerca de 500 °C para 400 °C indicando uma alteração química no composto.

A new H₂S intelligent sensor: synthesis and characterization

E.T. Kato Jr.¹, L. David⁴, E. Guibal³, C.M.P. Yoshida^{2*} and T.T. Franco¹

*¹ School of Chemical Engineering –State of University of Campinas, UNICAMP,
CEP13083-852, Campinas – SP, Brazil.*

*² Federal University of São Paulo-UNIFESP, Department of Exact and Earth Science, Av. Prof. Arthur Riedel, 275, CEP 09972-270, Diadema –
SP, Brazil.*

³ Centre des Matériaux des Mines d'Alès (C2MA-MPA-BCI), Ecole des Mines d'Alès, 6 avenue de Clavières, 30319 Alès cedex, France.

*⁴ Laboratoire des Matériaux Polymères et Biomatériaux, Université de Lyon, Université Lyon 1, UMR CNRS 5223 IMP, Bât. ISTIL, 15, bd
Latarjet, F-69622 Villeurbanne Cedex, France*

**e-mail address: cristiana.yoshida@unifesp.br*

Abstract

A biodegradable, fast, simple manufacturing and colorimetric intelligent sensor intelligent sensor was synthesized to detect the presence of hydrogen sulfide gas (H₂S). The composite material combines chitosan as a tridimensional biopolymer matrix and a non-toxic colorimetric indicator. The H₂S indicator system has application in different kind of industries (petrochemical, paper mills, food, etc). Chitosan is a very abundant natural biopolymer, which is discarded at tons by the fishing industry. Hydrogen sulfide (H₂S) is a flammable and colorless gas with a sweetish taste and characteristic odor of rotten eggs that can be poisonous at high concentrations (where it becomes odorless). Card paper sheets were coated with chitosan solution (3.0 %, w/w) containing the colorimetric indicator (1.5 %, w/w). The composite sensor changes its color from yellow to black while in contact with H₂S. The color change was reversible. A quantitative analysis study showed that the chitosan matrix keeps an important amount of sulfur compounds (67.8 % of the concentration) after the first exposure. Six characteristic peaks were detected on the XRD patterns of the composite material (d(Å) values: 7.47276; 5.30581; 3.33235; 2.54420; 1.95884 and 1.64430). These peaks are representative of Akaganéite, β-FeO(OH). The presence of iron and sulfur compounds promotes a significant decrease in degradation temperature from about 500 °C to 400 °C in thermogravimetric analysis.

Keywords: Chitosan, H₂S sensor, colorimetric, hydrogen sulfide gas.

Introduction

Hydrogen sulfide (H_2S ; CAS No. 7783-06-4) occurs naturally in crude petroleum, natural gas and hot springs. It is produced in large quantity in industrial activities such as petroleum/natural gas drilling and refining, wastewater treatment, coke ovens, tanneries, kraft paper mills, and landfills. H_2S gas is also produced naturally through non-specific and anaerobic bacterial reduction of sulfates and sulfur-containing organic compounds. Inhalation is the most common route of exogenous hydrogen sulfide exposure. Hydrogen sulfide is rapidly absorbed through the lungs in humans. It can also be absorbed through the gastrointestinal tract (ATSDR, 2006). According to Beauchamp et al. (1984) there have been numerous case reports of human deaths after single exposures to high concentrations ($\geq 700 \text{ mg/m}^3$) of hydrogen sulfide gas. Reiffenstein et al. (1992) reports that the typical “rotten-egg odor” of H_2S is an inadequate warning indicator of exposure since levels in the range of 100-200 ppm (140-280 mg/m^3) can lead to loss of smell by olfactory stress. The methods the most commonly used to measure H_2S gas include (a) the methylene blue colorimetric or spectrophotometric method, (b) the spot method using paper or tiles impregnated with lead acetate or mercuric chloride, (c) gas chromatography with flame photometric detection (GC/FPD), (d) gas chromatography with electrochemical detection (GC/ECD), (e) iodometric methods, (f) ion chromatography with conductivity, and (g) potentiometric titration with a sulfide ion-selective electrode (WHO, 2003; Hill, 1973; Pandey, Kim and Tang, 2012).

Chitosan is a linear polysaccharide, obtained by the deacetylation of chitin composed of β -(1-4) linked D-glucosamine and *N*-acetyl D-glucosamine residues, one of the most abundant polysaccharide in nature after cellulose. This polysaccharide has received considerable attention and has been studied as biomaterial for various applications, due to its bioactivity, to its bacteriostatic and fungistatic properties (Guibal, Vincent and Roussy, 2009; Serrero et al., 2010; Yoshida, Bastos and Franco, 2010; Kato et al., 2011; Morgado et al., 2011; Reis et al., 2011; Maciel et al., 2012). Chitosan was used as an encapsulating material for

depositing the sensor on a paper sheet. The exposure of the sensor to H₂S atmosphere leads to a change in color. In this work, we characterized a hydrogen sulfide (H₂S) indicator system to determine the way of interaction between the colorimetric indicator and the chitosan matrix.

This indicator system has wide application, since applications in control of leaks in the petrochemical industry (detecting the presence of H₂S in critical points: joints, valves, connections, etc., even in quality control of food products informing the consumer a potential microbiological changes in the product during transportation and storage (acting as a marker of product freshness).

MATERIALS and METHODS

Materials

Commercial chitosan used in this study was provided by Primex (Island), obtained from the exoskeleton of coldwater shrimps with a DA of 18 % and a molecular weight, Mw, of $2.38 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ (dn/dc of 0.135 mL.g^{-1}) and polydispersivity of 2.89. Glacial acetic acid (Synth – Brazil), iron(II) chloride (Sigma – Germany; 99 +%), ferrous sulfide (Synth – Brazil; 25 %), sodium carbonate (Synth – Brazil, 99 +%) and card paper (Triplex TP 250) (250 g.m^{-2} , Suzano Papel e Celulose, Brazil) were also used.

Methods

Chitosan sensor production

The methodology of film solution manufacturing was adapted from Yoshida *et al.* (2009). Chitosan (3.0%, w/w) was dispersed in aqueous acetic acid (the concentration was calculated according to the DA). The dispersions were homogenized by magnetic stirring at room temperature for 60 minutes until complete dissolution. After the FeCl₂ aqueous solution (1.5 % to final solution, w/w)

was added and the chitosan solution was supplemented to 100 g. The sheets of cardboard were coated with aliquots of 2.0 g of the chitosan film solutions according to the methodology described by Kato *et al.* (2011). Cardboard sheets (0.045 m²) were superficially pre-impregnated with 3 mL of sodium carbonate (Na₂CO₃) solution (4 %, w/w), prior to chitosan/ferrous solution coating.

Scanning electron microscopy with X-ray energy dispersive spectrometry (SEM-EDS)

SEM-EDS determinations were performed using a Quanta 200 FEG (FEI Company) operated at 15 kV and 0.60 torr equipped with backscattered electrons detector (BSE) and an X-ray energy dispersive spectrometer (INCA Energy 350 – Oxford Instruments). Samples of the colorimetric sensor (10x10 mm in size) were cut from the central part of paper sheet and mounted on SEM aluminum stubs using double-sided carbon tape. EDS spectra (working distance 10 mm) were collected for 50 s and the elemental composition obtained.

X-Ray Diffraction (XRD)

X-ray diffraction (XRD) was carried out with a Gemini Ultra system diffractometer (2.2 kW) with CuK α radiation λ = 0.154 nm), with a radial average of 360° azimuthal angles using a CCD detector. The data were treated with the software CrysAlis^{Pro}. The diffraction patterns were collected in the 2 θ angle range [5°-85°] at a scanning rate of 0.1°/min.

Thermogravimetric analysis (TGA)

The thermal stability and degradation profile of the intelligent sensor was measured by thermogravimetric analysis (TGA) using a TGA Q500 Thermogravimetric Analyzer (TA instruments). Intelligent sensor samples

(approximately 4 mg) were heated at a constant rate of 5 °C/min from 35 °C to 600 °C in a dynamic synthetic air in a rate of Helium 40 mL/min and air 60 mL/min.

Result and discussion

The intelligent sensor had a compact and cohesive structure without pores or cracks. When exposed to H₂S gas the sensor changes its color from yellow to black.

Scanning electron microscopy with X-ray energy dispersive spectrometer (SEM-EDS)

The distribution of the adsorbed specie Fe³⁺ in the chitosan matrix was evaluated by a SEM-EDS analysis, Figure 1 shows (a) a SEM image and (b) a BSE image of the H₂S indicator system.

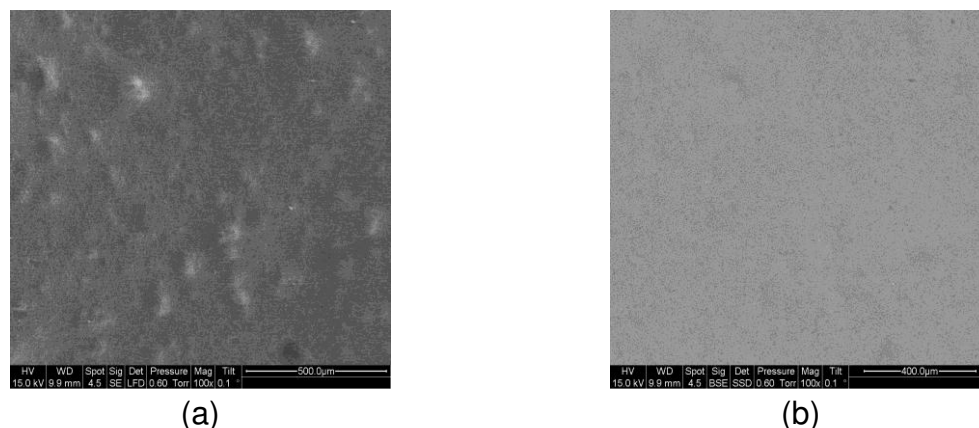


Figure 1 – SEM image of the H₂S indicator system, (a) SEM image and (b) BSE image.

The phase image (BSE, Figure 1b) shows the homogeneous distribution of Fe element indeed, high concentrations of Fe element that should appear as white spots (representative of Fe³⁺ aggregates/precipitates) were not detected.

The intelligent sensor was characterized by the reversibility of color change, after a short period of absence of the H₂S gas: the H₂S indicator system turned back to its original color (yellow). A quantitative analysis was performed to

evaluate the presence of sulfur compounds. The quantitative analysis (by EDS) after 2 months of no contact with the H₂S gas is presented in Figure 2. After the H₂S indicator system turned back to its original color (yellow), almost 67.8 % of the sulfur concentration that was detected after the first exposure to the gas remains in the chitosan matrix (Table 1), even with this high concentration of sulfur content in the H₂S indicator system, it remains functional, i.e. once exposed to a H₂S gas source it becomes black again, indicating the H₂S gas presence.

Table 1. Quantitative results of EDS analysis from the intelligent sensor.

Element	Card paper		Card paper covered with chitosan		Before exposure to H ₂ S gas		After exposure to H ₂ S gas		10 days after exposure to H ₂ S gas		2 months after exposure to H ₂ S gas	
	%Mass	%Atomic	%Mass	%Atomic	%Mass	%Atomic	%Mass	%Atomic	%Mass	%Atomic	%Mass	%Atomic
CK	23,75	32,92	30,98	39,37	21,67	29,64	24,20	35,02	18,47	26,31	20,89	29,94
NK			12,29	13,39	7,73	9,07			5,97	7,29		
OK	48,43	50,40	39,65	37,83	45,42	46,65	40,73	44,24	45,95	49,13	47,93	51,58
NaK					0,83	0,59	0,66	0,50	0,77	0,57	0,87	0,65
AlK	12,72	7,85	7,97	4,51	10,66	6,49	10,86	7,00	9,81	6,22	10,56	6,74
SiK	14,46	8,57	8,73	4,75	11,78	6,89	12,42	7,68	10,43	6,35	11,77	7,22
SK			0,10	0,05	0,16	0,08	8,79	4,77	6,35	3,39	5,96	3,2
CaK	0,65	0,27	0,17	0,07	0,53	0,22	0,54	0,23	0,46	0,19	0,45	0,19
FeK					1,22	0,36	1,80	0,56	1,79	0,55	1,57	0,48

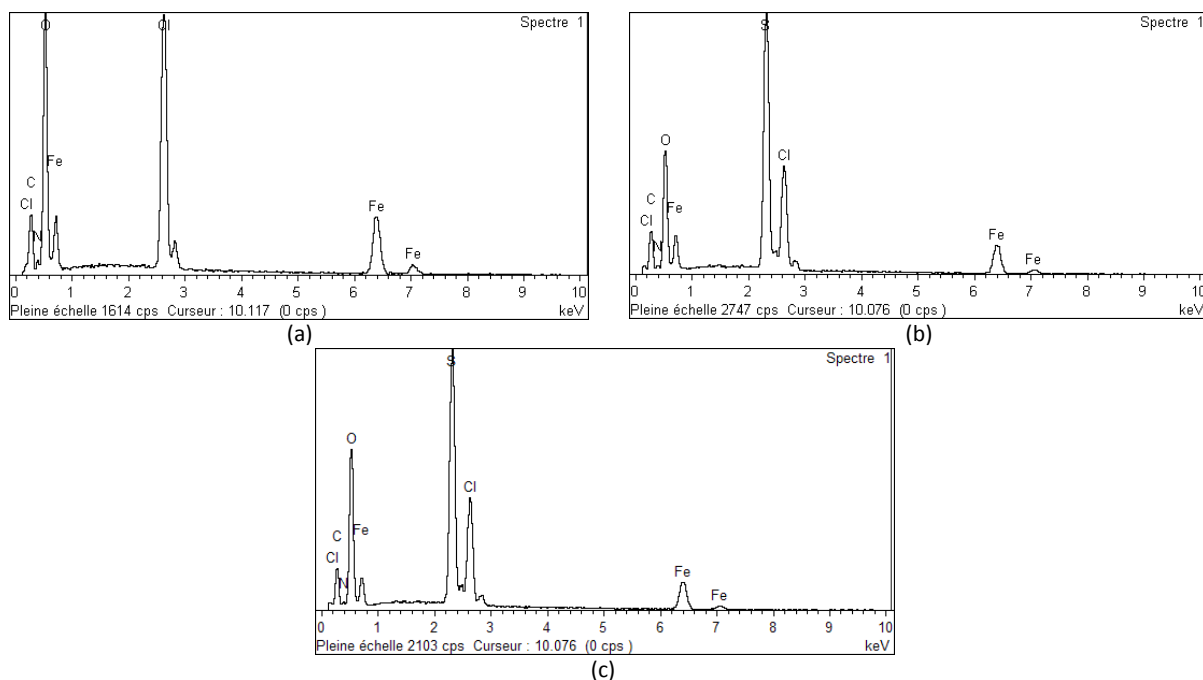


Figure 2. EDS spectra of intelligent sensor: (a) Intelligent sensor before first exposure to H₂S gas; (b) Intelligent sensor after first exposure to H₂S gas and (c) Intelligent sensor with no contact with the H₂S gas after two months of the first exposure to H₂S gas.

X-Ray Diffraction

The XRD analysis was performed to characterize the interactions of chitosan matrix with the iron compounds and/or to identify the presence of specific compounds in the sensor.

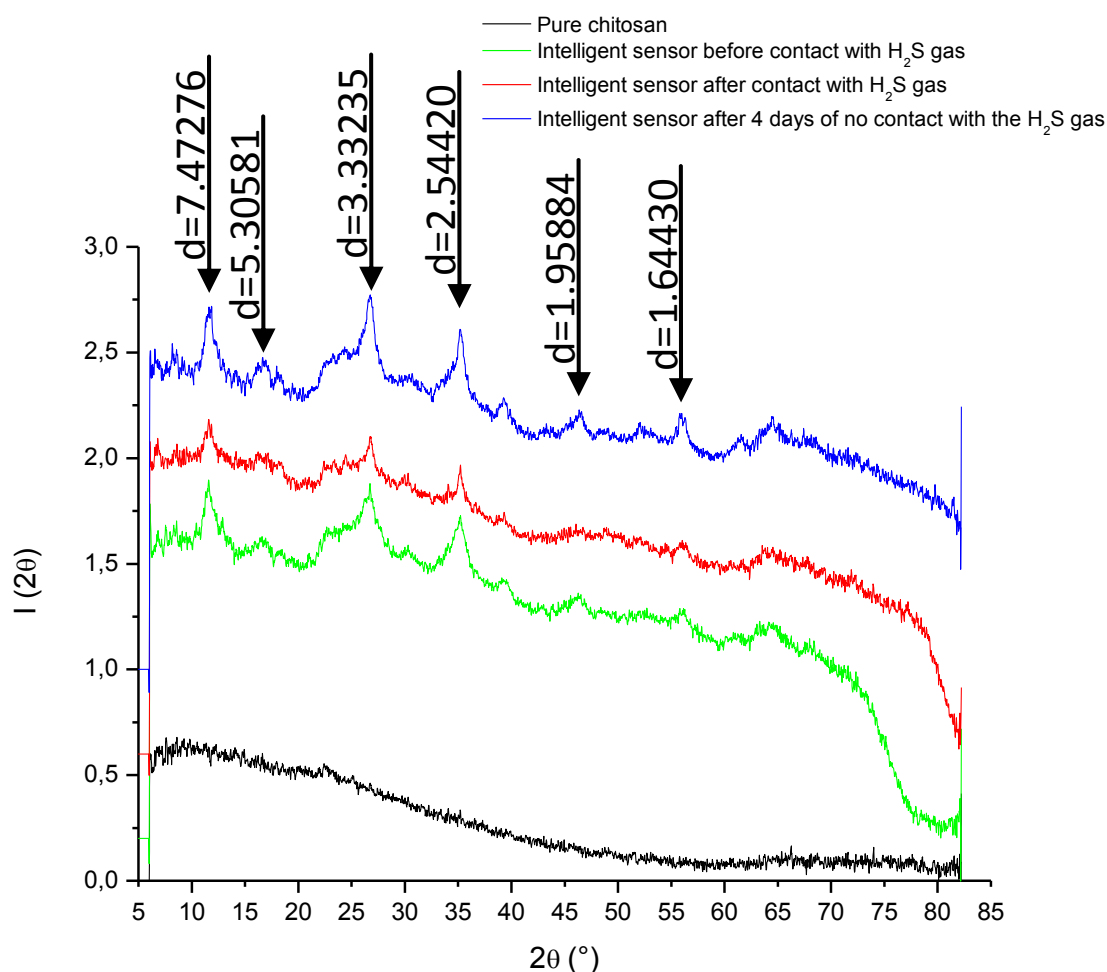


Figure 3. XRD patterns of intelligent sensor.

Figure 3 shows the XRD patterns for the intelligent sensor. Six characteristic peaks were systematically detected at $d(\text{\AA})$ values: 7.47276; 5.30581; 3.33235; 2.54420; 1.95884 and 1.64430. These peaks correspond to the mineral iron form Akaganéite, $\beta\text{-FeO}(\text{OH})$; they are consistent with the database in

JCPDS file (2011). The sharp peaks at the larger scanned angles from $2\theta = 33\text{--}85^\circ$ represent a crystalline region in chitosan. The two broad peaks in the ranges of $2\theta = 9\text{--}13^\circ$ and $2\theta = 10\text{--}23^\circ$ come from the amorphous regions (Webster, Halling and Grant, 2007). According to Sugimoto and Muramatsu (1996) the $\beta\text{-FeO(OH)}$ are formed by an aggregation-dehydration process of amorphous Fe(OH)_3 nanoparticles. Yu et al. (2007) observed the presence of akaganéite interactions with chitosan in the synthesis of hollow $\beta\text{-FeO(OH)}$ nanorods. Xu et al. (2012) also identified by XRD the phase of the iron as $\beta\text{-FeO(OH)}$ in their study on Cr(VI) sorption on iron-coated sand.

Thermogravimetric analysis (TGA)

The TGA analysis can infer if the interaction between the iron compound and the chitosan matrix is chemical or just physical.

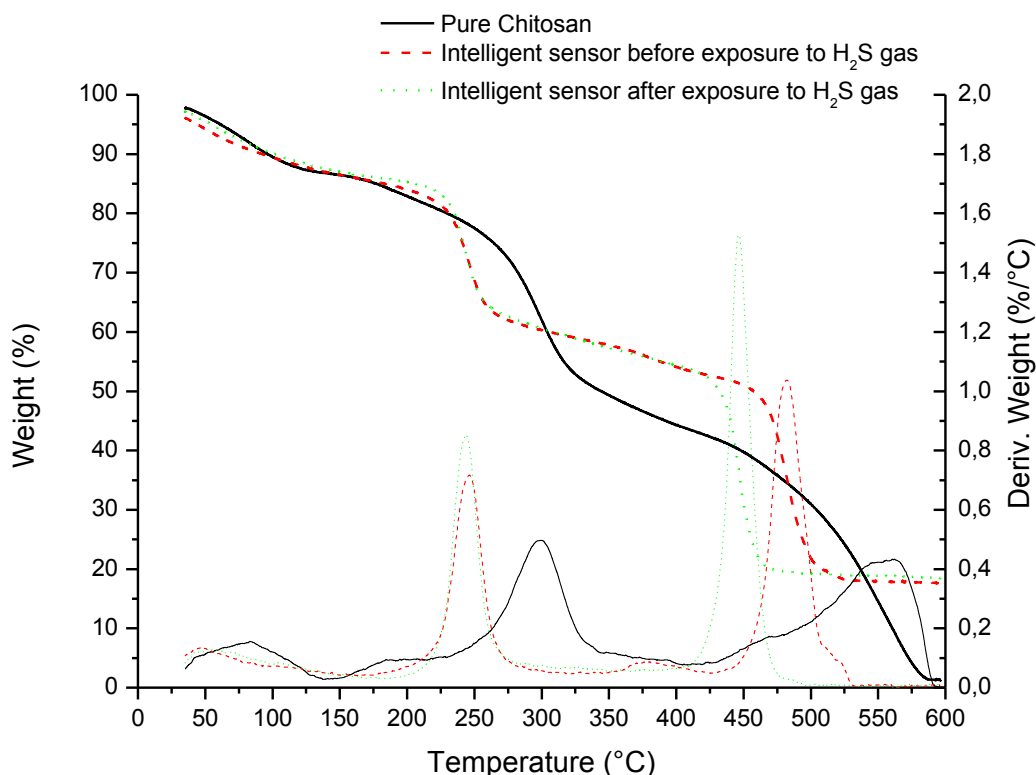


Figure 4. TGA curves of intelligent sensor.

The TGA curve (Fig.4) shows that the weight loss over the temperature range from 35 to 150°C is about 12 % for pure chitosan and about 10 % for the intelligent sensor in the temperature range 35-80 °C, this first loss is due to loss of water. In the temperature range from 150 to 350 °C the weight loss for pure chitosan is about 45 %, in the temperature range from 80 to 300°C the weight loss to the intelligent sensor after the exposure to the H₂S gas is about 37 % and in the same range the weight loss to the intelligent sensor before the exposure to H₂S gas 35 %. This might be due to the loss of residual water in the sample and the difference between the intelligent sensor before and after the exposure to the H₂S gas is due to the incorporation of sulfur compounds in the chitosan matrix after exposure to the H₂S gas. When the temperature was raised higher than 400°C, the weight loss is significant because chitosan was degraded. It is possible to observe that the presence of iron and sulfur compounds promotes a significant decrease in degradation temperature from about 500°C to 400°C. Krishnapriya and Kandaswamy (2010) found a similar change in the thermal analysis in their work. According to Jabłońska-Pikus, *et al* (2000) these differences in thermograms of chitosan and the intelligent sensor may be caused by chemical modifications probably due to the decrease in the number of primary amino groups.

Conclusion

In the present investigation a new intelligent sensor to detect the presence of H₂S gas was successfully prepared and the interactions between iron compounds and the chitosan matrix were evaluated. The SEM-EDS analysis shows that the specie Fe³⁺ in the chitosan matrix is homogeneously distributed with no signs of iron concentration areas. The color reaction is reversible, i.e. in the absence of H₂S gas the intelligent sensor turns back to its original colour. Once exposed to the H₂S gas, when the intelligent sensor is not in contact with the gas it turns back to its original color even with almost 67.8% of the concentration of sulfur content was detected after the first exposure to the gas remains in the chitosan matrix. The XRD denoted that all the diffraction peaks can be indexed as β-

FeOOH. By the ATG we can infer that the intelligent sensor compared to the chitosan is more unstable may be due to the decrease in the number of primary amino groups after chemical modification process.

Acknowledgements

This work was financially supported by FAPESP, CNPq and CAPES. The authors thank Primex for providing chitosan, Jean-Marie Taulemesse (from Centre des Matériaux des Mines d'Alès) for SEM-EDX analysis and Ruben Vera (from the *Centre de diffractometrie Henri Longchambon, Université Claude Bernard Lyon1*) for de XRD analysis.

References

JCPDS: International Centre for Diffraction Data, Newtown Square (2011).

Webster, A.; Halling, M.D. and Grant, D.M., 2007. Metal complexation of chitosan and its glutaraldehyde cross-linked derivative. *Carbohydrate Research*; 342, 1189-1201.

Krishnapriya, K. R. and Kandaswamy, M., 2010. A new chitosan biopolymer derivative as metal-complexing agent: synthesis, characterization, and metal(II) ion adsorption studies. *Carbohydrate Research*; 345, 2013–2022.

Yu, H.; Song, X.; Yin, Z.; Fan, W.; Tan, X.; Fan, C. and Sun, S., 2007. Synthesis of single-crystalline hollow β -FeOOH nanorods via a controlled incomplete-reaction course. *Journal of Nanoparticle Research*; 9, 301-308.

Sugimoto, T. and Muramatsu, A., 1996. Formation mechanism of monodispersed α -Fe₂O₃ particles in dilute FeCl₃ solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*; 184, 626–638.

Xu, C.; Cheng, D.; Gao, B.; Yin, Z.; Yue, Q. and Zhao, X., 2012. Preparation and characterization of β -FeOOH-coated sand and its adsorption of Cr(VI) from

aqueous solutions. *Frontiers of Environmental Science and Engineering in China*; 6(4), 455-462.

ATSDR, 2006. Toxicological profile for hydrogen sulfide. Atlanta, GA, US Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

Beauchamp, R.O. Jr.; Bus, J.S.; Popp, J.A.; Boreiko, C.J. and Andjelkovich, D.A., 1984. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 13:25–97.

Hill, F.B., 1973. Atmospheric sulfur and its links to the biota. *Brookhaven Symposia in Biology*; 30, 159-181.

Kato Junior, E.T.; Yoshida, C.M.P.; Reis, A.B.; Melo I.S. and Franco, T.T., 2011. Fast detection of H₂S using a biodegradable colorimetric indicator system, *Polymer International*, v.60, Issue 6. (Article first published online : 2 MAY 2011, DOI: 10.1002/pi.3095).

Maciel, V.B.V.; Yoshida, C.M.P.; Franco, T.T., 2012. Development of a prototype of a colourimetric temperature indicator for monitoring food quality. *Journal of Food Engineering*, 11, 21-27.

Morgado, D. L.; Frollini, E.; Castellan, A.; Rosa, D. S. and Coma, V., 2011. Biobased films prepared from NaOH/thiourea aqueous solution of chitosan and linter cellulose. *Cellulose*; 18, 699–712.

Pandey, S.D.; Kim, K.-H. and Tang, K.-T., 2012. A review of sensor-based methods for monitoring hydrogen sulfide. *Trends in Analytical Chemistry*; 32, 87-99.

Reiffenstein, R.J.; Hulbert, W.C.; Roth, S.H., 1992. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual Review of Pharmacology*, 109-134.

Reis, A.B.; Yoshida, C.M.P.; Reis, A.P.C. and Franco, T.T., 2011. Application of chitosan emulsion as a coating on Kraft paper. *Polymer International*; 60 (6), 963-969.

Serrero, A.; Trombotto, S.; Cassagnau, P.; Bayon, Y.; Gravagna, P.; Montanari, S. and David, L., 2010. Polysaccharide Gels Based on Chitosan and Modified Starch: Structural Characterization and Linear Viscoelastic Behavior. *Biomacromolecules*; 11, 1534–1543.

WHO, 2003. Hydrogen sulfide: human health aspects. In: *Concise International Chemical Assessment Document 53*. Geneva, World Health Organization Regional Publications, European Series.

Yoshida, C.M.P.; Bastos, C.E.N.; Franco, T.T., 2010. Modeling of potassium sorbate diffusion through chitosan films. *Food Science and Technology: LWT*; 43 (4), 584-589.

Yoshida, C.M.P.; Oliveira-Junior, E.N.; Franco, T.T., 2009. Chitosan Tailor-Made Films: the effects of additives on barrier and mechanical properties. *Packaging Science and Technology*, 22, 161-170.

Jabłońska-Pikus, T.; Charmas, W. and Gawdzik, B., 2000. Synthesis and Characterization of Methacrylate Polymeric Packings Based on Bisphenol-S. *Journal of Applied Polymer Science*; 75, 142–148.

CAPITULO 5

CONCLUSÕES

Sensores inteligentes foram produzidos na forma de filme (Fm-Fe) e como cobertura (CH-Fe), e optou-se por trabalhar apenas com o CH-Fe devido a não formação da matriz filmogênica das suspensões com elevadas concentrações do indicador colorimétrico e principalmente devido ao elevado tempo de secagem na produção de filmes. O tempo de secagem para a obtenção do sensor quitosana/mioglobina (Fm-Mg) era aproximadamente 48 h, e com a aplicação da suspensão quitosana/ FeSO_4 (CH-Fe) como revestimento na superfície de papel cartão, em 90 s.

A homogeneidade da distribuição dos íons metálicos (Fe^{3+}) na matriz de quitosana foi verificada.

O sensor CH-Fe foi otimizado por planejamento experimental 2^3 onde se determinou a melhor formulação contendo 1,5% (em massa) em sais de ferro (indicador colorimétrico), aplicando como revestimento de $1,13 \text{ g.m}^{-2}$ (espessura calculada) em papel cartão.

O sensor inteligente CH-Fe apresentou aumento na rigidez em comparação com o papel cartão não revestido. As propriedades de tensão não apresentaram alteração significativa quando comparadas ao papel cartão não revestido. O aumento da capacidade de absorção de água comparada ao papel cartão não revestido foi associada a hidrofiliabilidade da matriz polimérica. Os sensores podem ser produzidos com a tecnologia já existente nas indústrias de papel.

O sensor inteligente CH-Fe mostrou uma rápida resposta à presença do gás H_2S , 30 segundos na concentração analisada, além da simplicidade de sua interpretação, ou seja, com uma simples explicação de que a mudança na coloração de amarelo para preto indica a presença do gás H_2S quase a totalidade da população pode compreender a informação transmitida.

A mioglobina foi extraída e quantificada por espectrofotometria UV/VIS. A uma concentração de 1,5% (m/m) do extrato de mioglobina o sensor inteligente

Fm-Mg não apresentou a formação da matriz tridimensional quitosana/extrato de mioglobina homogênea, o que pode estar associado às altas concentrações de sais do extrato. Os sensores inteligentes Fm-Mg e CH-Mg não apresentaram uma resposta colorimétrica perceptível visualmente, possivelmente devido à pequena quantidade de mioglobina no extrato.

Análises em espectrômetros, infravermelho com transformada de Fourier, difração de raios-X (SAXS e WAXS) e termogravimétricas (TGA) foram realizadas e os resultados mostram que o composto químico presente no sensor é possivelmente a akaganeita, β -FeO(OH), os resultados da análise térmica permitem inferir uma certa instabilidade do sensor inteligente quando comparado à quitosana podendo ser resultado de possíveis alterações químicas.

O sensor inteligente CH-Fe mostrou-se uma importante ferramenta no controle da qualidade microbiológica em carnes embaladas a vácuo.

CAPITULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed, J. and Varshney, S.K., Polylactides—Chemistry, Properties and Green Packaging Technology: A review. *International Journal of Food Properties*, 14: p. 37–58, 2011.

Allan, G.G., Carroll, J. P., Hirabayashi, Y., Muvundamina, M., & Winterown, J. G. (1989). Chitosan-coated fibers Advances in chitin and chitosan, Proceedings of international conference, fourth (pp. 765–769).

ANVISA, *Bula para o profissional de saúde*. Em: <http://www.anvisa.gov.br/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=2898142013&pIdAnexo=1571414>. Acesso em: 26 de outubro de 2013.

AOAC. 1990. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15th edition. Washington, DC, Association of Official Analytical Chemists.

Arnaut-Rollier, I., Zutter, L., & van Hoof, L. (1999). Identities of *Pseudomonas* spp. in flora from chilled chicken. *International Journal of Food Microbiology*, 48, 87 –96.

Arnon, S.S.; Midura, T.F.; Clay, S.A.; Wood, R.M. and Chin, J. (1977) Infant botulism: epidemiological, clinical and laboratory aspects. *JAMA* 237: 1946–1951.

ASTM. Resistance to Bending of Paper and Paperboard (Taber-Type Tester in Basic Configuration). Annual Book of ASTM Standards. American Society for Testing and Materials, Atlanta, D5342 (1993)

ASTM. Tensile Properties of Paper and Paperboard Using Constant-Rate-of-Elongation Apparatus. Annual Book of ASTM Standards. American Society for Testing and Materials, Atlanta, D828 (1997)

Balbi, A. Vazamento de gás mata dois operários em Campos, Rio de Janeiro: O Globo, 26/01/2001.

Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: EDUNICAMP, 2001.

Broda, D.M., DeLacy, K.M., Bell, R.G., Braggins, T.J., Cook, R.L. Psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with 'blown pack' spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. International Journal of Food Microbiology 29, 335-352, 1996

Butler, B.L.; Vergano, P.J.; Testin, R.F.; Bunn, J.M.; Wiles, J.L. Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage. Journal of Food Science, v.61, n.5, p.953-955, 1996.

Butler, P. The whole package. Materials Today, v.9, n.4, p.64, 2006.

Campos, S. Gás Sulfídrico (H₂S), in press: 31 de agosto de 2003. Disponível em: <<http://www.drashirleydecampos.com.br/noticias/5758>>. Acesso em: 23 de setembro de 2008.

Canella, K.M.N.C.; Garcia, R.B.; "Caracterização de Quitosana por Cromatografia de Permeação em Gel – Influência do Método de Preparação e do Solvente", Química Nova, 24(1), pp.13-17, 2001.

Carvalho, R.A.; Grosso; C.R.F. Properties of chemically modified gelatin films. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v.23, n.1, p.45-53, 2006.

Catalina, M.; Attenburrow, G. E.; Cot, J.; Covington, A. D. and Antunes, A. P. M., Influence of Crosslinkers and Crosslinking Method on the Properties of Gelatin Films Extracted from Leather Solid Waste. Journal of Applied Polymer Science, Vol. 119, p. 2105–2111, 2011.

Chambi, H. and Grosso, C., Effect of surfactants on the functional properties of gelatin–polysaccharide-based films. *Eur. Food Res. Technol.* 232:63–69, 2011.

Coma, V.; Martial-Gros, A.; Garreau, S.; Copinet, A.; Salin, F. and Deschamps, A. Edible Antimicrobial Films Based on Chitosan Matrix. *Journal of Food Science—* Vol. 67, Nr. 3, p. 1162-1169, 2002.

Dainty, R.H. (1996). Chemical/biochemical detection of spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 19 –33.

Ding, Y.; Xia, X. H.; Nanosci, J. *Nanotechnol.* 2006, 6, 1101–1106.

Dodane, V.; Khan, M.A; Merwin, J.R. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *International Journal of Pharmaceutics*, v.182, n.1, p.21-32, 1999.

Dosi, R., Di Maro, A., Chambery, A., Colonna, G., Costantini, S., Geraci, G. and Parente, A., Characterization and kinetics studies of water buffalo (*Bubalus bubalis*) myoglobin. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 145: 230–238, 2006.

Fellows, P. *Food processing technology: Principles and practice*. London: Ellis Horwood, 1988. 505p.

Fornari, A.K. Viabilidade de elaboração de etiqueta polimérica inteligente para acompanhamento de processos de acidificação: aplicação ao repolho fermentado. Florianópolis, 2006, 122 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Disponível em: <<http://150.162.90.250/teses/PEAL0061.pdf>>. Acesso em: 30 ago. 2006.

Fortuna, J.L.; Franco, R.M. Uma revisão sobre o *Clostridium perfringers* como agente etiológico de doenças transmitidas por alimentos (D.T.A.). *Rev Hig Alimentar* 19: 48-54, 2005.

Gällstedt, M.; Hedenqvist, M.S. Packaging-related mechanical and barrier properties of pulp–fiber–chitosan sheets. *Carbohydrate Polymers* 63 (2006) 46–53

Geileskey, A.; King, R.D.; Corte, D.; Pinto, P. and Ledward, D.A. The Kinetics of Cooked Meat Haemoprotein Formation in Meat and Model Systems. *Meat Science*, Vol. 48, No. 3/4, 189-199, 1998.

Gennadios, A.; Weller, C.L. Edible films and coatings from soymilk and soy protein. *CFW Cereal Food World Review*, v.36, n.12, p.1004-1009, 1991.

Ghanbarzadeh, B.; Almasi, H. and Entezami, A.A., Improving the barrier and mechanical properties of corn starch-based edible films: Effect of citric acid and carboxymethyl cellulose. *Industrial Crops and Products*, 33: p. 229-235, 2011.

Goodman, L. S. & Gilman, G. A. *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Dois, 1195p, 1987.

Govindarajan, S., Fresh Meat Colour. *CRC Critical Reviews in Food Technology*, 3, 117-140, 1973.

Guibal, E. - *Sep. Purif. Techn.*, 38, p.43-74, 2004.

Hayes, P. R. *Microbiologia e higiene de los alimentos*. Zaragoza : Acribia, 1993. 369p

Helander, I. M.; Nurmiäho-Lassila, E. L.; Ahvenainen, R.; Rhoades, J. & Roller, S. - *Int. J. Food Microbiol.*, 30, p.235-44 (2001).

Hirai, A; Odani, H.; Nakajima, A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H-NMR spectroscopy *Polymer Bulletin*, v.26, n.1, p.87-94, 1991.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS (ICMSF) . *Microbial Ecology of foods. Factors Affecting Life and Death of Microorganisms* . Vol. 1. New York, 1980.

Jowitt, R.; Escher, F.; Hallstom, B.; MEFFERT, H. F. T.; SPIESS, W. E. L. e VOS, G. *Physical properties of foods*. Applied Science Publishers, London and New York, 1983.

Kamel, S.; El-Sakhawy, M.; Nada, A.M.A. Mechanical properties of the paper sheets treated with different polymers, *Thermochimica Acta*. V.421, p.81-85, 2004.

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

Kibirkštis, E.; Kabelkaitė, A. Research of paper/paperboard mechanical characteristics. *Mechanika*. Nr.3(59), p. 34-41, 2006.

Klepka, M.T.; Nedelko, N.; Greneche, J.M.; Lawniczak-Jablonska, K.; Demchenko, I. N.; Slawska-Waniewska, A.; Rodrigues, C. A.; Debrassi, A.; Bordini, C. *Biomacromolecules* 2008, 9, 1586–1594.

Kruijf, N. Van Beest, M., Rijk, R., Sipiläinen-Malm, T., Losadas, P. P., Meulenaer, B. Active and intelligent packaging: applications and regulatory aspects. *Food Additives and Contaminants*, 19: 144-162, 2002.

Lee, C.H.; An, D.S.; Park, H.J. and Lee, D.S. Wide-spectrum Antimicrobial Packaging Materials Incorporating Nisin and Chitosan in the Coating. *Packag. Technol. Sci.* 2003; 16: 99–106.

Lee, N. Y., Jung, Y. K., & Park, H. G. On-chip colorimetric biosensor based on polydiacetylene (PDA) embedded in photopolymerized poly(ethylene glycol) diacrylate (PEG-DA) hydrogel. *Biochemical Engineering Journal*, 29(1–2), p. 103–108, 2006.

Li, H., Du, Y., & Xu, Y. (2004). Adsorption and complexation of chitosan wet-end additives in papermaking systems. *Journal of Applied Polymer Science*, 91, 2642–2648.

Mainier, F. B.; Rocha, A. A. H₂S: Novas Rotas de Remoção Química e Recuperação de Enxofre. In: 2º Congresso Brasileiro P & D em Petróleo & Gás,

2003, Rio de Janeiro. 2º Congresso Brasileiro P & D em Petróleo & Gás. Rio de Janeiro : UFRJ, 2003.

Makino, Y., & Hirata, T. (1997). Modified atmosphere packaging of fresh produce with a biodegradable laminate of chitosan–cellulose and polycaprolactone. *Postharvest Biology and Technology*, 10, 247–254.

Mansur, A. Nossos passos sobre a Terra. *Revista Época, Edição Verde*, p.42-75, outubro, 2006.

Mariano, J.B. Impactos ambientais do refino de petróleo. 2001. 289f. Dissertação (Mestrado em Ciências em planejamento energético) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

Martínez-Camacho, A.P.; Cortez-Rocha, M.O.; Ezquerro-Brauer, J.M.; Graciano-Verdugo, A.Z.; Rodriguez-Félix, F.; Castillo-Ortega, M.M.; Yépiz-Gómez, M.S. and Plascencia-Jatomea, M. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers* 82, p. 305–315, 2010.

Mazeau, K.; Winter, W. T.; Chanzy, H. *Macromolecules* 1994, 27, 7606.

McGill, A.E. and Sacks, B. (Transindex CC, Johannesburg, Republic of South Africa) (1990) 'Monitoring of Gas Packaged Items', South African Patent Application ZA 90 0223.

McHugh, T.H.; Krochta, J.M. Permeability properties of edible films. In Krochta, J.M.; Baldwin, E.A.; Nisperos-Carriedo, M.O. *Edible Coatings and Films to Improve Quality*, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, 1994.

McMillin, K.W.; Huang, N.Y.; Ho, C.P. and Smith, B.S. (1999). Quality and shelf-life of meat in case-ready modified atmosphere packaging. In *Quality Attributes in Muscle Foods*, Y.L. Xiong, F. Shahidi, and C.T. Ho (Ed.), ACS Symposium Series, Plenum Publishing Corporation, New York. pp. 73-93.

Merson, M.H. & Dowell J. (1973) Epidemiologic, clinical and laboratory aspects of wound botulism. *N Engl J Med* 289: 1105–1110.

Mucha, M. & Miskiewicz, D. Chitosan Blends as Fillers for Paper. *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 77, 3210–3215 (2000).

Mulet, A., Garcia-Pascual, P., Sanjúan, N., Garcia-Reverter, J. (2002), “Equilibrium Isotherms and Isosteric Heat of Morel”, *Journal of Food Engineering*, n.53, p. 75-81.

Muzzarelli, R.A.A. & Vincenzi, M. Chitosans as dietary food additives. In: GOOSEN, M.F.A. . *Applications of chitin and chitosan*. Maryland: Technomic Publishing Company, p.1152-128, 1997.

Ogawa, K. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 1988, 62, 12225. (b) Schlick, S. *Macromolecules* 1986, 19, 192.

Ogawa, K.; Oka, K.; Miyanishi, T.; Hirano, S. In *chitin related enzymes*; Zikakis, J. P., Ed.; Academic Press: Orlando, FL 1984.

Pacquit, A.; Frisby, J.; Diamond, D; Lau, K.T.; Farrell, A.; Quilty, B.; Diamond, D. Development of a smart packaging for the monitoring of fish spoilage. *Food Chemistry* 102, p. 466–470, 2007.

Paine, F. A., & Paine, H. Y. (1992). *Handbook of food packaging*, 2nd Edition. (pp. 212–214). UK, Cambridge: Blackie Academic & Professional, University Press.

Peter, M.G. Chitin and Chitosan from Animal Sources. In: *Biopolymers, Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes*, (A. Steinbuchel series ed.; E. J. Vandamme, S. De Baets and A. Steinbuchel volume eds), 2002a, Volume 6, pp 481-574. Weinheim: Wiley-VCH.

Pinotti, A.; Garcia, M.A.; Martino, M.N.; Zaritzky, N.E. Study on microstructure and physical properties of composite films based on chitosan and methylcellulose. *Food Hydrocolloids*, v.21, n.1, p.66-72, 2007.

Poling, B.E.; Thomson, G.H; Friend, D.G.; Rowley, R.L. and Wilding, W.V. Perry's Chemical Engineers' Handbook. 8TH Edition, Section 2 Physical and Chemical Data, The McGraw-Hill Companies, Inc., 2008.

Prashanth, K.V. and Tharanathan R.N., Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential – an overview. Trends in Food Science & Technology, 18, p 117-131, 2007.

Raymond, L.; Morin, F.G. & Marchessault, R.H. – Carbohydr. Res., 246, p.331 (1993).

Rhim, J.-W. and Kim, J.-H. Properties of Poly(lactide)-Coated Paperboard for the Use of 1-Way Paper Cup. Journal of Food Science—Vol. 74, Nr. 2, 2009.

Rhim, J.W.; Lee J.H. and Hong, S.I. Water resistance and mechanical properties of biopolymer (alginate and soy protein) coated paperboards. LebensmWiss Technol. 39: p.806–13, 2006.

Roberts, G. A. F. - "Chitin Chemistry", *The Macmillan Press*, London (1992).

Samyn, P.; Deconinck, M.; Schoukens, G.; Stanssens, D.; Vonck, L. and Abbeele, H. V. Modifications of paper and paperboard surfaces with a nanostructured polymer coating. Progress in Organic Coating. 69, p. 442-454, 2010.

Santos, J. E.; Soares, J.P.; Dockal, E.R.; Campana Filho, S.P. & Cavalheiro, E.T.G. - Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens - Polímeros: Ciência e Tecnologia, vol. 13, nº 4, p. 242-249, 2003.

Sgarbieri, V.C.; Proteínas em alimentos protéicos. Editora Varela. São Paulo, 1996.

Smolander, M., Hurme, E. & Ahvenainen, R. (1997). Leak indicators for modified-atmosphere packages. *Trends in Food Science & Technology*, 8, 101 –106.

Smolander, M.; Hurme, E.; Latva-Kala, K.; Luoma, T.; Alakomi, H-L.; Ahvenainen, R. Myoglobin-based indicators for the evaluation of freshness of unmarinated broiler cuts. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, in press, 2002.

Sobral, P.J.A. Influência da espessura sobre certas propriedades de biofilmes à base de proteínas miofibrilares. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, p. 1251-1259, 2000.

Sobral, P.J.A; Menegalli, F.C.; Hubinguer, M.D.; Roques, M.A. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids*, v.3-4, n.15, p. 423-32, 2001.

Struszczyk, H. & Kivekäs, O. (1990). Microcrystalline chitosan - Some areas of application. *British Polymer Journal*, 23, 261–265. *Technologies*, v.6, n.4, p.459-464, 2005.

Thomson, G. (1985). Making better paper with shrimps. *Pulp and Paper International*, 26, 33.

Trabulsi, L. R., 1998. *Microbiologia*. São Paulo: Editora Atheneu.

Trimukhe, K.D. & Varma, A.J. *Carbohydr. Polym.* 2008, 71, 698–702.

Vachoud, L.; Zydowicz, N., Domard, A. Physicochemical behaviour of chitin gels, *Carbohydrate research*, v.326, p.295-304, 2000.

Wagner, G.P.; Lo, J.; Laine, R.; Almeder, M. Chitin in the epidermal cuticle of a vertebrate (*Paralipophrys trigloides*, Blenniidae, Teleostei). *Cell. Mol. Life Sci.* 1993, 49, 317–319.

Wang, X.; Du, Y.; Fan, L.; Liu, H. & Hu, Y. Chitosan-metal complexes as antimicrobial agent: Synthesis, characterization and Structure-activity study. *Polymer Bulletin*, 55, p.105-113 (2005).

Wang, Y.; Li, B.; Zhou, Y.; Jia, D. and Song Y. CS-Fe(II,III) complex as precursor for magnetite nanocrystal. *Polym. Adv. Technol.* (2010). DOI: 10.1002/pat.1657.

Wolfbeis, O.S., List, H. (1995). Method for Quality Control of Packaged Organic Substances and Packaging Material for use with this Method. United States patent US 5407829. AVL Medical Instruments, AG, Schaffhausen, Switzerland.

Xu, Y.X.; Kim, K.M.; Hanna, M.A.; Nag, D. Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. *Industrial crops and products*, v.21, p.185-192, 2005.

Yoshida, C.M.P. Aplicação de concentrado protéico de soro de leite na elaboração de filmes comestíveis. Campinas (São Paulo): UNICAMP, 227p. (Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos), 2002.

Yoshida, C.M.P.; Antunes, A.C.B. Water vapour permeability of whey protein emulsion films. *Milchwissenschaft*, v.59, n.1/2, p. 48-51, 2004.

Yoshida, C.M.P.; Bastos, C.E.N. and Franco, T.T. Modeling of potassium sorbate diffusion through chitosan films. *LWT - Food Science and Technology* 43 (2010) 584–589.

Yoshida, C.M.P.; Oliveira-Juniro, E.; Franco, T.T. Chitosan Films: the effects of additives effects on barrier and mechanical properties. *Packaging Science and Technology*, 2009.

CAPITULO 7

ANEXO – Patente depositada junto ao INPI no dia 18 de dezembro de 2009, sob o número de protocolo 018090056144 e junto ao Patent Cooperation Treaty (PCT) no dia 24 de novembro de 2010, sob o número do processo internacional PCT/BR2010/000394.

**DOCUMENT MADE AVAILABLE UNDER THE
PATENT COOPERATION TREATY (PCT)**

International application number:	PCT/BR2010/000394
International filing date:	24 November 2010 (24.11.2010)
Document type:	Certified copy of priority document
Document details:	Country/Office: BR
	Number: PI0911828-4
	Filing date: 18 December 2009 (18.12.2009)
Date of receipt at the International Bureau:	08 July 2011 (08.07.2011)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a),(b) or (b-bis)

PCT/BR 2010 / 000394



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Ministério do Desenvolvimento, da Indústria e Comércio Exterior.
Instituto Nacional da Propriedade Industrial
Diretoria de Patentes

CÓPIA OFICIAL

PARA EFEITO DE REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE

O documento anexo é a cópia fiel de um
Pedido de Patente de Invenção
Regularmente depositado no Instituto
Nacional da Propriedade Industrial, sob
Número do PI0911828-4 de 18/12/2009.

Rio de Janeiro, 14 de Junho de 2011.

Assinatura manuscrita de Oscar Paulo Bueno.

Oscar Paulo Bueno
Chefe do SECOD
Mat. 0449117





EDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

1.1 Nome: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

1.2 CNPJ/CPF: 460684250001/33

1.3 Endereço completo: CIDADE UNIVERSITÁRIA "ZEFERINO VAZ" - DISTRITO DE BARÃO GERALDO - CAMPINAS - SP

1.4 CEP: 13083-970

1.5 Telefone: (19) 3521.5015

1.6 Fax: (19) 3521.5210

1.7 E-mail: patentes@nova.unicamp.br

☐ continua em folha anexa

2. Natureza: ☒ Invenção

☐ Modelo de Utilidade

☐ Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: **INVENÇÃO**

3. Título da Invenção, Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição (54):

"SENSOR BIODEGRADÁVEL CONTENDO INDICADORES DE H2S E PROCESSO DE PREPARO DO MESMO"

☐ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido Nº:

Data de Depósito: / /

5. Prioridade:

☐ interna

☐ unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s)

País ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito
		/ /
		/ /
		/ /

6. Inventor (72):

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: TELMA TEIXEIRA FRANCO

6.2 Qualificação: BRAS, DIVOR, PROF. UNIVERSITÁR

6.3 CPF: 055599698-00

6.4 Endereço completo: RUA OLÍMPIO PATTARO, 68, DISTRITO DE BARÃO GERALDO, EM CAMPINAS - SP

6.5 CEP: 13085-045

6.6 Telefone: (19) 3521.3966

6.7 Fax: (19) 3521.3910

6.8 E-mail: franco@feq.unicamp.br

☒ continua em folha anexa

Formulário 1.01 - Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição (folha 1/2)

☐ 7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)



☐ 9.1 Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção foi obtido em decorrência de acesso a amostra de componente do patrimônio genético nacional, realizado a partir de 30 de junho de 2000, e que foram cumpridas as determinações da Medida Provisória 2.186-16, de 23/08/01, informando ainda:

9.3 Origem do material genético e do conhecimento tradicional associado, quando for o caso:

☐ continua em anexo

☐ 9.4 Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso a amostra de componente do patrimônio genético nacional, realizado a partir de 30 de junho de 2000.

10.1 Nome: FERNANDA LAVRAS COSTALLAT SILVADO
10.2 CPF/CNPJ: 295.166.068-57 10.3 APU/OAB: 210.899
10.4 Endereço completo: PROCURADORIA GERAL DA UNICAMP - DISTRITO DE BARÃO
GERALDO, CAMPINAS - SP
10.5 CEP: 13083970
10.6 Telefone: (19) 35214771 10.7 FAX: (19) 3289.4245

X	11.1 Guia de Recolhimento	2 fls.	X	11.5 Relatório Descritivo	8 fls.
X	11.2 Procuração	1 fls.	X	11.6 Reivindicações	3 fls.
	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	X	11.7 Desenhos	1 fls.
	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	X	11.8 Resumo	1 fls.
	11.9 Outros (especificar)				fls.
X	11.10 Total de folhas anexadas				16 fls.

12. Declaro, sob penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras

Local e Data

Hotel Windsor

Assinatura e Carimbo
Fernanda Lavres Costallat Silvano
Procuradora de Universidade Subchefe
Matricula nº 28.574-2
OAB/SP nº 210.899



6. Dados dos outros dois inventores:

6.1 Nome: **CRISTIANA MARIA PEDROSO YOSHIDA**

6.2 Qualificação: brasileira, casada, professora universitária

6.3 CPF nº 256.979.508-96

6.4 Endereço completo: Av. Dr. Luis de Tella, 535, Bairro Cidade Universitária, Distrito de Barão Geraldo, em Campinas - SP

6.5 CEP: 13083-000

6.6 Telefone: (19) 3287.6186

6.7 FAX: (11) 4049.3300

6.8 E-Mail: kityoshida@gmail.com

6.1 Nome: **EDISON TUTOMU KATO JUNIOR**

6.2 Qualificação: brasileiro, solteiro, aluno de pós-graduação

6.3 CPF nº 225.066.038-75

6.4 Endereço completo: Av. Vicente Ferreira, 1445, apto. 31, Bairro da Cascata, em Marília - SP

6.5 CEP: 17515-000

6.6 Telefone: (19) 3521.3854

6.7 FAX: (19) 3521.3910

6.8 E-Mail: Kato_imel@yahoo.com.br



Relatório Descritivo de Patente de Invenção para “SENSOR BIODEGRADÁVEL CONTENDO INDICADORES DE H₂S E PROCESSO DE PREPARO DO MESMO”

5 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de sensor de detecção de gás sulfídrico e um objeto adicional da presente invenção é o sensor de detecção do gás sulfídrico (H₂S). A presente invenção tem por objetivo detectar e/ou indicar, de forma rápida e colorimétrica a presença do

10 gás sulfídrico (H₂S).

O H₂S é um gás inflamável, sem cor, de sabor adocicado e com um odor característico de ovo podre. Em altas concentrações, é altamente tóxico ao ser humano, podendo levar ao óbito. Normalmente o H₂S é percebido de maneira olfativa quando este se apresenta em baixas concentrações no ar, variante

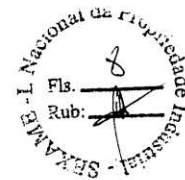
15 entre 0,0005 a 0,3 partes por milhão (ppm). Entretanto, o ser humano perde a percepção olfativa em altas concentrações de H₂S, o que torna o contato com este gás muito perigoso (ATSDR, 2006). O H₂S pode ser gerado por várias fontes, por exemplo: em plantas de gás natural, indústrias petroquímicas, carvoarias, indústrias produtoras de papéis, indústrias manufadoras de viscose,

20 unidades produtoras de enxofre, fundições de ferro, indústrias alimentícias e curtumes (SVENDSEN 2001).

Na indústria de alimentos, produtos como os vegetais enlatados (palmitos, cogumelos), alimentos minimamente processados, alimentos consumidos in natura como mel e carnes embaladas à vácuo podem ser

25 contaminados microbiologicamente antes, durante ou depois do processamento. Em condições de anaerobiose microrganismos como Clostridium sulfito redutores produzem como metabólito o H₂S.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO



Atualmente na área de alimentos muitos sensores de frescor vêm sendo desenvolvidos, sendo, porém baseados na maioria na alteração de pH, integridade da embalagem (sensores de oxigênio) pela incorporação de pigmentos sensíveis a oxidação que tem sua cor alterada quando em contato com oxigênio, indicadores de dióxido de carbono que têm o mesmo princípio dos indicadores de pH, ou seja, tem a coloração alterada pela mudança da acidez, no documento de patente CA2499145 é ensinado um dispositivo para detecção de microrganismos em alimentos onde um indicador de pH detecta a variação da acidez provocada pela presença de um metabólito; No documento de patente CA2559708 é ensinado um dispositivo para detecção de microrganismos que também utiliza um indicador de pH (azul de bromotimol e alaranjado de metila) que sofre alteração de cor resultante da presença de dióxido de carbono oriundo do crescimento bacteriano; no documento de patente CA2590091 é ensinado um sensor para detecção de microrganismos em alimentos com indicador de pH (azul de bromotimol e vermelho de metila) acondicionada em um recipiente permeável a gases que quando em contato com dióxido de carbono sofre uma alteração de cor indicando o crescimento de microrganismos; no documento de patente DE102004019427 é ensinado um mesmo princípio dos dispositivos acima descritos, porém necessita do contato direto com o alimento para detectar possíveis contaminações. O documento de patente US7156597 refere-se também de um indicador de contaminação microbiológica que baseia-se em reações do tipo antígeno-anticorpo acarretando em variação colorimétrica do meio indicando a presença de microrganismos.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de sensor de detecção de gás sulfídrico e um objeto adicional da presente invenção é o sensor de detecção do gás sulfídrico (H₂S) com indicação rápida e fácil leitura.



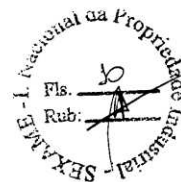
Indicadores colorimétricos, sulfato ferroso (FeSO_4) e mioglobina, foram incorporados separadamente em uma matriz filmogênica de quitosana e aplicados nas superfícies de papéis cartão, 250g/m^2 , previamente impregnados com carbonato de sódio (Na_2CO_3).

- 5 Um aspecto vantajoso da presente invenção é o curto tempo de detecção e facilidade de visualização perante os métodos usualmente aplicados para detecção de H_2S , sendo ainda na metodologia atualmente utilizada um técnico especializado e um período considerável para se obter os resultados o sensor proposto pode ser compreendido inclusive por uma criança
- 10 e apresenta resultados em tempos entre 30 e 60 segundos, preferencialmente em 30 segundos.

- O sensor pode ser aplicado em indústrias que utilizam ou geram o gás sulfídrico, onde podem ocorrer emissões fugitivas que, conforme a concentração, conferem riscos diversos à saúde do trabalhador. Outra
- 15 aplicação seria para assegurar segurança e qualidade de produtos alimentícios.

- O número de incidentes relatados tem levado ao crescimento da preocupação sobre segurança do trabalhador e a qualidade dos alimentos, por exemplo: casos de acidentes com trabalhadores em usinas petrolíferas
- 20 resultantes de vazamentos de gases, acidentes com trabalhadores em silos de estocagem de cereais, palmitos e cogumelos em conserva contaminados por *Clostridium sp.* e mais recentemente casos de toxinfecção alimentar em crianças que consumiram mel contaminado por *Clostridium sp.*

- Em vista disso torna-se necessário um meio confiável de detectar a
- 25 presença de H_2S informando assim ao trabalhador se o local está seguro, e também ao consumidor se o produto alimentício apresenta qualidade e segurança para aquisição e posterior ingestão.



O sensor biodegradável que está sendo proposto busca detectar uma ampla faixa de concentração do H_2S ($\geq 0,1$ ppm) e de fácil leitura. Assim promove ao trabalhador e/ou consumidor que não tem acesso a equipamentos e testes sofisticados ou conhecimento especializado possa compreender, se o ambiente de trabalho e/ou produto é seguro.

BREVE DESCRIÇÃO DA FIGURA

Figura 1. Resposta colorimétrica do sistema papel – indicador (FeSO_4) a diferentes tempos de exposição ao gás H_2S (a) 0; (b) 30; (c) 60; (d) 90; (e) 120; (f) 180s.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de sensor de detecção de gás sulfídrico. É um objeto adicional da presente invenção é o sensor de detecção do gás sulfídrico (H_2S) com indicação rápida e fácil leitura.

O dito processo de preparação do sensor biodegradável compreende as seguintes etapas:

- (a) recobrimento de um papel cartão com uma solução de carbonato de cálcio;
- (b) secagem do dito papel resultante da etapa (a);
- (c) recobrimento do dito papel resultante da etapa (b) com uma suspensão de quitosana indicador; e
- (d) secagem do papel resultante da etapa (c).

Mais especificamente o processo de preparação, do dito sensor biodegradável, compreende as seguintes etapas:

- (a) recobrimento de um papel cartão preferencialmente de gramatura de 250 g/m^2 , com uma solução de carbonato de cálcio;
- (b) secagem do dito papel resultante da etapa (a) a uma temperatura preferencial de 150°C ;



(c) recobrimento do dito papel cartão resultante da etapa (b) com uma suspensão de quitosana indicador; e

(d) secagem do papel resultante da etapa (c) a uma temperatura preferencialmente de 150 °C.

- 5 A referida solução de carbonato de cálcio preferencialmente apresenta uma concentração de 4g/100g.

A dita suspensão de quitosana apresenta uma concentração preferencial de 3,33% em massa de quitosana em pó com grau de acetilação de cerca de 18%.

- 10 A referida suspensão de quitosana-indicador pode ser preparada a partir das seguintes etapas:

- (a) adição de ácido acético à quitosana;
- (b) homogeneização da solução obtida na etapa (a);
- (c) adição preferencialmente lenta de uma solução de indicador; e
- 15 (d) homogeneização da solução resultante da etapa (c).

A referida suspensão de quitosana-indicador pode ser preparada preferencialmente a partir das seguintes etapas:

- (a) adição de ácido acético à quitosana preferencialmente em pó;
- (b) homogeneização da solução obtida na etapa (a) preferencialmente a
- 20 uma temperatura ambiente;
- (c) adição preferencialmente lenta de uma solução de indicador a ser selecionado dentre sulfato ferroso (FeSO_4) e mioglobina preferencialmente em uma concentração de 10% em massa do indicador; e
- (d) homogeneização da solução resultante da etapa (c)
- 25 preferencialmente por um período de 10 minutos.

É um objeto adicional da presente invenção um sensor biodegradável que compreende um papel, quitosana, carbonato de cálcio e um indicador iônico de ferro selecionado dentre mioglobina ou sulfato ferroso para aplicação para



como detector de ácido sulfídrico (H_2S). O dito sensor é preparado a partir do processo descrito anteriormente para ser aplicado na detecção de ácido sulfídrico (H_2S).

- Indicadores colorimétricos, sulfato ferroso (FeSO_4) e mioglobina, foram
- 5 incorporados separadamente em uma matriz filmogênica de quitosana e aplicados nas superfícies de papéis cartão, 250 g/m^2 , previamente impregnados com carbonato de sódio (Na_2CO_3). A vantagem deste trabalho é o curto tempo de detecção e facilidade de visualização perante os métodos
- 10 atualmente utilizados para detecção de H_2S , sendo ainda na metodologia se obter os resultados o sensor proposto pode ser compreendido inclusive por uma criança e apresenta resultados em tempos entre 30 e 60 segundos, preferencialmente em 30 segundos.

Preparo do sensor

- 15 O presente exemplo de concretização contempla o processo de obtenção de um sensor biodegradável para detecção de ácido sulfídrico (H_2S), sem, no entanto, restringir o escopo de proteção e o aumento de escala da invenção.

- 20 Inicialmente, o papel cartão foi recoberto com solução de $4\text{g}/100\text{g}$ de carbonato de cálcio (Na_2CO_3) onde 3 mL da solução foram aplicados na superfície do papel, em seguida o papel foi seco a 150°C sendo no presente exemplo, por estufa durante um período de 90 segundos. Uma suspensão quitosana e ácido acético em proporções estequiométricas foi obtida preferencialmente a partir de uma solução 3,33% em massa de quitosana
- 25 preferencialmente em pó fornecida com grau de acetilação de cerca de 18%, calculada baseando-se na massa da amostra e no valor do grau de acetilação da quitosana para atingir a protonação de todos grupamentos NH_2 . A solução de quitosana foi homogeneizada sob agitação, no presente exemplo sem no



entanto restringir, em temperatura ambiente por um período de 50 minutos. Adicionou-se lentamente uma solução do indicador desejado selecionado dentre FeSO_4 e mioglobina com concentração preferencial de 10% em massa e após a completa dissolução da quitosana obteve-se uma solução final preferencial de 3% em massa de quitosana e 1% em massa de indicador sendo mantida preferencialmente, no presente exemplo, sem no entanto restringir, sob agitação por mais 10 minutos. Adicionou-se ao dito papel cartão, por exemplo, com gramatura de 250g/m^2 , a dita solução quitosana-indicador em uma razão suspensão e área de papel (volume/área) preferencialmente de 44:1 (mL/m²). Após esta etapa obteve-se uma cobertura final seca de 1.76g/m^2 . Em seguida o produto obtido na etapa anterior passou por secagem preferencialmente 150°C por 60 segundos.

Avaliação qualitativa da sensibilidade do sistema

A resposta de detecção do indicador de H_2S foi medida submetendo o sistema papel – filme – indicador a diferentes tempos de exposição ao gás H_2S . Quinze alíquotas de 0,1g de FeS foram pesadas e adicionadas a 20 mL de ácido clorídrico 1M. Um aquecimento moderado foi aplicado para acelerar a reação. Após 4 minutos cada sensor ($9,0\text{ cm}^2$) foi exposto ao H_2S gerado por períodos de 30, 60, 90, 120 e 180 segundos. A Figura 1 ilustra a variação de cor, em diferentes tons de preto, em função dos diferentes tempos de exposição.

Imediatamente após a exposição (aproximadamente 5 segundos) foram feitas leituras dos parâmetros de cor L^* , a^* e b^* com colorímetro (CR-400, KONIKA MINOLTA), os resultados foram analisados com auxílio do software STATISTICA 5.0 e podem ser observados na Tabela 01. (As análises foram realizadas em triplicata)

Logo nos primeiros 30 segundos de exposição, a diferença de cor apresentou diferença estatisticamente significativa no parâmetro de cor L^* , no



caso deste sensor, o mais importante porque mede a variação do claro ao escuro (branco ao negro).

Tabela 01. Avaliação dos parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) dos sensores inteligentes mediante diferentes tempos de exposição ao H_2S .

Tempo de exposição (s)	L^*	a^*	b^*
0	87.06 ± 1.11^a	0.54 ± 0.16^{acd}	13.73 ± 1.19^a
30	77.23 ± 6.42^b	0.88 ± 0.26^a	12.17 ± 1.18^a
60	66.82 ± 5.38^b	0.48 ± 0.44^{ac}	10.11 ± 1.44^a
90	50.72 ± 5.75^c	-0.36 ± 0.47^{cef}	6.16 ± 2.36^b
120	48.03 ± 1.96^c	-0.63 ± 0.28^{bf}	4.22 ± 0.26^b
180	44.33 ± 3.17^c	-0.40 ± 0.40^{cdef}	4.24 ± 0.80^b

- 5 a-f – Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p > 0,05$) relativamente às médias obtidas por meio de teste de Tukey.



REIVINDICAÇÕES

1. Processo de preparação de um sensor biodegradável caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- 5 (a) recobrimento de um papel cartão com uma solução de carbonato de cálcio;
- (b) secagem do dito papel resultante da etapa (a);
- (c) recobrimento do dito papel resultante da etapa (b) com uma suspensão de quitosana indicador; e
- (d) secagem do papel resultante da etapa (c).

10 2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- (a) recobrimento de um papel cartão preferencialmente com gramatura de 250 g/m², com uma solução de carbonato de cálcio;
- (b) secagem do dito papel resultante da etapa (a) a uma temperatura
- 15 preferencial de 150 °C;
- (c) recobrimento do dito papel cartão resultante da etapa (b) com uma suspensão de quitosana-indicador; e
- (d) secagem do papel resultante da etapa (c) a uma temperatura preferencialmente de 150 °C.

20 3. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por compreender uma etapa de recobrimento (b) com uma solução de carbonato de cálcio em uma concentração preferencialmente de 4% em massa;

25 4. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pela etapa de recobrimento com aplicação de uma suspensão de quitosana-indicador ser preparada a partir de etapas incluindo:

- (a) adição de ácido acético à quitosana;
- (b) homogeneização da solução obtida na etapa (a);



- (c) adição preferencialmente lenta de uma solução de indicador; e
- (d) homogeneização da solução resultante da etapa (c).

5. Processo, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo preparo da dita suspensão de quitosana-indicador incluir preferencialmente as

5 etapas:

- (a) adição de ácido acético à quitosana preferencialmente em pó;
- (b) homogeneização da solução obtida na etapa (a) preferencialmente a uma temperatura ambiente;

10 (c) adição preferencialmente lenta de uma solução de indicador selecionado dentre sulfato ferroso (FeSO_4) e mioglobina preferencialmente em uma concentração de 10% em massa do indicador; e

- (d) homogeneização da solução resultante da etapa (c) preferencialmente por um período de 10 minutos.

15 6. Processo, de acordo com reivindicações 1 ou 2, caracterizado por compreender uma etapa de recobrimento (c) com suspensão de quitosana-indicador preparada de acordo com reivindicações 4, em uma concentração preferencial de 3,33% em massa de quitosana com grau de acetilação de cerca de 18%.

20 7. Processo, de acordo com reivindicações 1 ou 2, caracterizado por compreender uma etapa de recobrimento (c) com suspensão de quitosana-indicador preparada de acordo com reivindicações 5, em uma concentração preferencial de 3,33% em massa de quitosana com grau de acetilação de cerca de 18%.

25 8. Processo, de acordo com reivindicação 7, caracterizado pela etapa de recobrimento com solução quitosana-indicador ser em uma razão suspensão e área de papel (volume/área) preferencialmente de 44:1.

9. Processo, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pela etapa de secagem ser em um intervalo de tempo preferencial de 60 a 90



segundos quando realizada em estufa selecionada dentre circulação forçada de ar ou não.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender as seguintes etapas:

5 (a) recobrimento de um papel cartão com uma solução de carbonato de cálcio em uma concentração preferencialmente de 4% em massa;

(b) secagem do dito papel resultante da etapa (a) a uma temperatura preferencial de 150 °C em um intervalo de tempo preferencial de 60 a 90 segundos quando realizada em estufa selecionada dentre circulação forçada de ar ou não, preferencialmente 90 segundos;

10 (c) recobrimento do dito papel cartão resultante da etapa (b) com uma suspensão de quitosana-indicador obtida de acordo com reivindicação 5, em uma concentração preferencial de 3,33% em massa de quitosana com grau de acetilação de cerca de 18% e, uma razão suspensão e área de papel (volume/área) preferencialmente de 44:1; e

(d) secagem do papel resultante da etapa (c) a uma temperatura preferencialmente de 150 °C em um intervalo de tempo preferencial de 60 a 90 segundos quando realizada em estufa selecionada dentre circulação forçada de ar ou não, preferencialmente 60 segundos;

20 11. Sensor biodegradável, caracterizado por compreender um papel, quitosana, carbonato de cálcio e um indicador ion de ferro selecionado dentre mioglobina ou sulfato ferroso para aplicação para como detector de ácido sulfídrico (H₂S).

25 12. Sensor biodegradável, caracterizado pelo fato de ser preparado a partir do processo conforme definido em uma das reivindicações de 1 a 10;

13. Sensor, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de ser para a detecção de ácido sulfídrico (H₂S).

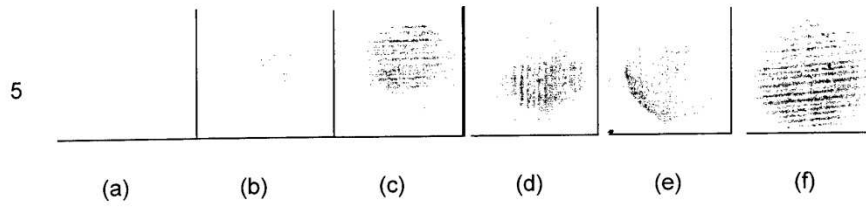


Figura 1



RESUMO

Patente de Invenção para "SENSOR BIODEGRADÁVEL CONTENDO INDICADORES DE H₂S E PROCESSO DE PREPARO DO MESMO"

A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de sensor de detecção de gás sulfídrico e um objeto adicional da presente invenção é o sensor de detecção do gás sulfídrico (H₂S). A presente invenção tem por objetivo detectar e/ou indicar, de forma rápida e colorimétrica a presença do gás sulfídrico (H₂S). Na indústria de alimentos, produtos como os vegetais enlatados (palmitos, cogumelos), alimentos minimamente processados, alimentos consumidos in natura como mel e carnes embaladas à vácuo podem ser contaminados microbiologicamente antes, durante ou depois do processamento. Em condições de anaerobiose microrganismos como Clostridium sulfito redutores produzem como metabólito o H₂S.

EXAME PRELIMINAR (PI-C-MU)

1. Petição de depósito: (SP) 018090056144, de 18/ 12 / 2009.

2. Depositante: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

2.1 Procurador: FERNANDA L. C. SILVADO

3. Natureza: (X) PI () C () MU

4. Título (resumido): SENSOR BIODEGRADÁVEL ...

5. Exigência: O pedido não atende formalmente as disposições legais, especialmente quando ao Art. 19 da LPI e AN 127/97 e é recebido provisoriamente, ficando o requerente obrigado a sanar, em 30 (trinta) dias a contar da data da ciência, às exigências estabelecidas abaixo. Não sendo a exigência cumprida, com a apresentação da documentação exigida no prazo acima, o depósito não será aceito, e a documentação ficará à disposição do interessado, nos termos do Art. 21 da LPI.

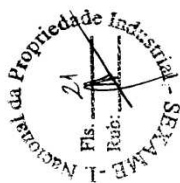
	Apresentar requerimento de depósito- Formulário 1.01- AN 130 /97.
	Apresentar o pedido em português (e a tradução conforme item 4.3.1 do AN 127/97).
	Apresentar cópia(s) do pedido.
X	Apresentar: () relatório descritivo () reivindicações () resumo (X) desenhos de acordo com o disposto no AN 127/97.
	Indicar a qualificação do depositante.
	Indicar o nome e os dados do inventor.
	O Título deve ser o mesmo no () formulário, () relatório descritivo e () resumo.
	Numerar de modo independente as folhas dos () relatório descritivo () reivindicações () resumo, com algarismo arábicos, no centro da parte superior entre 1 e 2 cm do limite da folha.
	Numerar consecutivamente, as folhas dos desenhos, acima e ao centro das páginas, em algarismos arábicos.
	As margens do () relatório descritivo () reivindicações () resumo () desenho devem ser () superior entre 2 e 4 cm () inferior entre 2 e 3 cm () esquerda entre 2,5 e 4 cm () direita entre 2 e 3 cm
X	O () relatório descritivo () reivindicações (X) resumo devem ter na margem Esquerda, junto ao texto, as linhas numeradas, a partir da quinta, de cinco em cinco (5, 10, 15,...) numeração essa que deve ser reiniciada a cada folha.
	As linhas do () relatório descritivo () reivindicações () resumo devem ser datilografadas com espaço mínimo de 1½
	Retirar a moldura da(s) folhas(s) dos desenhos.
	Os sinais de referência dos desenhos (números, letras ou alfanuméricos não, podem conter () parênteses () círculos () aspas () quadrados () retângulos.
X	Outras exigências: Apresentar desenhos com maior nitidez, e sem fundos escuros:

Obs. Se o depósito for efetuado por procurador, caso não seja apresentada procuração dentro do prazo de 60 (sessenta) dias, a contar da data de depósito, o pedido será arquivado definitivamente.

Em. 21 / 07 / 2010 .

Armando dos Santos Alvarez
Matrícula: 1535475
DIRPA/SEXAME

	Data	Assinatura e nome legível
Enviado para a origem	22/07/10	Judrey
Recebido na origem	27/07/10	Mauro
Ciência do requerente	29/7/10	Ana Claudia C. Dias



JUNTADA A PETIÇÃO Nº 018100028701

DE: 09 / 08 / 2008

SEXAME - EM: 28 / 08 / 2008

< Uso exclusivo do INPI >

INPI INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PROTEÇÃO DE MARCAS

06/08/2010 018100028701
11:54 DESP

0000421004725237

Espaço para etiqueta

PETIÇÃO - RELACIONADA COM PEDIDO, PATENTE OU CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

1. Interessado
 - 1.1 Nome: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
 - 1.2 Qualificação:
 - 1.3 CNPJ/CPF: 460684250001-33
 - 1.4 Endereço completo:
 - 1.5 CEP: 13083-970
 - 1.6 Telefone: 19 3521-5015 1.7 Fax: 19 3521-5210 1.8 E-Mail: patentes@inova.unicamp.br

☒ continua em folha anexa

2. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição:
"SENSOR BIODEGRADÁVEL CONTENDO INDICADORES DE H₂S E PROCESSO DE PREPARO DO MESMO"

☐ continua em folha anexa

3. Natureza

☒ 3.1 Invenção
 ☐ 3.2 Certificado de Adição
 ☐ 3.3 Modelo de Utilidade
4. Referência

☒ 4.1 Pedido
☐ 4.2 Patente

Procedido
 4.3 Nº 018090056144

4.4 Data: 18/12/2009

5. Procurador (74)
 - 5.1 Nome: FERNANDA LAVRAS COSTALLAT SILVADO
 - 5.2 CNPJ/CPF: 295.166.068-57 5.3 API/OAB: 210.899
 - 5.4 Endereço Completo: PROCURADORIA GERAL DA UNICAMP - DISTRITO DE BARÃO GERALDO,
 - 5.5 CEP: 13083-971
 - 5.6 Telefone: 19 3521-4771 5.7 Fax: 19 3289-4245 5.8 E-mail: proc-geral@pg.unicamp.br

6. Apresentação ou modificação da Listagem de Sequências Biológicas (documentos anexados)(se houver):

☐ Listagem de sequências em arquivo eletrônico: n° de CDs ou DVDs (original e cópia).
☐ Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fis.
☐ Listagem de sequências em formato impresso: fis.
☐ Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fis.

7. **Apresenta / Requer** (continuação)

(Assinale o(s) itens que se aplica(m) ao seu caso):
(deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

O que se requer / apresenta		folhas
☐	7.1 Modificações no Relatório Descritivo	
☐	7.2 Modificações nas Reivindicações	
☐	7.3 Modificações nos Desenhos	
☐	7.4 Modificações no Resumo	
☐	7.5 Caducidade da Patente/Certificado de Adição	
☐	7.6 Contestação de Caducidade/Nulidade	
☐	7.7 Cópia Oficial do pedido depositado	
☐	7.8 Cumprimento ou Contestação de Exig. RPI , de	
☐	7.9 Desarquivamento, arquivado na RPI , de	
☐	7.10 Documento de Prioridade	
☐	7.11 Exame do pedido com reivindicações	
☐	7.12 Expedição da Carta Patente / Certificado de Adição	
☐	7.13 Guia(s) de Recolhimento (uma para cada serviço)	
☐	7.14 Manifestação s/ Parecer RPI , de	
☐	7.15 Nulidade do Patente / Certificado de Adição	
☐	7.16 Procuração	
☐	7.17 Publicação Antecipada	
☐	7.18 Recurso contra o Indeferimento	
☐	7.19 Recurso, (outros)	
☐	7.20 Renúncia da Patente	
☐	7.21 Restauração de pedido / patente	
☐	7.22 Retirada do pedido	
☐	7.23 Subsídios ao Exame Técnico	
☐	7.24 Oferta de Licença	
☒	7.25 Outros que não aqueles definidos no campo 6 (especificar): Papeleta de esclarecimento + Exame Formal Preliminar em 04 vias	4

8. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 6 e 7): 4 fls.

9. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

CAMPINAS, SP, 06.08.2010

Local e Data

Fernanda Lauras Costallat Silvano

Assinatura e Carimbo

Fernanda Lauras Costallat Silvano
Procuradora de Universidade Subchefe
Matricula nº 28.574-2
OAB/SP nº 210.899



Formulário 1.02 – Petição ou Requerimento, relacionado com pedido, patente ou certificado de adição (folha 2/2)



1 Continuação dos dados do interessado:

1.1 Qualificação: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP, pessoa jurídica de direito público, autarquia estadual devidamente inscrita no CNPJ sob nº 46.068.425/0001-33 e isenta de inscrição estadual.

1.4 Endereço completo: Cidade Universitária "Zeferino Vaz" - Distrito de Barão Geraldo, em Campinas - SP - CEP 13083-970



Campinas, em 06 de Agosto de 2010

Ao
INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial

Com relação ao cumprimento de exigências do Exame Formal Preliminar do processo abaixo, temos a comentar o que segue.

18.12.09 – Protocolo 018090056144

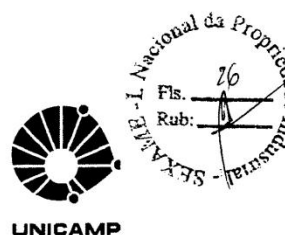
SENSOR BIODEGRADÁVEL CONTENDO INDICADORES DE H₂S E PROCESSO DE PREPARO DO MESMO

TELMA TEIXEIRA FRANCO, CRISTIANA MARIA PEDROSO YOSHIDA e EDISON TUTOMU KATO JUNIOR FEQ

Incluimos a numeração no resumo, que segue em quatro vias.

Quanto à exigência de apresentar os desenhos com maior nitidez, não há o que fazer, visto que trata-se de imagens do sensor objeto do PI. O fundo escuro faz parte das

Rua Roxo Moreira, 1831, Cidade Universitária "Zeferino Vaz" – Distrito de Barão
Geraldo - CEP 13083-970 - Campinas - SP
Fone (19)3521-5015 - Fax (19)3521-5210
E-mail: ciro@inova.unicamp.br - <http://www.inova.unicamp.br>



imagens bem como a nitidez está correta pois retrata com fidelidade o sensor tema do PI.
Isso posto, e contando com a compreensão do INPI despedimo-nos.

Atenciosamente


Ciro de la Cerda
Assessor Técnico - Propriedade Intelectual
Agência de Inovação da Unicamp
Matrícula 17857-8


Fernanda Lauras Costallat Silvano
Procuradora de Universidade Subchefe
Matrícula nº 28.574-2
OAB/SP nº 210.009

Rua Roxo Moreira, 1831, Cidade Universitária "Zeferino Vaz" – Distrito de Barão
Geraldo - CEP 13083-970 - Campinas - SP
Fone (19)3521-5015 - Fax (19)3521-5210
E-mail: ciro@inova.unicamp.br - <http://www.inova.unicamp.br>

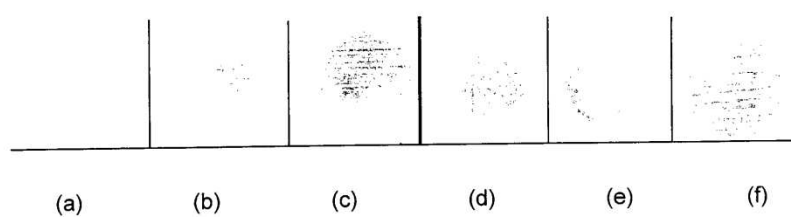


FIGURA 01



RESUMO

Patente de Invenção para **"SENSOR BIODEGRADÁVEL PARA
DETECÇÃO DE H₂S E PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DO MESMO"**

A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de sensor de
5 detecção de gás sulfídrico e um objeto adicional da presente invenção é o
sensor de detecção do gás sulfídrico (H₂S). A presente invenção tem por
objetivo detectar e/ou indicar, de forma rápida e colorimétrica a presença do
gás sulfídrico (H₂S). Na indústria de alimentos, produtos como os vegetais
enlatados (palmitos, cogumelos), alimentos minimamente processados,
10 alimentos consumidos in natura como mel e carnes embaladas à vácuo podem
ser contaminados microbiologicamente antes, durante ou depois do
processamento. Em condições de anaerobiose microrganismos como
Clostridium sulfito redutores produzem como metabólito o H₂S.

< Uso exclusivo do INPI >

INPI INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL

marientegf 018100044196
24/11/2010 10:23 DESP



0000421009579735

Espaço para etiqueta

PETIÇÃO - RELACIONADA COM PEDIDO, PATENTE OU CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

1. Interessado

1.1 Nome: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

1.2 Qualificação:

1.3 CNPJ/CPF: 460684250001-33

1.4 Endereço completo:

1.5 CEP: 13083-970

1.6 Telefone: 19 3521-5015 1.7 Fax: 19 3521-5210 1.8 E-Mail: patentes@inova.unicamp.br

☒ continua em folha anexa

2. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição:

SENSOR BIODEGRADÁVEL CONTENDO INDICADORES DE H2S E PROCESSO DE PREPARO DO MESMO

☐ continua em folha anexa

3. Natureza

☒ 3.1 Invenção

☐ 3.2 Certificado de Adição

☐ 3.3 Modelo de Utilidade

4. Referência

☒ 4.1 Pedido

☐ 4.2 Patente

4.3 Nº 018090056144

4.4 Data: 18/12/2009

5. Procurador (74)

5.1 Nome: FERNANDA LAVRAS COSTALLAT SILVADO

5.2 CNPJ/CPF: 295.166.068-57 5.3 API/OAB: 210.899

5.4 Endereço Completo: PROCURADORIA GERAL DA UNICAMP - DISTRITO DE BARÃO GERALDO,

5.5 CEP: 13083-971

5.6 Telefone: 19 3521-4766 5.7 Fax: 19 3289-4245 5.8 E-mail: proc-geral@pg.unicamp.br

6. Apresentação ou modificação da Listagem de Sequências Biológicas

(documentos anexados)(se houver):

☐ Listagem de sequências em arquivo eletrônico: nº de CDs ou DVDs (original e cópia).

☐ Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fis.

☐ Listagem de sequências em formato impresso: fis.

☐ Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fis.

INPI

Formulário 1.02 - Petição ou Requerimento, relacionado com pedido, patente ou certificado de adição (folha 1/2)

7. Apresenta / Requer (continuação)

(Assinale o(s) itens que se aplica(m) ao seu caso):

(deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

O que se requer / apresenta		folhas
☐	7.1 Modificações no Relatório Descritivo	
☐	7.2 Modificações nas Reivindicações	
☐	7.3 Modificações nos Desenhos	
☐	7.4 Modificações no Resumo	
☐	7.5 Caducidade da Patente/Certificado de Adição	
☐	7.6 Contestação de Caducidade/Nulidade	
☐	7.7 Cópia Oficial do pedido depositado	
☐	7.8 Cumprimento ou Contestação de Exig. RPI , de	
☐	7.9 Desarquivamento, arquivado na RPI , de	
☐	7.10 Documento de Prioridade	
☐	7.11 Exame do pedido com reivindicações	
☐	7.12 Expedição da Carta Patente / Certificado de Adição	
☐	7.13 Guia(s) de Recolhimento (uma para cada serviço)	
☐	7.14 Manifestação s/ Parecer RPI , de	
☐	7.15 Nulidade do Patente / Certificado de Adição	
☐	7.16 Procuração	
☐	7.17 Publicação Antecipada	
☐	7.18 Recurso contra o indeferimento	
☐	7.19 Recurso, (outros)	
☐	7.20 Renúncia da Patente	
☐	7.21 Restauração de pedido / patente	
☐	7.22 Retirada do pedido	
☐	7.23 Subsídios ao Exame Técnico	
☐	7.24 Oferta de Licença	
☒	7.25 Outros que não aqueles definidos no campo 6 (especificar): EXAME FORMAL PRELIMINAR	2

8. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 6 e 7): 2 fls.

9. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

CAMPINAS, SP, 20.11.2010

Local e Data

Perdana Lavras Costallat Silveiro

Assinatura e Carimbo

Perdana Lavras Costallat Silveiro
Procuradora de Universidade Subchefe
Matrícula nº 28.574-2
OAB/SP nº 210.899



1 Continuação dos dados do interessado:

1.1 Qualificação: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP, pessoa jurídica de direito público, autarquia estadual devidamente inscrita no CNPJ sob nº 46.068.425/0001-33 e isenta de inscrição estadual.

1.4 Endereço completo: Cidade Universitária "Zeferino Vaz" - Distrito de Barão Geraldo, em Campinas - SP - CEP 13083-970

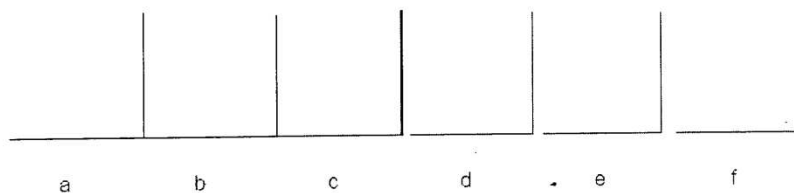
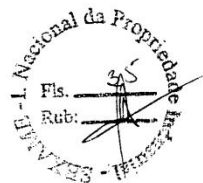


Figura 1

**RESUMO****Patente de Invenção para "SENSOR BIODEGRADÁVEL CONTENDO INDICADORES DE H₂S E PROCESSO DE PREPARO DO MESMO"**

- 5 sensor de detecção de gás sulfídrico e um objeto adicional da presente invenção é o sensor de detecção do gás sulfídrico (H₂S). A presente invenção tem por objetivo detectar e/ou indicar, de forma rápida e colorimétrica a presença do gás sulfídrico (H₂S). Na indústria de alimentos, produtos como os vegetais enlatados (palmitos, cogumelos), alimentos minimamente
- 10 processados, alimentos consumidos in natura como mel e carnes embaladas à vácuo podem ser contaminados microbiologicamente antes, durante ou depois do processamento. Em condições de anaerobiose microrganismos como Clostridium sulfito redutores produzem como metabólito o H₂S.