

## Design and fabrication of a new colorimetric sensor based on hematoxylin for freshness monitoring of shrimp during storage

Mazidi, S.<sup>1</sup>, Nasirizadeh, N.<sup>2\*</sup>, Mirjalili, M.<sup>3</sup>, Rohani-moghadam, M.<sup>4</sup>, Shirgholami, M.A.<sup>5</sup>

1. PhD student in Polymer, Department of Textile and Polymer Engineering, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran
2. Professor, Department of Textile and Polymer Engineering, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran
3. Professor, Department of Textile and Polymer Engineering, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran
4. Associate Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran
5. Assistant Professor, Department of Textile and Polymer Engineering, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran

\*Corresponding author: nasirizadeh@iauyazd.ac.ir.

(Received: 2020/10/31 Accepted: 2021/2/3)

### Abstract

Shrimp is one of the seafood that its wholesomeness plays a major role in human health. Shrimp spoils very quickly due to having unsaturated fatty acids. However, with timely and early detection, many economic losses can be avoided. For this purpose, various methods are used to detect healthy shrimp from spoiled ones. The most common methods are the sensory and physical examination of shrimp, chemical and microbial tests. In this study, a colorimetric indicator was fabricated using biodegradable polyvinyl alcohol/Chitosan film based on the color changes of hematoxylin at different pH values. Changes in pH, total volatile basic nitrogen contents (TVBN), and colorimetric characteristics of shrimp specimens were examined by contact with this color indicator. The suggested indicator in response to pH shows a variety of colors ranging from light yellow to dark purple in mildly acidic to strong alkaline environments. The performance of the proposed indicator in the detection of shrimp freshness by contact and non-contact methods confirmed that does not necessarily need to be in direct contact with the shrimp and can show its reaction to the shrimp freshness even in the presence of shrimp. Besides, there is a strong correlation between the total volatile basic nitrogen contents due to shrimp spoilage and the color characteristics of the indicator. The results showed that the proposed indicator is good sensitive to pH changes and shows shrimp spoilage through color changes. Therefore, this colorimetric indicator can be easily used in smart packaging.

**Conflict of Interest:** None declared.

**Keywords:** Shrimp, Spoilage, Polymeric Coloring indicator, Hematoxylin

## طراحی و ساخت حسگر رنگ‌سنجی جدید برپایه همتوکسیلین به منظور شناسایی تازگی میگو در طی مدت نگهداری

سمیرا مزیدی<sup>۱</sup>، نوید نصیری‌زاده<sup>۲\*</sup>، محمد میرجلیلی<sup>۳</sup>، مسعود روحانی مقدم<sup>۴</sup>، محمدعلی شیرغلامی<sup>۵</sup>

۱. دانشجوی دکتری پلیمر، گروه مهندسی نساجی و پلیمر، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران

۲. استاد، گروه مهندسی نساجی و پلیمر، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران

۳. استاد، گروه مهندسی نساجی و پلیمر، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران

۴. دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی عصر رفسنجان، رفسنجان، ایران

۵. استادیار گروه مهندسی نساجی و پلیمر، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران

\*نویسنده مسئول مکاتبات: nasirizadeh@iauyazd.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۹/۸/۱۰ پذیرش نهایی: ۹۹/۱۱/۱۵)

### چکیده

میگو یکی از غذاهای دریایی است که نقش زیادی در سلامتی انسان ایفا می‌کند. میگو به دلیل دارا بودن اسیدهای چرب غیراشباع خیلی زود فاسد می‌شود. این در حالی است که با تشخیص به‌موقع و زودهنگام آن می‌توان از زیان‌های اقتصادی جلوگیری کرد. برای این امر، روش‌های مختلفی جهت تشخیص تازگی میگو استفاده می‌شود که معمول‌ترین آن‌ها بررسی حسی و ظاهری میگو، آزمایش‌های شیمیایی و میکروبی می‌باشند. در این پژوهش یک نشانگر رنگی با استفاده از فیلم زیست‌تخریب‌پذیر پلی‌وینیل‌الکل / کیتوسان و بر مبنای تغییرات رنگ همتوکسیلین در برابر pH طراحی شد. تغییرات pH، میزان بازهای نیتروژنی فرار و عوامل رنگ‌سنجی نمونه‌های میگو در اثر تماس با این نشانگر رنگی مورد بررسی قرار گرفت. نشانگر رنگی پیشنهادشده در پاسخ به pH دامنه رنگ متنوعی از زرد روشن تا بنفش تیره را در محیط اسیدی ملایم تا بازی قوی از خود نشان می‌دهد. عملکرد فیلم نشانگر پیشنهادی در تشخیص تازگی میگو به روش تماسی و غیر تماسی تأیید کرد که الزاماً نیازی نیست تا نشانگر در تماس مستقیم با میگو باشد و قابلیت آن را دارد که حتی در مجاورت میگو عکس‌العمل خود را نسبت به تازگی میگو نشان دهد. علاوه بر آن، همبستگی قوی بین مقدار کل بازهای نیتروژنی فرار ناشی از فساد میگو و مشخصه‌های رنگی نشانگر وجود دارد. در مجموع، می‌توان بیان داشت که نشانگر حساسیت بسیار خوبی نسبت به تغییرات pH دارد و فاسدشدن میگو را با توجه به تغییر رنگ نشان می‌دهد. بنابراین می‌توان به راحتی آن را در بسته‌بندی‌های هوشمند به کار برد.

واژه‌های کلیدی: میگو، فساد، نشانگر رنگی، همتوکسیلین

## مقدمه

رشد جامعه بشری به گونه‌ای است که میزان تقاضا برای مواد غذایی هر ساله رو به افزایش است، از این رو، تولید مواد غذایی نیز به سرعت در حال افزایش است (Mercier *et al.*, 2017). از سوی دیگر، بسیاری از این مواد غذایی به خاطر حساسیت بالا به عوامل محیطی، بلافاصله بعد از تولید باید در بسته‌بندی‌های مخصوص خود قرار گرفته و انواع مواد غذایی غیر حساس نیز برای پخش و صادرات به بسته‌بندی معمولی‌تر محتاج هستند. مهم‌ترین هدف بسته‌بندی‌های معمولی جدا کردن ماده غذایی از محیط اطراف و جلوگیری از تماس آن با عوامل آلوده‌کننده یا فاسد کننده خارجی است. این در حالی است که این خصوصیات تأمین‌کننده نیاز صنعت مواد غذایی در جامعه امروز نمی‌باشد (Müller and Schmid, 2019). اغلب پیشرفت‌ها در تولیدات بسته‌بندی مدرن به شیوه‌ای طراحی می‌شوند که منجر به کاهش هزینه‌ها، دسترسی بهتر و بیشتر و کاهش کیفیت خوراکی‌ها شوند. امروزه برای بهبود بسته‌بندی مواد غذایی، راه‌حل‌های مختلفی ارائه می‌شود که دارای سه جنبه مهم خاصیت ضد میکروبی بسته‌بندی، مناسب‌ترین مواد برای تولید بسته‌بندی و تکنیک‌های تولید آن‌ها می‌باشند (Yildirim *et al.*, 2018).

یکی از بسته‌بندی‌های نسل جدید، بسته‌بندی هوشمند نام‌گذاری شده‌اند. بارزترین ویژگی نسل جدید بسته‌بندی، حساسیت به تغییرات محیطی در طول مدت نگهداری مواد غذایی بوده به نحوی که مجموعه بسته‌بندی به صورت خودکار نسبت به تغییرات نامطلوب مورد انتظار از خود ویژگی مناسبی نمایش دهند (Nemecek *et al.*, 2016). در واقع بسته‌بندی‌های

هوشمند سیستم‌هایی هستند که قادر به انجام عملکردهای هوشمندانه (نظیر تشخیص، حس کردن، ثبت کردن، ردیابی، ارتباط و به کار بردن منطق علمی) به منظور تسهیل تصمیم‌گیری در جهت افزایش زمان ماندگاری، افزایش ایمنی، بهبود کیفیت، فراهم کردن اطلاعات و هشدار درباره مشکلات احتمالی می‌باشند (Chowdhury and Morey, 2019). در اغلب موارد، این بسته‌بندی‌ها دارای نشانگرهایی هستند که روی سطح بسته‌بندی قرار گرفته و می‌تواند نقش اطلاع‌رسانی و آگاهی بخشی و هشداردهنده برای تولیدکننده یا مصرف‌کننده داشته باشد. نحوه عملکرد این بسته‌بندی‌های هوشمند به این گونه است که نشانگرهای موجود در آن‌ها نسبت به برخی موارد حساس بوده و از خود در مدت‌زمان مناسب واکنش نشان می‌دهند؛ از جمله تغییرات دمایی و زمانی که اگر شرایط نگهداری ماده غذایی مناسب نباشد، نشانگر این موارد را نشان می‌دهد (Taoukis and Labuza, 2006). با این عملکرد، نشانگرهای بسته‌بندی هوشمند می‌تواند تولیدکننده، فروشنده و مصرف‌کننده را از تازگی یا فساد یک ماده غذایی مطلع ساخته و ایشان را از مسمومیت غذایی ناشی از تشخیص ندادن فساد در فرآورده‌های غذایی مطلع سازد. لازم به ذکر است که در برخی از موارد مسمومیت‌ها می‌تواند حتی به مرگ آن‌ها نیز منتهی شود (Biji *et al.*, 2015).

به‌رغم همه نامهربانی‌هایی که انسان به محیط‌زیست داشته، طبیعت همیشه الگویی مناسب برای نسل بشر بوده است. پژوهشگران می‌توانند با الگوبرداری از پدیده‌های طبیعی، بهترین مکانیزم‌ها و بهترین مهندسی‌ها را از دل آن بیرون کشیده و به صورت مصنوعی در

کویونوزالین از خود نشان دادند (Luo and Lim, 2020). یک نشانگر رنگ‌سنجی بر پایه کاغذ سلولزی آغشته به عصاره استخراج‌شده از گل‌های اطلس وحشی (*Ruellia simplex flowers*) را به‌منظور تشخیص تازگی میگو تهیه نمودند. این نشانگر تازگی در تماس با میگوی تازه به رنگ صورتی است و در تماس با میگوی فاسد به بنفش تغییر رنگ می‌دهد (Listyarini et al., 2018). از نانو الیاف استات سلولز آغشته به آلزارین نیز به‌عنوان حسگرهای رنگی به‌منظور تشخیص تازگی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده شده است. نانو الیاف تهیه‌شده در طی دو روز اول تماس با ماهی، تغییر رنگی را نشان ندادند. اما پس از ۴ تا ۱۲ روز رنگ آن از قرمز آجری تا بنفش تغییر یافت (Aghaei et al., 2018).

مطالعات اولیه بر روی تغییرات رنگی هماتوکسیلین نشان داد که این رنگ‌دانه طبیعی نسبت به pH محیط حساس است و تغییرات خود را به‌صورت طیف رنگی پیوسته نشان می‌دهد. از این رو، در این مطالعه، از تغییرات رنگی هماتوکسیلین نسبت به pH به‌منظور ساخت نشانگرهای رنگی تازگی برای اولین بار به‌منظور تشخیص فساد (یا تازگی) میگو بهره گرفته شده است. مخلوط پلیمری کیتوسان و پلی وینیل الکل حاوی هماتوکسیلین تهیه‌شده و به‌عنوان نشانگر رنگی تازگی مورد استفاده قرار گرفت. خصوصیات نشانگرهای تازگی پیشنهادی نظیر تورم‌پذیری، استحکام، تغییرات شاخص‌های رنگی مورد مطالعه و بحث قرار گرفت.

ماشین‌آلات و دست‌ساخته‌های خود به کار ببرند (Boo et al., 2012). یکی از این پدیده‌ها در دل درخت بقم (یا لاگ‌وود) نهفته است. هماتوکسیلین، رنگ‌دانه طبیعی گرفته‌شده از برگ این درختان است که به شرایط محیطی حساس بوده و با تغییر رنگ به آن‌ها پاسخ نشان می‌دهد. این ترکیب اغلب در مطالعات بافت‌شناسی به‌کار برده می‌شود (Kahr et al., 1998).

در خصوص نشانگرهای برگرفته از طبیعت مطالعات متعددی انجام یافته است. در مطالعه‌ای از عصاره‌هایی شامل کورکومین و انتوسیانین‌های حساس به pH برای تهیه یک فیلم نشانگر حساس به‌منظور تشخیص تازگی گوشت ماهی استفاده شده است. فیلم نشانگر پیشنهادی بر پایه نشاسته، پلی وینیل الکل و گلیسرول می‌باشد که عصاره موردنظر به ماتریس پلیمری افزوده شده است. این فیلم نشانگر سه رنگ متفاوت (زرد، بنفش و قهوه‌ای) ایجاد می‌کند که رنگ‌ها نشان‌دهنده تازه بودن، نیمه تازه و فساد ماهی است (Chen et al., 2020). یک فیلم حساس به pH حاوی عصاره استخراج‌شده از جلبک دریایی (*Lycium ruthenicum Murr*) را برای تشخیص تازگی میگو طراحی و تولید شد. فیلم‌های تهیه‌شده در pH های متفاوت تغییرات رنگی برگشت‌پذیر محسوسی ایجاد می‌کند (Liu et al., 2019). در مطالعه‌ای دیگر پژوهشگران با تکیه بر تغییر رنگ مشتقات سینامیل و کویونوزالین نسبت به آمونیاک، رنگ‌های نشانگری را سنتز نمودند که در تماس با آمین‌های فرار حاصل از فساد ماهی، تغییر رنگ می‌دهند. مشتقات سینامیل در تماس با آمین‌هایی نظیر آمونیاک، تری‌متیل آمین، تری اتیل آمین، دی‌متیل آمین، پایپریدین و هیدارزین دامنه طیفی متنوع‌تری نسبت به مشتقات

## مواد و روش‌ها

## - مواد

پلی وینیل الکل (Merck, Germany) با خلوص ۹۵ درصد و کیتوسان (Merck, Germany) برای ساخت فیلم‌های نشانگر پلیمری استفاده شد. در فرآیند تهیه این فیلم‌ها از اسید استیک ۱۰۰ درصد (Merck, Germany) برای حل نمودن کیتوسان استفاده شد. هماتوکسیلین (Merck, Germany) به‌عنوان شناساگر رنگی در تهیهی فیلم‌های نشانگر پلیمری استفاده شد. از تری‌پلی‌فسفات سدیم ۹۹ درصد (Fluka, Switzerland) به‌عنوان عامل پایدارکننده، هیدروکسید سدیم ۹۸ درصد (Merck, Germany) و اسید فسفریک ۸۵ درصد (Merck, Germany) برای تهیهی محلول‌های بافری موردنیاز استفاده شد.

## - روش تهیه فیلم نشانگر پلیمری

به‌منظور تهیه فیلم‌های نشانگر پلیمری در ابتدا، محلول‌های آبی از پلی‌وینیل‌الکل (۰/۱ g/L) و کیتوسان (۰/۱ g/L) با نسبت مشخص ۳ به ۷ باهم مخلوط گردیدند (۱۰ mL)، سپس ۰/۰۱ g هماتوکسیلین (۳/۰ mM) و ۱/۲ mL تری‌پلی‌فسفات سدیم ۰/۱ درصد وزنی به آن اضافه گردید، pH محلول با استفاده از محلول هیدروکسید سدیم برابر با ۶/۰ تنظیم و مخلوط حاصل به درون پتری‌دیش (۱۰ میلی‌لیتری) منتقل و به مدت ۴۸ ساعت در دمای محیط خشک شد. در مرحلهی بعد فیلم‌های تهیه‌شده به‌اندازه (۱ × ۴ cm) بریده‌شده و

به‌منظور انجام آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

## - پاسخ رنگی هماتوکسیلین و نشانگر تهیه‌شده به pH های مختلف

پاسخ هماتوکسیلین و کارایی نشانگر رنگی تهیه‌شده نسبت به pH های مختلف و همچنین نسبت به روند فساد میگو در طی زمان با استفاده از پارامترهای رنگی استخراج‌شده با کمک طیف‌سنج Lambda 35 Perkin Elmer مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی تغییرات رنگی نشانگر نسبت به pH، محلول‌های بافر فسفات M ۰/۱ با pH های مختلف با استفاده از مخلوط اسید فسفریک و هیدروکسید سدیم تهیه شدند. نمونه‌هایی به ابعاد ۱ × ۴ cm از نشانگرهای رنگی بریده‌شده و در محلول‌های بافری غوطه‌ور گردیدند.

همچنین، نمونه‌های نشانگر تهیه‌شده در تماس با میگو قرار داده‌شده و پس از ۲۴ ساعت و اطمینان از فساد میگو، نمونه‌ها جدا شده و برای مطالعات رنگ‌سنجی استفاده شدند. نمونه‌های خشک‌شده به دستگاه طیف‌سنج منتقل و پارامترهای رنگی  $L^*$  (روشنایی)،  $a^*$  (قرمزی-سبزی) و  $b^*$  (زردی-آبی) هرکدام به روش طیف‌سنجی انعکاسی استخراج گردید. اختلاف کلی رنگ نمونه‌ها قبل و بعد از تماس با محلول‌های بافری در حین آزمایش‌های اولیه و یا در حضور نمونه‌های مختلف میگو در خصوص آزمایش‌های ارزیابی شناساگر با استفاده از معادله (۱) محاسبه شده است.

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad \text{معادله (۱)}$$

نمونه‌ها در داخل پتری‌دیش‌های حاوی ۳۰ mL آب مقطر قرار داده و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از ۲۰ دقیقه، در زمان‌های مختلف نمونه‌ها از پتری‌دیش برداشته و به آرامی آب اضافی آن‌ها با کاغذ فیلتر گرفته و وزن نهایی فیلم‌ها تعیین شد. درصد شاخص تورم با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد که در آن  $W_1$  بیانگر وزن نمونه خشک و  $W_2$  مربوط به وزن نمونه متورم شده می‌باشد.

$$\text{Swell Index (\%)} = \left( \frac{W_2 - W_1}{W_1} \right) \times 100$$

خصوصیات مکانیکی شامل مقاومت فیلم در برابر پارگی (Tensile strength) (TS) و میزان کشش تا نقطه پاره شدن (Elongation at break) (E) بر اساس روش ASTM شماره D۸۸۲ اندازه‌گیری شد. از هر فیلم، نوارهایی در اندازه  $7 \times 1$  cm تهیه و مقاومت در برابر پارگی و میزان کشش با دستگاه یونیورسال تعیین شد. فاصله اولیه بین دو فک دستگاه ۵۰ mm و فیلم‌ها با لود سل ۵۰ N و با سرعت ۱ mm/s کشیده شدند.

### یافته‌ها

#### - مشخصات سطحی نشانگر

نتایج حاصل از بررسی مورفولوژی سطح دو فیلم پلیمری مخلوط پلی وینیل الکل و کیتوسان در غیاب و حضور هماتوکسیلین به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی در شکل (۱) نشان داده شده است. همان‌گونه که در تصاویر SEM مشاهده می‌شود، سطح فیلم‌های پلیمری PVA/Ch متخلخل بوده و خلل و فرج در آن مشاهده می‌شود که می‌تواند در استحکام فیلم‌های تأثیر

در این معادله،  $L^*$ ،  $a^*$ ، and  $b^*$  شاخص‌های رنگی نشانگر در pH مختلف (بعد از فساد میگو) همچنین  $a_0^*$ ،  $L_0^*$  و  $b_0^*$  پارامترهای رنگی مربوط به نشانگر شاهد می‌باشد.

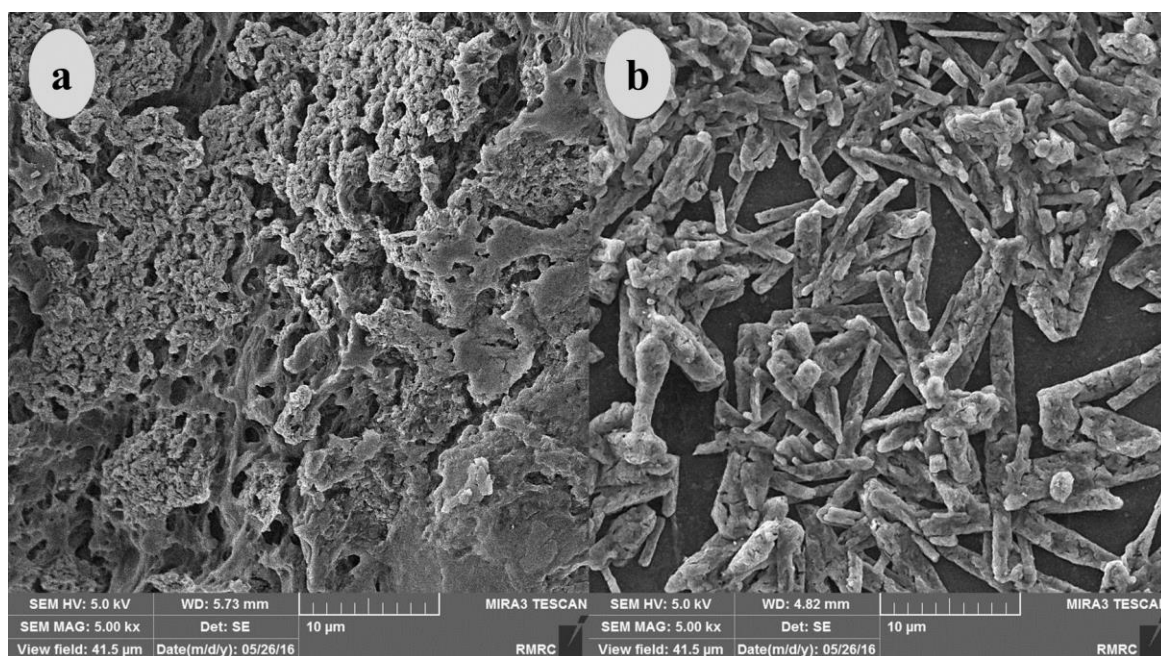
#### - تشریح نشانگر

نمونه فیلم‌های تهیه شده در دو گروه فیلم شاهد (کیتوسان/پلی وینیل الکل بدون هماتوکسیلین) و فیلم نشانگر تهیه شده (کیتوسان/پلی وینیل الکل حاوی هماتوکسیلین) تهیه شدند و خصوصیات آن‌ها نظیر شکل ظاهری، تورم‌پذیری، استحکام و گروه‌های ساختاری آن با روش‌های شرح داده شده در زیر مورد مطالعه قرار گرفتند. مورفولوژی سطحی نشانگرهای تهیه شده با کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی FESEM Mira 3-XMU (Tescan, Japan) مورد مطالعه قرار گرفته است. قبل از تصویربرداری، نمونه‌ها با استفاده از چسب نقره بر روی لایه آلومینیومی چسبانده و یک لایه بسیار نازک از طلا بر روی آن به منظور جلوگیری از شارژ الکتریکی پوشانده شد. برای بررسی گروه‌های ساختاری نشانگر از یک طیف‌سنج مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR – Burker Alpha) استفاده شد. در این تکنیک، قدرت تفکیک‌پذیری  $\text{cm}^{-1}$  در دامنه طول موجی  $4000 - 400$   $\text{cm}^{-1}$  به کاررفته است. نمونه نشانگرهای پلیمری با استفاده از پودر برمید پتاسیم (KBr) تحت خلأ کاملاً پودر شدند و با روش تراکمی به صورت دیسک تهیه شدند.

جهت بررسی میزان تورم نشانگرهای پلیمری از روش غوطه‌ورسازی در محیط آبی استفاده شد. قطعاتی در اندازه  $15 \times 5 \times 5$  mm از فیلم تهیه و جرم اولیه آن برحسب گرم با دقت  $0.0001$  گرم تعیین شد. سپس

امر می‌تواند در نتایج استحکام و میزان ازدیاد طول فیلم‌ها تأثیر مثبت داشته باشد. ضمن آن‌که مشاهده می‌شود تجمعاتی از ذرات بر سطح فیلم شکل گرفته است که به احتمال زیاد دسته‌هایی از مولکول‌های هماتوکسیلین می‌باشند که بر سطح تثبیت شده‌اند و می‌توانند در تماس با محیط اطراف قرار گیرند و پاسخ مناسب خود را نسبت به محرکه‌های محیطی نشان دهند.

منفی داشته باشد، که در بخش بررسی استحکام فیلم‌ها به آن پرداخته خواهد شد. این در حالی است که در نمونه فیلم‌های پلیمری حاوی هماتوکسیلین، مولکول‌های هماتوکسیلین توانسته‌اند به‌عنوان یک عامل هسته‌زا عمل کرده و زنجیره‌های پلیمری پلی وینیل الکل و کیتوسان را پیرامون خود نگه‌دارد، که در نتیجه فیلم متراکم‌تر و عاری از خلل و فرج مشاهده می‌شود. این



شکل ۱- تصویر میکروسکوپی از سطح (a) نشانگر شاهد (پلی وینیل الکل - کیتوسان بدون هماتوکسیلین) و (b) فیلم پلیمری حاوی هماتوکسیلین (نشانگر پیشنهادی)

#### - آنالیز FTIR

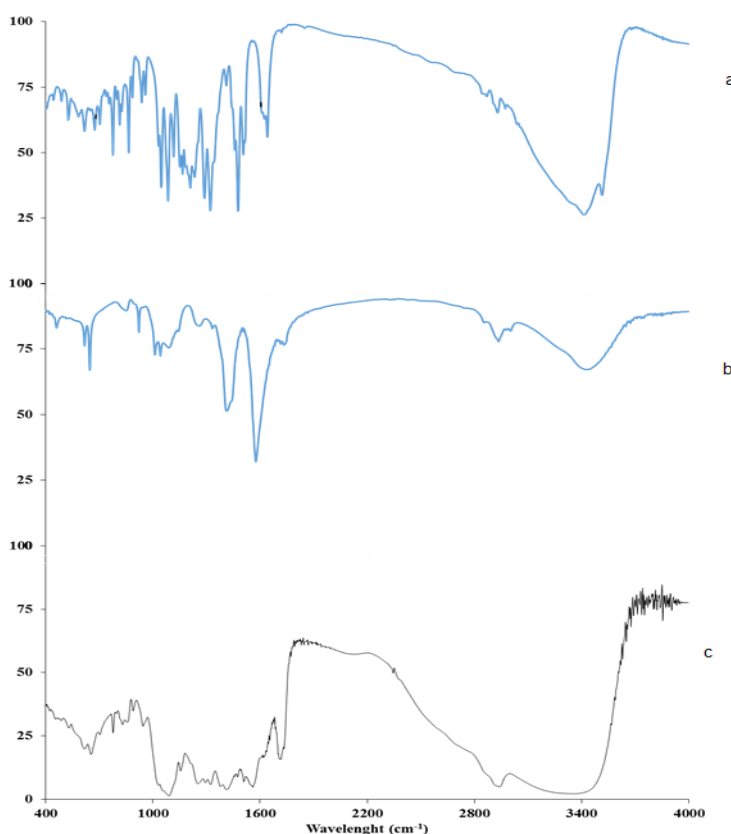
H است. پیک مشخصه  $1639\text{ cm}^{-1}$  نیز احتمالاً مربوط به پیوند دوگانه C=C است. همچنین پیک مشخصه موجود در دامنه  $3600 - 3500\text{ cm}^{-1}$  مربوط به پیوند کششی O-H می‌باشد. در طیف FTIR فیلم پلیمری PVA/Ch (نمودار b-1) یک پیک مشخصه در نزدیکی طول‌موج  $851\text{ cm}^{-1}$  مشاهده می‌شود که مربوط به پیوند C-C موجود در فیلم

در طیف FTIR مربوط به پودر هماتوکسیلین (نمودار a-1) اطلاعات زیر یافت شد: پیک موجود در  $864\text{ cm}^{-1}$  و  $775$  نیز مربوط به پیوند C-C موجود در هماتوکسیلین است. پیک‌های موجود در طول‌موج  $1045\text{ cm}^{-1}$  و  $1084$  نیز مربوط به پیوند C-O بوده و پیک‌های مشخصه موجود در  $1321\text{ cm}^{-1}$  و  $2929$  نیز مربوط به پیوند C-

که مربوط به گروه‌های عاملی OH در فیلم پلیمری حاصل بوده و پهن شدن پیک را نیز می‌توان به فراوانی تعداد این گروه‌ها نسبت داد. پیک مشخصه دیگر قابل مشاهده در طیف FTIR فیلم پلیمری مخلوط در ناحیه  $1700\text{ cm}^{-1}$  ظاهر شده است، که می‌تواند مربوط به پیوند دوگانه  $C=C$  باشد، که گروه مشخصه همتوکسیلین است. البته در طیف FTIR همتوکسیلین پیک مشخصه این پیوند در  $1639\text{ cm}^{-1}$  ظاهر شده بود، که پس از ترکیب شدن با فیلم پلیمری، پیک آن کمی به سمت طول‌موج‌های بالاتر جابجا شده است.

پلیمری مخلوط می‌باشد. همچنین پیک مشخصه موجود در  $1036\text{ cm}^{-1}$  و  $1079\text{ cm}^{-1}$  مربوط به پیوند کششی و ارتعاشی C-O است. پیک موجود در ناحیه  $1647\text{ cm}^{-1}$  مربوط به پیوند  $C=O$  آمید نوع یک بوده و پیک مشخصه مربوط به پیوند CH نیز پیرامون طول‌موج  $1379\text{ cm}^{-1}$  ظاهر شده است. پیوند NH از نوع آمید ۲ نیز در  $1559\text{ cm}^{-1}$  ظاهر شده و پیک مشخصه انتهایی پیرامون  $3367\text{ cm}^{-1}$  نیز مربوط به گروه OH می‌باشد.

در فیلم پلیمری PVA/Ch بعد از افزودن همتوکسیلین به ماتریس پلیمری (نمودار ۱- c) یک پیک با پهنای وسیع در دامنه  $2900 - 3500\text{ cm}^{-1}$  قابل مشاهده است،

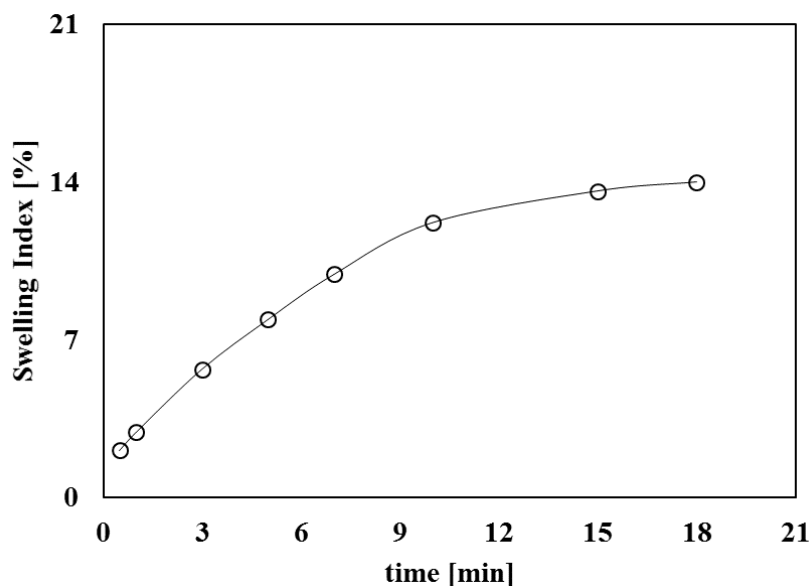


نمودار (۱) - طیف FTIR (a) همتوکسیلین، (b) فیلم PVA/Ch و (c) فیلم پلیمری PVA/Ch حاوی همتوکسیلین



## - میزان تورم‌پذیری نشانگر پلیمری

نتایج مربوط به درصد شاخص تورم فیلم‌های پلیمری در زمان‌های مختلف در نمودار (۲) نشان داده شده است.



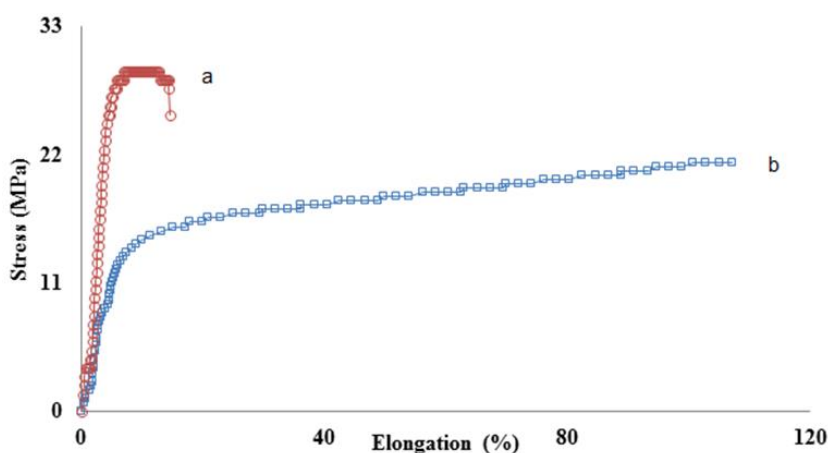
نمودار (۲) - نمودار تغییرات شاخص تورم نشانگر پلیمری نسبت به زمان حضور در آب مقطر

در جدول (۱) آورده شده است. در نمودار (۳) منحنی کشش-ازدیاد طول دو فیلم مخلوط PVA/Ch و فیلم‌های حاوی هماتوکسیلین برای مقایسه بهتر در یک نمودار نشان داده شده‌اند.

- بررسی استحکام و ازدیاد طول نشانگر پلیمری تهیه شده از لحاظ ظاهری، فیلم مخلوط پلیمری PVA/کیتوسان تهیه شده به رنگ زرد متمایل به سفید، انعطاف‌پذیر و تا حدودی محکم بوده و به راحتی از قالب جدا می‌شود. مقاومت در برابر پارگی و میزان کشش فیلم‌های تهیه شده

جدول (۱) - نتایج آزمون کشش و ازدیاد طول تا حد پارگی فیلم‌های پلیمری تهیه شده

نوع فیلم	میزان کشش (MPa)	ازدیاد طول تا حد پارگی (%)
PVA/Ch	28.0 ± 0.72	10.8 ± 0.32
PVA/Ch حاوی هماتوکسیلین	21.3 ± 0.63	10.7 ± 0.37



نمودار (۳) - مقایسه منحنی کشش - ازدیاد طول تا حد پارگی (a) فیلم پلیمری PVA/Ch و (b) فیلم پلیمری PVA/Ch حاوی هماتوکسیلین

#### - تغییرات رنگی نشانگر نسبت به pH محلول

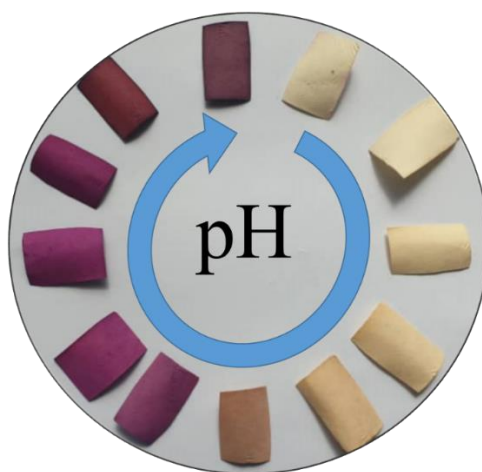
تغییرات رنگی هماتوکسیلین نسبت به محلول‌های بافری با pHهای مختلف در بازه ۱ الی ۱۲ در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌گردد تغییرات رنگی از شفاف (بدون رنگ) تا بنفش پررنگ در محلول‌های بافری حاوی هماتوکسیلین مشاهده می‌شود. در محیط کاملاً اسیدی  $1 < \text{pH} < 3$  محلول بدون رنگ است، در pH برابر ۴ رنگ محلول به زرد روشن تغییر کرده است. این در حالی است که رنگ محلول بافر فسفات با pH برابر ۵ به نارنجی تبدیل شده است. در محیط اسیدی ملایم و خنثی، یعنی pH برابر ۶ و ۷ تغییر رنگ به قرمز در محلول مشهود است. رنگ بنفش با شدت‌های کم تا زیاد در محیط بازی  $\text{pH} \geq 8$  در محلول‌های بافری حاوی هماتوکسیلین قابل مشاهده است.



شکل (۲) - پاسخ رنگی هماتوکسیلین به pH های مختلف

در pH های ۱ الی ۳، نشانگر بدون رنگ است. اما هنگامی که نشانگر در تماس با بافر با pH برابر ۴-۵ قرار گیرد، رنگ نشانگر به بژ (خردلی) تغییر می‌یابد. در pH برابر ۶ نشانگر به رنگ آجری است. رنگ بنفش روشن بر روی نشانگر در تماس با بافر با  $pH = 7-8$  ایجاد شده است. با افزایش pH تا ۱۲، شدت رنگ بنفش به تدریج زیاد شده است.

پاسخ رنگی نشانگرهای پلیمری تهیه شده نسبت به pH های مختلف در شکل (۳) ارائه شده است. به محض تماس نشانگر با محلول‌های بافری با pH های متفاوت در بازه ۱ الی ۱۲، تغییرات رنگی از بدون رنگ تا بنفش پررنگ در نشانگر مشاهده می‌گردد.



شکل (۳) - پاسخ رنگی نشانگر پلیمری تهیه شده به روش سل ژل در pH های مختلف

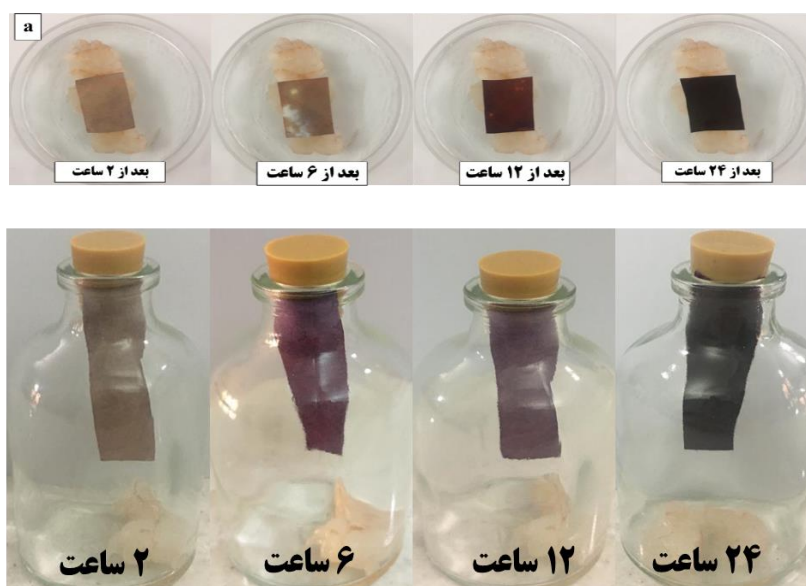
علاوه بر آن، پارامترهای رنگی استخراج شده از هر نشانگر در جدول (۴) به صورت خلاصه آورده شده است. ارقام این جدول بیان می‌دارد که مقدار  $L^*$  با افزایش زمان ماند میگو در محیط پیرامون کاهش می‌یابد، که این ارقام به معنی تیره‌تر شدن فیلم نشانگر می‌باشد. علاوه بر آن، علامت مثبت  $a^*$  و روند افزایشی آن همراه با زمان ماند میگو در محیط بر روی نمونه‌های نشانگر در تماس با میگو مشاهده می‌شود به عبارتی شید رنگی نشانگر بیشتر به سمت مقادیر قرمزی جابجا می‌شود. این امر بیانگر قابلیت تغییر رنگ نشانگر تهیه شده نسبت به تغییرات

#### - کنترل فساد میگو

به منظور تأیید عملکرد فیلم نشانگر تهیه شده در تشخیص فساد میگو، یک فیلم نشانگر پلیمری تهیه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط در تماس با میگو و بافاصله از میگو (غیر تماسی) قرار داده شد. تصاویر مربوط به تغییرات نشانگر در شکل (۴) نشان داده شده است. در تصاویر مشاهده می‌گردد که در هر دو روش تماسی و غیر تماسی، رنگ نشانگر تهیه شده نسبت به تغییرات میگو در طول زمان تغییر نموده است.

مقادیر  $\Delta E$  نمونه‌های نشانگر در تماس با میگو نیز بیان می‌دارد که اختلاف رنگی نشانگر از ۶،۱۶ در ساعت دوم باگذشت ۲۴ ساعت به ۱۷/۲۸ افزایش یافته است. شاخصه‌های رنگی نشانگر تأییدکننده تغییرات کیفی میگو (فساد) در طی نگهداری در دمای محیط می‌باشد. به این معنی که نشانگر به‌خوبی توانسته این تغییرات را حس کرده و گزارش نماید.

سطح میگو است. این تغییر رنگ را می‌توان به برهم‌کنش‌های شیمیایی میان همتوکسیلین و متابولیت‌های حاصل از فساد میگو نسبت داد. روند مشابهی نیز در مقادیر  $b^*$  (شاخص زردی یا آبی) دیده می‌شود، مقدار  $b^*$  از ۲۰/۴۹ در نمونه نشانگر قبل از تماس با میگو به ۲۵/۵۴ در نشانگر در تماس با میگو به مدت ۲۴ ساعت رسیده است، این امر به معنی شدت گرفتن شید آبی‌رنگ در نمونه‌های نشانگر می‌باشد.



شکل (۴) - استفاده از نشانگر پلیمری تهیه شده به‌منظور کنترل تازگی میگو در زمان‌های مختلف (a) روش تماسی (b) روش غیر تماسی

جدول (۴) - تغییرات پارامترهای رنگی نشانگر در تماس با میگوی تازه در طول زمان نگهداری در دمای محیط

زمان نگهداری (ساعت)					
۲۴	۱۲	۶	۲	۰	
۵۰/۶۹	۵۹/۲۱	۶۵/۳۳	۷۶/۰۳	۷۷/۶	L*
۲۱/۹۹	۲۰/۴۲	۱۹/۷۲	۱۷/۰۱	۱۱/۹	a*
۲۵/۵۴	۲۵/۱۳	۲۳/۸۷	۲۰/۸۴	۲۰/۴۹	b*
۱۷/۲۸	۱۵/۱۳	۱۱/۵۰	۶/۱۶	-	$\Delta E$
۹/۸	۷/۵	۷	۶/۸	۶/۴۸	pH
۵۱	۲۸	۲۰	۱۳	-	TVB-N

$L^*$ : میزان روشنایی،  $a^*$ : شاخص قرمزی-سبزی،  $b^*$ : شاخص زردی-آبی،  $\Delta E$ : اختلاف رنگ، TVB-N: مقدار کل ترکیبات فرار نیتروژن‌دار

سوی دیگر، مقدار TVBN که بیانگر ترکیبات فرار نیتروژن دار در بافت میگو است، بعد از ۲۴ ساعت به ۵۱ mg N/100 g افزایش یافته است.

وجود ارتباط معنادار میان پارامترهای رنگی نشانگر و مشخصه‌های فساد میگو (pH و TVBN) از طریق رسم گراف‌های همبستگی ارزیابی شد. خلاصه نتایج گراف‌های همبستگی پارامترهای رنگی با دو مشخصه فساد میگو در جدول (۵) آورده شده است.

- همبستگی میان pH، میزان گازهای فرار میگوی فاسد و اختلاف رنگی نشانگر

به منظور بررسی ارتباط میان تغییرات رنگی نشانگر با فساد میگو مقادیر pH و میزان ترکیبات فرار نیتروژن دار (به‌عنوان شاخصه‌های ایجاد ترکیبات آمینه در میگوی فاسد) اندازه‌گیری شد. نتایج این بررسی در جدول (۴) آورده شده است. میگوی تازه دارای pH حدود ۶/۵ است، که در اثر ماندن در فضای باز و رشد میکروارگانیسم‌ها، pH آن بعد از ۲۴ ساعت به ۹/۸ افزایش یافته است. از

جدول (۵) - نتایج ارتباط پارامترهای رنگی نشانگر تهیه‌شده نسبت به پارامترهای فساد میگو (pH و TVBN) نگهداری شده در دمای محیط

پارامترهای رنگی				پارامترهای فساد
$\Delta E$	$b^*$	$a^*$	$L^*$	
$R^2=0.8971$ $Y=2.261x+15.45$	$R^2=0.8276$ $Y=3.5384x-0.4791$	$R^2=0.9205$ $Y=4.6662x-12.622$	$R^2=0.8738$ $Y=9.4614x+20.855$	pH
$R^2=0.9422$ $Y=0.0834x+29.88$	$R^2=0.9671$ $Y=0.1378x+21.994$	$R^2=0.9878$ $Y=0.1741x+17.13$	$R^2=0.9773$ $Y=0.3604x+81.069$	TVB-N

$L^*$ : میزان روشنایی،  $a^*$ : شاخص قرمزی-سبزی،  $b^*$ : شاخص زردی-آبی،  $\Delta E$ : اختلاف رنگ، TVB-N: مقدار کل ترکیبات فرار نیتروژن دار

است. می‌توان این‌گونه بیان نمود که در طی ۱۵ دقیقه ابتدایی، مولکول‌های آب به‌سرعت در میان زنجیره‌های پلیمری کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل قرار گرفته و این زنجیره‌ها تا حد امکان از یکدیگر باز می‌شود (Ezati et al., 2019). پس از این مدت (۱۵ دقیقه) به دلیل اشباع فضای خالی میان زنجیره‌ها و عدم امکان باز شدن بیشتر زنجیره‌ها از یکدیگر، مولکول اضافی دیگری از آب نمی‌تواند وارد ساختار زنجیره پلیمری شده و اشباع می‌گردد.

در خصوص داده‌های حاصل از اندازه‌گیری استحکام، فیلم پلیمری PVA/Ch بدون هماتوکسیلین دارای میزان مقاومت در برابر پارگی بیشتری نسبت به نمونه مشابه حاوی هماتوکسیلین است. از نظر عددی، میزان مقاومت

## بحث و نتیجه‌گیری

هماتوکسیلین، رنگ‌دانه طبیعی گرفته‌شده از برگ درخت بقم است که به شرایط محیطی حساس بوده و با تغییر محدوده‌ی طول‌موج جذبی به آن‌ها پاسخ نشان می‌دهد. تغییرات رنگی در هماتوکسیلین به دلیل ساختار آنتوسیانین‌ها است که از کاتیون فلاویلیوم (رنگ قرمز) در شرایط اسیدی به کونیویدال بدون آب (quinoidal anhydrobase) (رنگ بنفش) در pH ۷ و ۸ تبدیل می‌گردد (Ebrahimititrashi et al., 2019).

نتایج تورم‌پذیری نشان می‌دهند که با افزایش مدت‌زمان حضور فیلم پلیمری کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل در آب، درصد شاخص تورم افزایش یافته و پس از مدت‌زمان ۱۵ دقیقه درصد تورم تغییر چندانی ننموده

حضور مولکول‌های هماتوکسیلین از یکپارچگی زنجیره‌های پلیمری کاسته؛ لذا استحکام فیلم کاهش یافته است. این روند کاهش در اثر افزودن رنگ‌دانه کلم قرمز در فیلم پلی‌وینیل الکل/کیتوسان گزارش شده است (Pereira Jr. et al., 2015). این در حالی است که حضور مولکول‌های رنگ‌دانه طبیعی مابین زنجیره‌های پلیمر و تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی مابین آن، ازدیاد طول تا حد پارگی را افزایش داده است.

عملکرد نشانگر تهیه‌شده نسبت به فساد میگو نشان داد که در روش تماسی، رنگ نشانگر بعد از ۲ ساعت به رنگ خاکی (قهوه‌ای کم‌رنگ) تغییر نموده است که به‌مرورزمان با فساد میگو رنگ آن به سمت بنفش تغییر می‌یابد. در اثر رشد میکروارگانیسم بر سطح بافت میگو، ترکیبات نیتروژن دار نظیر تری متیل آمین اکسید در بافت آن تجزیه‌شده و به تری متیل آمین و آمونیاک تبدیل می‌شود، این ترکیبات در محیط موجب افزایش pH محیط و قلیایی شدن محیط خواهند شد (Listyarini et al., 2018).

تغییرات رنگی نشانگر در روش غیر تماسی نیز مبین آن است که نیازی نیست تا نشانگر در تماس مستقیم با میگو قرار داشته باشد و این نشانگر قابلیت آن را دارد که حتی در مجاورت میگو عکس‌العمل خود را نسبت به‌تازگی یا فساد میگو نشان دهد. همان‌طور که بیان شد رنگ نشانگر تهیه‌شده نیز در تماس با محیط قلیایی به سمت شیدهای بنفش تغییر می‌کند. در نتیجه نشانگر تهیه‌شده با هماتوکسیلین در پاسخ به میگوی فاسد که در اثر فعل‌وانفعالات، محیط آن قلیایی شده، عکس‌العمل مناسب را نشان داده است.

در برابر پارگی فیلم PVA/Ch حدود ۲۸ MPa است، این در حالی است که مقدار مقاومت نمونه فیلم PVA/Ch حاوی هماتوکسیلین در برابر پارگی حدود ۲۱ MPa می‌باشد. نتایج میزان ازدیاد طول در برابر پارگی (میزان کشش) در مورد این دو فیلم برعکس می‌باشد. میزان ازدیاد طول فیلم پلیمری PVA/Ch حدود ۱۰ درصد است، درحالی‌که میزان ازدیاد طول تا حد پارگی فیلم PVA/Ch حاوی هماتوکسیلین حدود ۱۰۷ درصد می‌باشد. می‌توان این‌گونه پیشنهاد نمود که افزودن هماتوکسیلین به ماتریس پلیمری توانسته است میزان ازدیاد طول فیلم پلیمری را حدود ۱۰ برابر افزایش دهد، که این ویژگی می‌تواند در هنگام استفاده از فیلم‌های پلیمری تهیه‌شده به‌عنوان نشانگر در بدنه بسته‌بندی مفید باشد. با توجه به نتایج می‌توان عنوان داشت اگرچه استحکام فیلم پلیمری با افزودن ماده رنگی کاهش‌یافته است؛ لیکن این کاهش در حدی نیست که منجر به اختلال در کاربرد فیلم پلیمری با عنوان نشانگر رنگی گردد. از طرفی افزایش قابل توجه ازدیاد طول در فیلم حاوی ماده رنگی منجر به توسعه کاربرد آن در فیلم‌های بسته‌بندی که اغلب پس از بسته‌بندی با افزایش حجم و فرم مواجه می‌باشند؛ می‌گردد. دلیل کاهش استحکام و افزایش ازدیاد طول را می‌توان از یک‌سو ناشی از کاهش پیوندهای هیدروژنی در بین زنجیره‌های پلیمری در نمونه محتوی رنگ‌دانه دانست. در واقع پیوندهای هیدروژنی و به‌طورکلی جاذبه‌ای بین مولکولی به‌جای این‌که مابین زنجیره‌های پلیمری تشکیل شوند و بر استحکام فیلم پلیمری بیفزایند، مابین زنجیره‌های پلیمری و هماتوکسیلین که دارای گروه‌های هیدروکسیل است، تشکیل شده‌اند.

بار برای تشخیص تازگی یا فساد میگو استفاده شده است. مخلوط پلیمری پلی‌وینیل الکل/کیتوسان به عنوان بستر فیلم پلیمری برای ساخت نشانگر رنگی آماده گردید. این نشانگر رنگی برای کنترل فساد میگو در پاسخ به pH محیط اطراف خود دامنه طیفی متنوعی از زرد روشن تا بنفش تیره را در pH های اسیدی ملایم تا بازی قوی از خود نشان داد. میزان تورم پذیری، استحکام و مشخصات سطحی نشانگر پیشنهادی با FTIR و FESM مطالعه شد. عملکرد فیلم نشانگر رنگی تهیه شده در تشخیص فساد میگو به روش تماسی و غیر تماسی بررسی شد. پاسخ نشانگر به صورت بصری و همچنین مشخصه‌های رنگی استخراج شده تأییدکننده عملکرد مناسب نشانگر در هر دو روش تماسی و غیر تماسی می‌باشد. به بیان ساده‌تر، الزاماً نیازی نیست تا نشانگر در تماس مستقیم با میگو قرار داشته باشد و این نشانگر قابلیت آن را دارد که حتی در مجاورت میگو عکس‌العمل خود را نسبت به تازگی یا فساد میگو نشان دهد. علاوه بر آن، ارتباط میان پارامترهای رنگی نشانگر و مشخصه‌های فساد میگو نظیر pH و میزان ترکیبات فرار نیتروژن دار (TVBN) بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که همبستگی قوی بین TVBN و مشخصه‌های رنگی نشانگر در هنگام فساد میگو وجود دارد.

### تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی برای اعلام ندارند.

میگوی تازه حاوی تری متیل آمین اکسید است، که این ترکیب در اثر رشد و تکثیر باکتری‌ها به تری متیل آمین تبدیل می‌گردد. ترکیبات فراری نظیر آمونیاک، دی متیل آمین و تری متیل آمین با عنوان ترکیبات ازته فرار (Total Volatile Base Nitrogen TVB-N) شناخته می‌شوند. در اثر تجزیه میکروبی فرآورده‌های دریایی به‌ویژه ماهی و میگو این ترکیبات در بافت آن‌ها تشکیل می‌شوند، که از این شاخص می‌توان برای تشخیص آلودگی ماده غذایی (شاخص تازگی) بهره برد. رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌ها در میگو موجب تبدیل تری متیل آمین اکسید به تری متیل آمین و در نهایت ایجاد آمونیاک در عضله میگو می‌گردد. به طوری که حضور این ترکیبات در میگوی فاسد، موجب قلیایی شدن محیط خواهد شد؛ این امر با تغییر شید رنگی نشانگر قابل تشخیص است. در کل، به دلیل تشکیل آمونیاک و دیگر آمین‌های فرار سطح TVB-N، pH محیط افزایش خواهد یافت (Kuswandi and Nurfawaidi, 2017).

در مجموع با توجه به نتایج حاصل می‌توان اظهار داشت که همبستگی قوی بین TVBN و مشخصه‌های رنگی نشانگر، در هنگام فساد میگو وجود دارد. در این میان پارامتر  $a^*$  ارتباط قابل توجهی با دو پارامتر نشان‌دهنده فساد میگو یعنی pH و TVBN از خود نشان می‌دهد. از این رو می‌توان از پارامتر رنگی  $a^*$  برای اندازه‌گیری کمی فساد میگو با استفاده از نشانگر رنگی برپایه همتوکسیلین استفاده نمود.

رنگ‌دانه طبیعی همتوکسیلین نسبت به تغییرات pH حساس بوده و در این مطالعه از این ویژگی برای اولین

## منابع

- Aghaei, Z., Emadzadeh, B., Ghorani, B. and Kadkhodae, R. (2018). Cellulose Acetate Nanofibres Containing Alizarin as a Halochromic Sensor for the Qualitative Assessment of Rainbow Trout Fish Spoilage. *Food and Bioprocess Technology*, 11: 1087–1095.
- Biji, K. B., Ravishankar, C. N., Mohan, C. O. and Srinivasa Gopal T. K. (2015). Smart packaging systems for food applications: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10): 6125–6135.
- Boo, H. O., Hwang, S. J., Bae, C. S., Park, S. H., Heo, B. G. and Gorinstein S. (2012). Extraction and characterization of some natural plant pigments. *Industrial and Crops Production*, 40: 129–135.
- Chen, H., Zhang, M., Bhandari, B. and Yang, C. (2020). Novel pH-sensitive films containing curcumin and anthocyanins to monitor fish freshness. *Food Hydrocolloids*, 100: 105438.
- Chowdhury, E. U. and Morey, A. (2019). Intelligent Packaging for Poultry Industry. *Journal of Applied Poultry Research*, 28 (4): 791–800.
- Ebrahimi Tirtashi, F., Moradi, M., Tajik, H., Forough, M., Ezati, P., Kuswandi, B. (2019). Cellulose/chitosan pH-responsive indicator incorporated with carrot anthocyanins for intelligent food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136: 920-926.
- Ezati, P., Tajik, H. and Moradi, M. (2019). Fabrication and characterization of alizarin colorimetric indicator based on cellulose-chitosan to monitor the freshness of minced beef. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 285: 519–528.
- Kahr, B., Lovell, S. and Subramony, J. (1998). The progress of logwood extract. *Chirality*. 10: 66 - 77.
- Kuswandi, B. and Nurfawaidi, A. (2017) On-package dual sensors label based on pH indicators for real-time monitoring of beef freshness. *Food Control*, 82: 91–100.
- Listyarini, A., Sholihah, W. and Imawan, C. (2018). A paper-based Colorimetric Indicator Label using Natural Dye for Monitoring Shrimp Spoilage. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 367: 012045.
- Liu, J., Wang, H., Guo, M., Li, L., Chen, M., Jiang, S., Li, X. and Jiang S. (2019). Extract from *Lycium ruthenicum* Murr. Incorporating  $\kappa$ -carrageenan colorimetric film with a wide pH-sensing range for food freshness monitoring. *Food Hydrocolloids*, 94: 1-10.
- Luo, X. and Lim, L.T. (2019). Cinnamil- and Quinoxaline-Derivative Indicator Dyes for Detecting Volatile Amines in Fish Spoilage. *Molecules*, 24: 3673.
- Mercier, S., Villeneuve, S., Mondor, M. and I. Uysal, (2017). Time-Temperature Management Along the Food Cold Chain: A Review of Recent Developments. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16: 647-667.
- Müller, P. and Schmid, M. (2019). Intelligent Packaging in the Food Sector: A Brief Overview. *Foods (Basel, Switzerland)*, 8:16.
- Nemecek, T., Jungbluth, N., Milàì Canals, L. and Schenck, R. (2016). Environmental impacts of food consumption and nutrition: where are we and what is next? *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 21: 607–620.
- Pereira Jr., V. A., de Arruda, I. N. Q. and Stefani R. (2015). Active chitosan/PVA films with anthocyanins from *Brassica oleraceae* (Red Cabbage) as Time-Temperature Indicators for application in intelligent food packaging. *Food Hydrocolloids*, 43: 180-188.
- Taoukis, P. and Labuza, T. (2006). Applicability of Time-Temperature Indicators as Shelf Life Monitors of Food Products. *Journal of Food Science*, 54: 783 - 788.
- Yildirim, S., Röcker, B., Pettersen, M. K., Nilsen-Nygaard, J., Ayhan Z., Rutkaite R., Radusin T., Suminska P., Marcos B. and Coma V. (2018). Active Packaging Applications for Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17: 165-199.