



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

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM INDICADOR DE TEMPO
E TEMPERATURA ENZIMÁTICO PARA MONITORAMENTO DA QUALIDADE
EM PRODUTOS PERECÍVEIS
DÉBORA CRAVEIRO VIEIRA**

Dr. CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ (*in memorian*)

DRA. VILÁSIA GUIMARÃES MARTINS

Orientador

DRA. ANA PAULA DUTRA RESEM BRIZIO

Co-orientador

RIO GRANDE, RS

2022



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

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM INDICADOR DE TEMPO
E TEMPERATURA ENZIMÁTICO PARA MONITORAMENTO DA QUALIDADE
EM PRODUTOS PERECÍVEIS
DÉBORA CRAVEIRO VIEIRA**

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

Dr. CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ (*in memoriam*)

DRA. VILÁSIA GUIMARÃES MARTINS

Orientador

DRA. ANA PAULA DUTRA RESEM BRIZIO

Co-orientador

RIO GRANDE, RS

2022

Ficha Catalográfica

V658d Vieira, Débora Craveiro.

Desenvolvimento e caracterização de um indicador de tempo e temperatura enzimático para monitoramento da qualidade em produtos perecíveis / Débora Craveiro Vieira. – 2022.

175 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2022.

Orientador: Dr. Carlos Prentice-Hernández (*in memoriam*).

Orientadora: Dra. Vilásia Guimarães Martins.

Coorientadora: Dra. Ana Paula Dutra Resem Brizio.

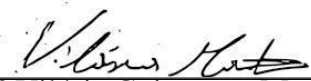
1. Enzima α -amilase 2. Amido-iodo 3. ITT enzimático
4. Pescado 5. Cenoura em cubos I. Prentice-Hernández, Carlos
- II. Martins, Vilásia Guimarães III. Brizio, Ana Paula Dutra Resem
- IV. Título.

CDU 664.8

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

APROVAÇÃO

Tese defendida por Débora Craveiro Vieira, com orientação da Prof.^a Dr.^a Vilásia Guimarães Martins, aprovada em 02 de março de 2022, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:


Prof.^a Dr.^a Vilásia Guimarães Martins – FURG


Prof.^a Dr.^a Giniani Carla Dors – UFPEL


Prof.^a Dr.^a Myriam de las Mercedes Salas Mellado - FURG


Prof.^a Dr.^a Juliana Machado Latorres - FURG

Dedico esta tese a minha mãe Marília Craveiro Vieira e meu pai Adalberto Silvado Vieira que em vida, sempre me ensinaram o valor da educação e aprendizagem.

*Nasceste no lar de que precisavas.
Vestiste o corpo físico que merecias.
Moras no melhor lugar que Deus poderia te proporcionar, de acordo com teu adiantamento.
Possuis os recursos financeiros coerentes com as tuas necessidades; nem mais nem menos,
mas o justo para as tuas lutas terrenas.
Teu ambiente de trabalho é o que elegeste espontaneamente para a tua realização.
Teus parentes e amigos são as almas que atraíste com tuas próprias afinidades.
Portanto, teu destino está constantemente sob teu controle.
Tu escolhes, recolhes, eleges, atraís, buscas, expulsas, modificas tudo aquilo que te rodeia a
existência.
Teus pensamentos e vontades são a chave de teus atos e atitudes, são as fontes de atração e
de repulsão na tua jornada vivencial.
Não reclames nem te faças de vítima. Antes de tudo, analisa e observa.
A mudança está em tuas mãos.
Reprograma tua meta. Busca o bem e viverás melhor.*

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Obrigada minha Mãe Marília e Pai Adalberto, meus maiores exemplos de motivação, vocês são a razão principal para estar finalizando mais uma etapa profissional em minha vida. Minha mãe foi a pessoa que mais acreditou em mim, intensificando minhas competências para que eu pudesse ter a sabedoria para superar os meus desafios ao longo deste caminho. E meu pai que através do seu exemplo de humildade e generosidade, me mostrou que devemos caminhar perante vida seguindo o propósito do coração.

Gostaria de agradecer a mim, por superar diversas dificuldades durante o período do doutorado, sendo o primeiro deles a escrita. E hoje eu entendo que precisamos aprender a escrever de forma científica dentro de um padrão, com formas exatas de como mostrar uma ideia. Foi importante entender que neste momento eu precisava ter um padrão, para passar as informações necessárias de um estudo científico. Portanto, agradeço aos Professores Carlos, Márcia, Vilásia e Ana Paula por terem me auxiliado neste processo.

Ao professor orientador Carlos Prentice, que me surpreendeu demais, que através do seu ensino conseguiu transferir mais do que conhecimento, mas humildade, dedicação e amor a tudo que fazia, sempre confiando e motivando a mim e seus alunos. Sua partida deixou muita saudade, mas também uma motivação forte para publicar um livro, sobre um tema que ele gostava muito: “Sistemas inteligentes para o monitoramento da qualidade de pescado”.

Imenso obrigada a Walesca Echevengú e empresa Torquato Poentes e a Roberta e a Stephanie e a empresa Clean por apoiarem nesta pesquisa, disponibilizando seus insumos, tempo e sua confiança para realização deste estudo.

Aos membros da banca examinadora, que são profissionais que eu admiro e confio. Obrigada por corrigirem esta tese, contribuindo para obra. Agradeço a FURG por permitir um estudo de qualidade e gratuito. À CAPES pela concessão da bolsa de estudo, CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro ao projeto.

Agradeço as experiências como docente (1º e 2º estágio) e as aulas no Pré-Química, bem como as aulas da Geonara Tauchen, na disciplina de docência em ensino superior. Onde aprendi que para seguir a prática da docência, é necessário entender que precisamos aprender a ensinar. E que existem técnicas metodológicas visando as necessidades dos discentes, que a sala de aula é uma caminhada de vida.

E agradeço a meu namorado John, aos meus filhos, amigos, irmãos, sobrinhas, colegas de laboratório e a todos que passaram na minha vida neste período, que me deram uma palavra de motivação para o meu progresso e finalização desta tese. Ao meu filho, Rafael, que apesar de

ainda estar na minha barriga, é o motivo pelo qual me movo para eu ser um ser humano melhor!!!

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Quadro 1. Indicador de tempo e temperatura comerciais	48
Tabela 1 - Características da enzima Fungamyl® 800L	54
Tabela 2 - Concentrações de estabilizante (%) em três categorias principais (sais metálicos, aditivos e solventes orgânicos)	56
Continuação Tabela 2 - Concentrações de estabilizante (%) em três categorias principais (sais metálicos, aditivos e solventes orgânicos)	57
Tabela 3 - Atividade residual (%) da enzima α -amilase sob efeito dos estabilizantes	64
Tabela 4 - Constantes cinéticas calculadas para a α -amilase em relação aos diferentes estabilizantes e seus mecanismos de inibição	67
Tabela 5 - Custo final do produto	75

ARTIGO II

Tabela 1 - Método de Índice de Qualidade (MIQ) para peixe espadarte (<i>Xiphias gladius</i>) ...	95
Tabela 2 - Parâmetros cinéticos dos protótipos de ITT enzimáticos (1 a 6%) nas temperaturas 4, 10, 15, 25, 35°C	100
Tabela 3 - Efeito dos parâmetros cinéticos de <i>Arrhenius</i> do pescado nas temperaturas de 4, 10 e 15°C.....	105
Tabela 4 - Valores médios dos escores sensoriais das amostras do pescado espadarte armazenadas durante 8 dias.....	106

ARTIGO III

Tabela 1 - Escore médio para os atributos sensoriais utilizados na avaliação da cenoura minimamente processada em cubos	125
Tabela 2 - Efeito dos parâmetros cinéticos de <i>Arrhenius</i> da cenoura minimamente processada em cubos	129
Tabela 3 - Parâmetros cinéticos dos protótipos de ITT enzimáticos (0,2 a 6%) nas temperaturas 4, 10, 15, 25, 35°C	132

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da abordagem sistemática da reação do ITT enzimático.	44
---	----

ARTIGO I

Figura 1 – Esquema sequencial das etapas de validação dos princípios ativos (enzima e substrato) e elaboração do ITT	54
Figura 2 – Esquema do funcionamento do protótipo de ITT enzimático líquido	60
Figura 3 – Atividade enzimática da α -amilase submetida a diferentes pHs nas temperaturas de 4 °C (a) e 35 °C (b) em 184 dias.	62
Figura 4 – Gráficos de Lineweaver-Burk para avaliação da inibição da α -amilase em diferentes estabilizantes.....	66
Figura 5 – Estabilidade da α -amilase submetida aos diferentes estabilizantes nas temperaturas de 4°C e 35 °C	68
Figura 6 – Concentração do amido-iodo em diferentes concentrações de KI.....	69
*Letras minúsculas iguais para o mesmo dia, nas temperaturas (4 e 35 °C) e nos diferentes tratamentos KI (3; 5; 8%) indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$); (Média $\pm$ desvio-padrão).	69
Figura 7 – Concentração do amido-iodo em diferentes Ph a 4 °C (a) e 35 °C (b)	71
Figura 8 – Concentração do amido-iodo formado sob a ação dos estabilizantes digliconato de clorexidina a 4 °C (A) e 35 °C (B) e sorbato de potássio a 4 °C (C) e 35 °C (D).....	72
Figura 9 -Estabilidade do complexo do amido-iodo sob as temperaturas de 4° e 35°C	73
Letras iguais para mesma temperatura nos 180 dias, indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$); (Média $\pm$ desvio-padrão).	73
Figura 10 – Resposta à variação de cor (ΔE) apresentada pelos 6 protótipos de ITTe sem conservante (A) e com conservante sorbato de potássio (B) durante o armazenamento a 4 °C	74

ARTIGO II

Figura 1 - Protótipo de ITT enzimático líquido compartimentalizado; (1) enzima amilase, (2) solução de amido-iodo, (3) selagem interna e (4) selagem externa.....	90
Figura 2 - Desenvolvimento experimental para validação do protótipo ITT enzimático.....	91
Figura 3 - Embalagem exportação do pescado	93
Figura 4 - Esquema do funcionamento do protótipo de ITT enzimático líquido	97
Figura 5 - Descoloração dos protótipos de ITT submetidas a 4 °C (A), 10 °C (B), 15 °C (C), 25 °C (D), 35 °C (E) sem uso de conservante	97
Figura 6 - Descoloração dos protótipos de ITT submetidas em 4 °C (A), 10 °C (B), 15 °C (C), 25 °C (D), 35 °C (E) com uso de conservante (sorbato de potássio)	99
Figura 7 - Ln da constante de velocidade de resposta da descoloração dos ITT com 1 a 6 % de amilase sem conservantes (A) e com conservantes (B) plotados versus 1/T (K).....	100
Figura 8 - Contagem de <i>S. aureus</i> (■), <i>Enterobacteriaceae</i> (●), psicotróficas (▲) e <i>Pseudomonas</i> (▼) em pescado eviscerado no barco(A) e pescado eviscerado na indústria (B)	101
Figura 9 - Avaliação da vida útil do pescado espadarte através das mudanças de pH (A), N-BVT (B), <i>Pseudomonas</i> (C), psicotrófica (D), variação de cor (ΔE) submetida as temperaturas de 4, 10 e 15°C	103

ARTIGO III

Figura 1 - Fluxograma da cenoura em cubos	117
Figura 2 - Protótipo de ITT enzimático líquido compartimentalizado	118
Figura 3 - Alterações (log UFC/g) na contagem de psicotróficas (A), coliformes (B) para os tratamentos com cloro e ozônio	123
Figura 4 - Avaliação da vida útil da cenoura em cubos através das mudanças de pH (A), firmeza (B), psicotróficas (C), coliformes (D), BAL (E), bolores e leveduras (F) submetida as temperaturas de 4, 10 e 15°C	127
Figura 5 - Mudança de cor dos protótipos de ITT submetidas em 4°C (A), 10°C (B), 15°C (C), 25°C (D), 35°C (E)	130
Figura 6 - Ln da constante de velocidade de resposta da variação de cor dos ITT com 0,2 a 6% de amilase.....	131

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	42
RESUMO GERAL, ABSTRACT GERAL, INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS..	42
RESUMO GERAL	23
ABSTRACT	24
1 INTRODUÇÃO GERAL	25
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
CAPÍTULO II.....	29
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	31
1.1 VIDA ÚTIL DE ALIMENTOS PERECÍVEIS NA CADEIA DO FRIO.....	31
1.2 VIDA ÚTIL EM PESCADO	32
1.3 VIDA ÚTIL DOS VEGETAIS	35
1.4 EMBALAGEM INTELIGENTE	38
1.5 INDICADORES DE TEMPO E TEMPERATURA.....	39
1.5.1 Estudo cinético do ITT.....	40
1.6 INDICADORES DE TEMPO E TEMPERATURA ENZIMÁTICOS.....	42
1.7 ESTABILIDADE DA AMILASE	45
1.8 ESTABILIDADE DO AMIDO-IODO	46
1.9 ITTS COMERCIAIS.....	47
CAPÍTULO III	51
ARTIGO I - AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO PRINCÍPIO ATIVO PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM INDICADOR DE TEMPO E TEMPERATURA ENZIMÁTICO	52
RESUMO.....	52
1 INTRODUÇÃO.....	52
2 MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1 MATERIAL	53
2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA A-AMILASE.....	55
2.3 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA A-AMILASE SOB EFEITO DO PH E TEMPERATURA.....	55
2.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO USO DE ESTABILIZANTES NA ATIVIDADE DA ENZIMA A-AMILASE.....	55
2.4.1 Atividade inibitória dos estabilizantes sobre a enzima α-amilase.....	57
2.4.2 Estabilidade da enzima α-amilase frente a diferentes pHs e temperaturas.....	58
2.5 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO COMPLEXO AMIDO E IODO.....	58
2.6 ELABORAÇÃO DOS PROTÓTIPOS DE ITT ENZIMÁTICOS.....	59
2.7 VALIDAÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS PARA ELABORAÇÃO DOS PROTÓTIPOS DE ITT	60
2.8 CÁLCULO DOS CUSTOS DO PROTÓTIPO DE ITT	61
2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	61

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA A-AMILASE	61
3.2 EFEITO DO USO DE ESTABILIZANTES NA ATIVIDADE DA ENZIMA A-AMILASE.....	63
3.3 ESTABILIDADE DO COMPLEXO AMIDO-iodo (AI).....	69
3.4 DESENVOLVIMENTO DO PROTÓTIPO DO ITT ENZIMÁTICO	74
3.5 ANÁLISE DE CUSTO DO ITT.....	75
4 CONCLUSÃO	76
APÊNDICE 1.....	83
APÊNDICE 2.....	84
ARTIGO II – VALIDAÇÃO DE ITT ENZIMÁTICO NO GERENCIAMENTO DA CADEIA DE RESFRIAMENTO DO PESCADO ESPADARTE (<i>XIPHIAS GLADIUS</i>)87	
RESUMO	87
1 INTRODUÇÃO	87
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	89
2.1 MATERIAL.....	89
2.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO PROTÓTIPO DE ITT ENZIMÁTICO	89
2.3 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE PESCADO ESPARTE E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO	92
2.4 ESTUDO CINÉTICO DA QUALIDADE DO PESCADO ESPARTE	94
2.5 ANÁLISE SENSORIAL	94
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	96
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
3.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO PROTÓTIPO DE ITT	96
3.2 ESTUDO CINÉTICO DA QUALIDADE DO PESCADO ESPARTE	101
3.2.1 Avaliação da vida útil através do MIQ	106
4 CONCLUSÃO	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
ARTIGO III – AVALIAÇÃO DA VIDA ÚTIL DE CENOURAS MINIMAMENTE PROCESSADAS APLICANDO O MÉTODO PERFIL FLASH IN HOME E VALIDAÇÃO DO ITT ENZIMÁTICO	115
RESUMO	115
1 INTRODUÇÃO	115
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	117
2.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA	117
2.2 CARACTERIZAÇÃO DO PROTÓTIPO ITT ENZIMÁTICO	118
2.3 DESINFECÇÃO DE CENOURAS EM CUBOS COM CLORO E OZÔNIO	119
2.4 ESTIMATIVA DA VIDA ÚTIL DE CENOURAS MINIMAMENTE PROCESSADAS EM CUBOS ATRAVÉS DA METODOLOGIA SENSORIAL DE PERFIL FLASH IN HOME	119
2.5 VALIDAÇÃO O USO DO PROTÓTIPO DE ITT ENZIMÁTICO EM CENOURAS MINIMAMENTE PROCESSADAS EM CUBOS.....	121
2.5.1 Estudo cinético da qualidade de cenouras minimamente processadas em cubos	121
2.5.2 Estudo cinético do Protótipo ITT enzimático	122
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	123
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	123

3.1	DESINFECÇÃO DE CENOURAS MINIMAMENTE PROCESSADAS EM CUBOS UTILIZANDO CLORO E OZÔNIO	123
3.2	ESTIMATIVA DA VIDA ÚTIL DA CENOURA MINIMAMENTE PROCESSADA ATRAVÉS DO USO DA METODOLOGIA SENSORIAL DE PERFIL FLASH IN HOME 125	
3.3	ESTUDO CINÉTICO DA QUALIDADE DA CENOURA MINIMAMENTE PROCESSADAS EM CUBOS.....	126
3.4	VALIDAÇÃO DO PROTÓTIPO DE ITT ENZIMÁTICO PARA CENOURAS MINIMAMENTE PROCESSADAS EM CUBOS	129
4	CONCLUSÃO.....	132
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
	APENDICE I - ENTREVISTA PARA RECRUTAMENTO DOS PARTICIPANTES PARA A ANÁLISE SENSORIAL	138
	APÊNDICE II - INSTRUÇÕES GERAIS	141
	APÊNDICE III - PROTOCOLO DE SEGURANÇA	142
	APÊNDICE IV - PROTOCOLO PARA ANÁLISE SENSORIAL – SESSÃO 1	142
	APÊNDICE V - SESSÃO 2.....	145
	APÊNDICE VI - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	147
	CAPÍTULO IV.....	149
	CONCLUSÃO GERAL	150
	CAPÍTULO V	151
	RESÍDUOS GERADOS E DESTINO	152
	SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS.....	152
	CAPÍTULO VI.....	153
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154

CAPÍTULO I

RESUMO GERAL, ABSTRACT GERAL, INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

RESUMO GERAL

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um ITT enzimático líquido que tem como princípio ativo a enzima α -amilase e o complexo amido-iodo, atendendo aos requisitos necessários para utilização comercial quando aplicado em produtos frescos. O protótipo de ITT foi elaborado a partir de uma embalagem composta por dois compartimentos onde se encontram separados, um com a solução enzimática e o outro com o substrato indicador (amido-iodo). Foram definidas as condições de maior estabilidade da enzima (pH 8,0; sem conservantes) e da solução de amido-iodo (pH 7,0; sem conservantes), que apresentaram uma vida útil de 6 meses em temperaturas extremas de estocagem (4 e 35 °C). O estudo cinético do ITT enzimático demonstrou que a variação colorimétrica é dependente da quantidade de enzima, com a mudança de cor do azul escuro para o incolor e o modelo de Arrhenius permitiu estimar a dependência de ativação da temperatura na taxa de resposta da cor do ITT, em termos de energia tanto para os protótipos de ITT sem uso de conservantes (123,11 a 134,77 kJ mol⁻¹) quanto com uso de sorbato de potássio em 7 concentrações enzimáticas (1 a 7 %) (108,98 a 121,83 kJ mol⁻¹). O protótipo de ITT com 4 % de enzima com conservante prevê o tempo de vida útil (8 dias) semelhante ao tempo previsto na análise de *Pseudomonas*, sendo o melhor indicador para monitorar o frescor do pescado espadarte armazenado com gelo a 4 °C e o protótipo de ITT contendo 5 % de amilase se adequou melhor para aplicação em cenouras minimamente processada em cubos à vácuo e armazenadas a 4 °C. A mudança do índice de qualidade entre ITT e os indicadores de qualidade (firmeza, bactérias psicotróficas e BAL) apresentaram menor diferença na Ea e o mesmo tempo de vida útil (7 dias). Desta forma, o ITT enzimático desenvolvido apresentou mecanismo de reação simples e estável em temperatura, conferindo flexibilidade de aplicação em pescado e cenoura minimamente processadas, com viabilidade para aplicação comercial, contribuindo efetivamente no controle da cadeia do frio.

Palavras-chave: Enzima α -amilase. Amido-iodo. ITT enzimático. Pescado. Cenoura em cubos.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF AN ENZYMATIC TIME AND TEMPERATURE INDICATOR FOR QUALITY MONITORING IN PERISHABLE PRODUCTS

The present study aims to develop and validate a liquid enzymatic TTI that the enzyme α -amylase as its active principle and the starch-iodine complex, meeting the requirements for commercial performance when applied to fresh products. The TTI prototype was made from a package composed of two compartments where the enzyme solution and the indicator substrate (starch-iodine) are separated. The conditions of greater stability of the enzyme (pH 8.0; no preservatives) and the starch-iodine solution (pH 7.0; no preservatives) were defined, which had a shelf life of 6 months at extreme storage temperatures (4 and 35°C). After obtaining the initial results, the enzymatic TTI was determined by a kinetic study that showed that the colorimetric variation is dependent on the amount of enzyme, observing the color change from dark blue to colorless. The kinetic study of the enzymatic TTI showed that the colorimetric variation is dependent on the amount of enzyme, with the color change from dark blue to colorless and the Arrhenius model allowed estimating the dependence of temperature activation on the color response rate of the TTI, in terms of energy both for TTI prototypes without the use of preservatives (123.11 to 134.77 kJ mol⁻¹) and with the use of potassium sorbate (108.98 to 121.83 kJ mol⁻¹) in 7 enzyme concentrations (1 to 7%). The TTI prototype with 4% enzyme with preservative predicts the shelf life (8 days) similar to the time predicted in the *Pseudomonas* analysis, being the best indicator to monitor the freshness of swordfish fish stored with ice at 4 °C and the TTI prototype containing 5% amylase was better suited for application in minimally diced carrots under vacuum and stored at 4°C. The change in the quality index between TTI and the quality indicators (firmness, psychotrophic bacteria and BAL) showed a smaller difference in E_a and the same shelf life (7 days). In this way, the enzymatic TTI developed presented a simple and temperature stable reaction mechanism, providing flexibility of application in minimally processed fish and carrots, with feasibility for commercial application, effectively contributing to the control of the cold chain.

Key word: α amylase - enzyme. Starch-iodine. Enzymatic TTI. Fish. Carrot cubes.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O controle e o gerenciamento efetivo da cadeia de frio em produtos alimentícios frescos são determinantes para seu consumo, uma vez que os desvios de temperatura prejudicam sua qualidade. Por conseguinte, é necessário um meio eficiente de monitorar e informar a qualidade do produto na variação de tempo e temperatura a que for submetido (DERMESONLUOGLU et al., 2015; MACIEL; YOSHIDA; FRANCO, 2012; MERCIER et al., 2017; SCALIA et al., 2015; SOON; SAGUY, 2017; TAOUKIS et al., 2016; TSIRONI et al., 2017; WANIHSUKSOMBAT; HONGTRAKUL; SUPPAKUL, 2010).

As embalagens inteligentes vêm sendo estudadas para atender às necessidades de controle da cadeia de suprimento. Dentre estas tem os indicadores de tempo-temperatura (ITT) (BARSKA; WYRWA, 2017; BRIZIO; PRENTICE, 2015; POYATOS-RACIONERO; ROS-LIS, 2018; SOHAIL; SUN; ZHU, 2018; SUPPAKUL et al., 2017; WAN; KNOLL, 2016; WYRWA; BARSKA, 2017) que quando anexados a embalagem podem constituir uma alternativa promissora na venda de alimentos que necessitam de rígido controle de temperatura, pois informam quando o produto é submetido a temperaturas abusivas de uma forma rápida e fácil (PAVELKOVÁ, 2013). A sua ação baseia-se em mudança irreversível física, química, enzimática ou microbiológica, expressa como uma resposta visível uma mudança de cor (GIANNOGLOU et al., 2014; TAOUKIS; LABUZA, 1989).

O ITT com princípio ativo da α -amilase em solução líquida apresenta facilidade de preparação e baixo custo de produção, porém apresenta limitações em função da termoestabilidade natural da enzima que deve estar em condições de refrigeração, uma vez que, a contaminação microbiana é um dos problemas durante o armazenamento. Para estabilizar termicamente as α -amilases na forma líquida tem sido utilizado conservantes que desempenham um papel significativo na sua estabilidade estrutural (ASOODEH et al., 2014; CHAKRABORTY et al., 2011; JADHAV; SINGHAL, 2012; SAMBORSKA et al., 2006).

Entretanto, o desenvolvimento de um ITT enzimático ainda apresenta obstáculo para a comercialização referente a aplicabilidade e confiabilidade (TAOUKIS, 2010). Neste sentido, este estudo visa superar estas deficiências, avaliando a estabilidade da enzima α -amilase e do complexo amido-iodo, antes de sua ativação. E a partir de então, desenvolver um protótipo ITT com sistema de compartimentalização, que se apresente estável em temperatura ambiente sob estado inativo, e que possibilite através de diferentes concentrações de enzima, flexibilidade para aplicação em pescado espadarte exportação e cenoura em cubo embalada

vácuo. (AVIYAN; ANG; ASCO, 2003; CHOI et al., 2014; GUIAVARC'H et al., 2004; HAENTJENS et al., 1998; ILLANES, 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um ITT enzimático, utilizando como princípio ativo a reação de uma α -amilase e o complexo amido-iodo, que se apresenta estável em temperatura ambiente sob estado inativo. E que possibilite através de diferentes concentrações de enzima, flexibilidade para aplicação em produtos frescos de diferentes vidas útil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a estabilidade da enzima α -amilase e do complexo amido-iodo, utilizando diferentes estabilizantes;
- Desenvolver protótipos de ITT enzimático a partir da enzima α -amilase e do substrato amido-iodo que apresentarem melhor estabilidade térmica;
- Caracterizar o sistema de embalagem inteligente através de estudo cinético;
- Validar o ITT enzimático em escala laboratorial para pescado espadarte, através do estudo cinético da vida útil do pescado espadarte refrigerado através das análises físico-química e microbiológica e realizar teste de vida útil do pescado através da análise sensorial (método MIQ);
- Avaliar o procedimento de desinfecção das cenouras minimamente processadas através do uso de cloro e ozônio;
- Realizar teste de vida útil sensorial através do uso da metodologia de Perfil flash *in home*;
- Validar o ITT enzimático em escala laboratorial para cenouras minimamente processada em cubos a partir de análises físico-químicas e microbiológicas, a fim de selecionar os ITTs apropriados para monitorar e gerenciar a distribuição da cadeia de frio.

CAPÍTULO II
REVISÃO DA LITERATURA

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 VIDA ÚTIL DE ALIMENTOS PERECÍVEIS NA CADEIA DO FRIO

A vida útil de um produto alimentício pode ser definida como o período de tempo em que o alimento permanece seguro e apto para consumo, quando submetido a determinadas condições de armazenamento, processamento e embalagem (IFST, 1993). Durante esse período, o produto alimentar deve manter as características sensoriais, químicas, físicas, microbiológicas e cumprir com qualquer declaração nutricional do rótulo, quando armazenado nas condições recomendadas (FSAI, 2005). De acordo com o Regulamento da CE nº 1169/2011 da União Europeia (EC, 2011) é recomendável que ao período de vida útil determinado se acrescente uma margem de segurança, ou seja, o prazo de validade precisa incluir possíveis características intrínsecas e extrínsecas, assim como eventuais variações de produção (NEWSOME et al., 2014).

O estudo de vida útil consiste em armazenar amostras do alimento, em condições semelhantes às reais, e submetê-las a uma série de análises em intervalos de tempo pré-determinados, até ao limite de aceitação (FU; LABUZA, 1997). Durante esse período de tempo, são observadas as alterações sofridas pelo alimento, determinando o tempo limite que o alimento torna-se impróprio para o consumo (CORRADINI; PELEG, 2007). Contudo, a vida útil nunca é um valor absoluto, que termina em um tempo e data exata. Sempre será mais correto considerá-la uma distribuição de tempos e datas em torno de uma vida útil média (LABUZA, 2000).

O fim da vida útil de um produto perecível é geralmente determinado com base na suposição comum de que o produto foi mantido na temperatura correta durante toda a produção e distribuição (CHEN et al., 2021). Sendo assim, o controle da temperatura sem interrupção na cadeia de alimentos perecíveis durante o transporte, o armazenamento e a distribuição é essencial para manter a vida útil dos produtos e fornecer aos consumidores alimento seguro (DURET et al., 2019).

Uma opção empregada para o controle da temperatura é o uso de equipamentos portáteis e de sensores sem fio. No entanto, os sensores são de uso limitado porque os dados de temperatura geralmente não são coletados em toda cadeia de frio. Uma das razões é que o produto passa por diferentes operações unitárias na cadeia de suprimentos, vários operadores lidam com a carga, e os sensores geralmente não são transferidos de uma operação unitária para outra (SHOJI et al., 2022).

Assim, a gestão de qualidade eficiente nos estágios iniciais na área produtiva, não garante a qualidade do produto final. Isso por que, durante a cadeia de suprimentos, são muitas vezes, são evidenciadas negligências no controle de temperatura (CHAOMUANG et al., 2022; JEDERMANN et al., 2014; NDRAHA et al., 2018). Embora o abuso ou mau uso da manutenção da cadeia de frio possa acontecer ao longo de toda a cadeia alimentar, a parte mais crítica da manutenção da cadeia de frio está no seu final (expositores, transporte após a compra e refrigerador doméstico) (OVCA; ŠKUFGA; JEVŠNIK, 2021).

O uso da refrigeração reduz as taxas em que ocorrem alterações em alimentos perecíveis, como crescimento de micro-organismos, taxas de amadurecimento, reações enzimáticas e perdas de água (CHEN et al., 2021). A não manutenção da temperatura, mesmo que por algumas horas, pode ter um impacto significativo na evolução da qualidade do produto (LOISEL et al., 2021). A preservação da qualidade dos alimentos está intimamente relacionada à saúde pública (SANDULESCU et al., 2011) e com o aumento dos níveis de desperdício de alimentos (CHAOMUANG et al., 2022; NDRAHA et al., 2018).

De acordo com os dados da vigilância epidemiológica (BRASIL, 2019), a ocorrência de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, provém de bactérias patogênicas, sendo as principais *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Evidenciando que as principais causas são a matéria prima imprópria para consumo (4.960 casos) e conservação inadequada destes alimentos (5.032 casos) (BRASIL, 2019).

1.2 VIDA ÚTIL EM PESCADO

O consumo global de pescado aumentou a uma taxa média anual de 3,1 % entre 1961 e 2017, representando, neste último ano, 17 % da ingestão de proteínas animais e 7 % de todas as proteínas consumidas. E comparando com o aumento da taxa de consumo média anual das demais proteínas animais foi superior (2,1 %). Globalmente, o pescado fornece, a mais de 3,3 bilhões de pessoas, 20 % da ingestão média per capita de proteína animal (FAO, 2020).

A produção da pesca e da aquicultura é altamente diversificada em termos de espécies, processamento e formas de produtos destinados a usos alimentares ou não alimentares. De modo que o peixe vivo, fresco ou refrigerado ainda representa o maior consumo humano direto (44%). Seguindo do pescado congelado (35 %), preparado e conservado (11 %) e curado (10 %) (FAO, 2020). Dentre os peixes frescos, podemos destacar o peixe espadarte (*Xiphias gladius*), sendo esta uma das espécies mais importantes entre populações de peixes comerciais brasileiro. Esta espécie pode ser encontrada em vários ambientes marinhos (Atlântico, Pacífico e Índico), e com

evidências de um forte potencial de captura na região Sudeste-Sul do Brasil (MAGRO, 2006).

O espadarte, também conhecido como Meca (terminologia japonesa) é um importante recurso, sustentando grandes pescarias de espinhel-de superfície em todos os oceanos do mundo (KINAS, 2013). Em 2000, o volume total de espadarte capturado no Atlântico ultrapassou 42.749 ton/ano. Posteriormente, as capturas diminuíram progressivamente, e em 2009 a captura anual foi de 28.427 ton (redução de 33,50 %). Os países que apresentam as maiores capturas de espadarte foram os países da União Europeia (54,31 %), seguido do Brasil (10,05 %), Marrocos (6,80 %) e Estados Unidos (6,14 %) (ICCAT, 2019).

O pescado espadarte exportação é vendido inteiro fresco e refrigerado. O processamento industrial é baseado nas etapas de evisceração, lavagem e armazenamento a frio, utilizando gelo (BOZIARIS, 2014; ICCAT, 2019). O abuso de temperatura durante qualquer etapa da cadeia de distribuição geralmente resulta em perda de qualidade, diminuindo significativamente a vida útil do pescado (GIANNAKOUROU et al., 2005).

Segundo a FAO (2020) estima-se que 35% do total da produção seja perdida ou desperdiçada todos os anos. Os pescados são produtos perecíveis devido à complexidade microbiológica e vida útil curta (GIANNOGLOU et al., 2019). A vida útil do pescado pode ser definida como o período aceitável em que seja mantido a segurança alimentar, nutricional e sensorial. Durante esse período, o pescado deve proporcionar aos consumidores sua experiência sensorial pretendida, desempenho e benefícios (GIMÉNEZ; ARES, 2019). Por isso, é importante que seja realizado monitoramento contínuo das condições de armazenamento, desde a produção até o consumo (TAOUKIS; TSIRONI, 2018).

No caso de pescados, a fração da microflora total do peixe, ou seja, dos Organismos de Deterioração Específico (SSO) é o que contribuem para a sua deterioração, pois produzem os metabólitos de deterioração que causam a rejeição sensorial (VIEIRA; BALBINOT-ALFARO; MARTINS, 2021).

No Brasil, os controles oficiais do pescados para avaliação da qualidade do pescado sugerem métodos combinados, de análises sensoriais, físico-químicas e microbiológica (BRASIL, 2017a). Independentemente do método escolhido, as avaliações sensoriais continuarão sendo fator-chave, uma vez que estes atributos são os principais parâmetros que o consumidor pode seguir na compra de peixes frescos. Portanto, qualquer análise realizada deve estar de acordo com os resultados sensoriais (FREITAS; VAZ-PIRES; CÂMARA, 2021).

Métodos específicos para análise sensorial em pescados, que faça correção à aceitação do consumidor, foram desenvolvidos para aplicação na indústria. O método de índice de qualidade (MIQ) avalia o frescor dos pescados que através da quantificação dos atributos

sensoriais considerados relevantes. Essas características são pontuadas utilizando uma escala de 0 a 3 pontos demérito, é designado índice de qualidade (IQ), que quantifica a falta de frescor. A relação linear entre IQ e tempo de armazenamento permite a estimativa da vida útil restante (ESTEVES; ANÍBAL, 2021). O MIQ é uma ferramenta prática, objetiva, não destrutiva, rápida e barata que além das vantagens atribuídas a toda a análise sensorial, leva em conta aspectos específicos de cada espécie, permitindo estimar o tempo de vida útil (BERNARDI; MÁRSICO; FREITAS, 2013).

Nos casos em que a avaliação sensorial revele dúvidas acerca do frescor do pescado, existem métodos para avaliar o frescor ou o grau de degradação de diferentes espécies durante o armazenamento, que incluem a quantificação das bases nitrogenadas voláteis de baixo peso molecular (NBV-T), das substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS), do pH, da cor e as análises microbiológicas (AGÜERIA et al., 2016).

No Brasil, os métodos analíticos oficiais são estabelecidos pela Instrução Normativa 20, de 26 de junho de 2018, compilados no “Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal” (BRASIL, 2018). Assim como, a Instrução Normativa 60, de 23 de dezembro, complementa a RDC 331/2019, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (BRASIL, 2019a), estabelecendo as listas de padrões microbiológicos para os alimentos e sua aplicação. Na categoria específica de pescado e miúdos, crus, temperados ou não, frescos, refrigerados ou congelados, os indicadores microbiológicos exigidos são *Salmonella*, *Estafilococos coagulase positivo* e *Escherichia coli*, assim como limite máximo de 100 mg/kg de histamina para pescados com elevado teor de histidina (BRASIL, 2019b).

Nos últimos anos, a pesquisa se concentrou no desenvolvimento de métodos instrumentais rápidos para detectar o frescor dos pescados. Várias técnicas promissoras estão sendo desenvolvidas, e algumas delas têm mostrado boa correlação com os métodos tradicionais de avaliação de qualidade ou frescor. Portanto, os estudos realizados com embalagem inteligente vinculam as tecnologias inovadoras comparados com os métodos convencionais precisam ser cada vez mais realizados (VIEIRA; BALBINOT-ALFARO; MARTINS, 2021).

As pesquisas vêm se concentrando no desenvolvimento de métodos instrumentais rápidos para detectar o frescor dos pescados. Dentre eles, se encontram os indicadores de tempo e temperatura (ITT), que são etiquetas de baixo custo que apresentam um sistema de embalagem inteligente capazes de transferir informações sobre a qualidade dos alimentos durante as condições de armazenamento. Um número crescente de ITTs tem sido elaborado e validado,

com o intuito de avaliar o potencial das etiquetas para monitoramento de qualidade aplicadas em produtos de pescado (AMIRI, 2020; GIANNOGLOU et al., 2019; PRABHAKAR et al., 2020; TSIRONI et al., 2017).

1.3 VIDA ÚTIL DOS VEGETAIS

No Brasil, os vegetais minimamente processados (VMP) tornaram-se comercialmente disponível em 1990 (CENCI, 2011). Os VMP são frutas, legumes ou hortaliças, ou a combinação destes, que tenham sido submetidos a processamento, o qual pode incluir seleção, corte, fatiamento, branqueamento, lavagem, desinfecção, enxágue, centrifugação, acondicionamento em embalagens dotadas de dizeres de rotulagem, armazenamento resfriado ou congelado, podendo ser comercializados prontos para o consumo ou não, com qualidade sensorial característica, seguros ao consumo e produzidos por indústria ou agroindústria de alimentos (BRASIL, 2017b).

A tendência crescente do mercado de VMP depende principalmente da demanda dos consumidores por alimentos frescos e saudáveis (CONDURSO et al., 2020). Atualmente, as hortaliças com maior representatividade na comercialização efetuada nas centrais de abastecimento do país são a alface, batata, cebola, cenoura e tomate (CONAB, 2020). Sendo que, a cenoura (*Daucus carota L.*) é um dos vegetais mais consumidos na forma de VMP (fatiado, picado, ralado) devido à versatilidade e composição nutricional (CONDURSO et al., 2020).

O processamento mínimo deve fornecer ao mercado produtos frescos com alto valor nutricional e vida útil prolongada, satisfazendo as necessidades do consumidor por produtos frescos e seguros (ALEGRIA et al., 2010).

Na lavagem de produtos frescos, o cloro é o agente mais comum usado pela indústria alimentícia aplicado em concentrações de 50 a 200 ppm como ácido hipocloroso ou dióxido de cloro (Cl₂) por 1 a 5 min. O cloro também pode ser aplicado como hipoclorito (NaOCl), mas tem sido observado que na presença de matrizes orgânicas, é provável que forme subprodutos halogenados (triclorometano) e outros subprodutos que são potencialmente perigosos para o meio ambiente e para saúde humana (BOTONDI; BARONE; GRASSO, 2021)

Por essa razão, tratamentos alternativos de lavagem têm sido investigados com o objetivo de testar processos mais eficazes e evitar os riscos associados. O ozônio (O₃) é um dos tratamentos mais promissores para a descontaminação de produtos frescos com diversas áreas de aplicação na indústria alimentícia (BRODOWSKA et al., 2017; PAULIKIENĖ et al., 2020;

RENUMARN et al., 2014; SOUZA et al., 2018). O O₃ é geralmente gerado pelo método de descarga corona, quando a alta tensão de corrente alternada é aplicada através de uma abertura em presença de oxigênio, e os elétrons do oxigênio são induzidos à divisão de moléculas de oxigênio, então átomos de oxigênio combinados com outras moléculas de oxigênio formam o O₃ (KIM; YOUSEF; CHISM, 1999).

A adição de um terceiro átomo de oxigênio faz a molécula de ozônio ser instável e reativa, fornecendo capacidade para o ozônio oxidar facilmente as paredes das células de micro-organismos (bactérias, vírus, fungos) (PAULIKIENĖ et al., 2020). A eficácia de O₃ como desinfetante depende do método de aplicação, concentração, exposição ou tempo de contato, tipos de microrganismos e níveis iniciais de contaminação. Além do mais, pode ter ação dificultada quando a superfície dos alimentos apresenta excesso de carga orgânica (RENUMARN et al., 2014).

Durante o processamento, o dano mecânico causado às células limita a vida útil dos VMP. Eles são mais suscetíveis à contaminação porque o corte danifica as barreiras naturais de proteção dos vegetais intactos e liberam nutrientes exudativos que contribuem para o crescimento de micro-organismos (O'BEIRNE et al., 2014). Por isso, devido ao processamento estes produtos perecíveis apresentam uma vida útil curta em torno de 4 a 10 dias (FAI et al., 2016). Sua vida útil depende de vários fatores como qualidade de frutas e vegetais, a tecnologia de produção, as interações entre grupos microbianos e o atendimento da temperatura de resfriamento (SIROLI et al., 2015).

Quando ocorre o abuso na cadeia do frio, o crescimento microbiano e a deterioração dos produtos ocorrem de forma mais rápida. A variação da temperatura pode levar à duplicação da taxa de crescimento de quaisquer patógenos alimentares que contaminam esses produtos (CENCI, 2011; PAULA et al., 2009). E portanto, tornam-se cada vez mais reconhecidos como problemas potenciais na segurança alimentar, que geralmente são consumidos crus, sem lavagem e outros procedimentos de desinfecção (CRUZ et al., 2019; HERMAN; HALL; GOULD, 2015; LITTLE; GILLESPIE, 2008).

Estudos têm demonstrado que os parâmetros mais críticos para determinar a qualidade dos VMP são aqueles relacionados às características microbiológicas. Muitos microrganismos patogênicos e deteriorantes são isolados de VMP e estão associados a doenças transmitidas por alimentos e à redução da vida útil do produto. Entre os quais estão os coliformes totais e termotolerantes, bactérias ácido lácticas *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, microrganismos aeróbicos mesófilos e psicotróficos, e em menor

quantidade os fungos e as leveduras (GURLER et al., 2015; HERMAN; HALL; GOULD, 2015; ICMSF, 1978; LITTLE; GILLESPIE, 2008; SCHUH et al., 2020).

Cenouras minimamente processadas podem ter suas características de qualidade alteradas durante o armazenamento devido ao crescimento microbiológico, resposta fisiológica a fatores de “stress” e desidratação superficial. Essas alterações físicas e químicas afetam a qualidade sensorial e limitam a aceitação do produto pelo consumidor (LAVELLI et al., 2006). De acordo com Concurso et al. (2020) a vida útil das cenouras minimamente processadas depende fortemente da qualidade sensorial, como consequência da estimativa de vida útil baseada na percepção do consumidor, para um resultado mais confiável do que quando o estimado com base na carga microbiana do produto. Lavelli et al. (2006) ao comparar dados de crescimento microbiano com análise sensorial observou que a aparência visual do clareamento e a perda de aroma frutado ocorreu antes da contaminação microbiana (8 log UFC/g), enquanto que a percepção de odor foi concomitante.

Com a dificuldade da avaliação sensorial de alimentos durante o cenário atual da pandemia, devido aos critérios de contingenciamento. O perfil flash foi anteriormente executado para descrever perfil sensorial de diferentes alimentos como geleias de frutas vermelhas (DAIROU; SIEFFERMANN, 2002), laticínios (DELARUE; SIEFFERMANN, 2004), purês de fruta (TAREA; CUVELIER; SIEFFERMANN, 2007), geleias (BLANCHER et al., 2007), pão (ALBERT et al., 2011; LASSOUED et al., 2008), vinho (PERRIN et al., 2008), bebidas (MAMEDE; BENASSI, 2016) e queijo (RAMÍREZ-RIVERA et al., 2017).

O Perfil Flash (PF) *in home* é uma metodologia que pode ser utilizada para avaliar a vida útil de cenouras minimamente processadas e é aplicada na casa dos julgadores.

O perfil flash desvia-se dos métodos convencionais e foi desenvolvido para ser um método flexível que fornece um acesso rápido ao posicionamento sensorial relativo a um conjunto de produtos. Para economizar tempo, as fases de familiarização com o espaço do produto, a geração e a classificação do atributo são integradas em uma única sessão, permitindo que cada julgador utilize sua própria lista de atributos (DELARUE; SIEFFERMANN, 2004). As restrições demoradas relacionadas à busca do consenso e do alinhamento conceitual não são utilizadas. Desta forma, este método se torna mais atraente porque não exige uma etapa de treinamento e pode ser realizado em sessões individuais (DAIROU; SIEFFERMANN, 2002; LIU et al., 2018).

1.4 EMBALAGEM INTELIGENTE

As tecnologias inteligentes podem ajudar a minimizar riscos de qualidade, segurança alimentar e desperdício em cadeias de fornecimento de produtos frescos. Comumente, o uso de embalagens inteligentes, podendo ser conhecidas por meio de indicadores que monitoram a qualidade e segurança dos alimentos as condições indesejável durante as etapas de distribuição e armazenamento do produto (KUSWANDI, 2020).

As embalagens inteligentes visam fornecer aos consumidores, informações confiáveis sobre qualidade e segurança alimentar, através do monitoramento do ambiente interno e externo da embalagem, permitindo a comunicação com o consumidor (BARSKA; WYRWA, 2017). Assim como, informar sobre a integridade da embalagem durante as etapas de transporte e armazenamento (VANDERROOST et al., 2014). Em um sentido mais amplo, as embalagens inteligentes são definidas como a ciência e tecnologia que utilizam a função de comunicação do sistema para facilitar a tomada de decisão (CHEN et al., 2020).

Nos últimos anos, vêm aumentando o número de pesquisas sobre embalagens inteligente aplicada em alimentos (ALAM; RATHI; BESHAI, 2021; CHEN et al., 2020; HALONEN et al., 2020; KUSWANDI, 2020). Embalagens mais atraentes e funcionais para o consumidor agregam valor ao produto, porém a decisão de optar por este tipo de embalagem dependerá do benefício econômico (MOHAMMADIAN; ALIZADEH-SANI; JAFARIA, 2020).

O desempenho da embalagem inteligente precisa garantir a baixa possibilidade de descartar alimentos, oferecendo ao consumidor uma avaliação dinâmica da vida útil, informando condições reais nas quais o produto apresenta durante a cadeia de suprimentos. De acordo com uma pesquisa de mercado, as embalagens inteligentes contribuem para melhorar a comunicação da marca, gerando diferencial entre outras marcas e maior credibilidade do produto em todas as etapas do processo, assim o produtor tem vantagem competitiva o que pode levar ao aumento das vendas e a imagem de marca aprimorada (SOON; SAGUY, 2017).

Um sistema de embalagem inteligente pode ser realizado por três tecnologias principais: os indicadores, que determinam a presença ou ausência de uma substância, a extensão de uma reação entre diferentes substâncias e a concentração de uma substância específica. Também podemos citar, os portadores de dados, que são especificamente destinados para fins de armazenamento, distribuição e rastreabilidade, e os sensores, que permitem uma quantificação rápida e definitiva dos analitos em alimentos (MÜLLER; SCHMID, 2019).

Os indicadores são usados para fornecer informações sobre qualquer mudança que ocorra em um produto perecível, observando mudanças visuais diretas (MILLS; HAWTHORNE, 2017). Uma característica distinta dos indicadores é o tipo de informação envolvida, de natureza qualitativa ou semi-quantitativa. Apesar das grandes variedades de indicadores, todos podem ser razoavelmente incluídos em quatro categorias: indicadores de temperatura, indicadores de tempo e temperatura, indicadores de frescura e indicadores de integridade (KUSWANDI, 2020). Todos eles se enquadram na categoria principal de "qualidade dos produtos e sistemas de melhoria de valor", que são, os dispositivos mais utilizados em embalagens de alimentos (ROBERTSON, 2013).

1.5 INDICADORES DE TEMPO E TEMPERATURA

Os indicadores de tempo e temperatura são ferramentas de registro de qualidade de alimentos que refletem o histórico de temperatura total ou parcial ao qual estão monitorados (GIANNOGLOU et al., 2014; TAOUKIS; LABUZA, 1989). Estes sistemas inteligentes indicam mudanças na qualidade dos alimentos e informações sobre sua vida útil (TSIRONI, et al., 2017).

Os indicadores de tempo e temperatura são categorizados em três grupos com base em suas funções: indicadores críticos de temperatura (ICTs), que exibem exposição acima (ou abaixo) de uma temperatura de referência; os indicadores de temperatura/tempo crítico (CTTI), que exibem uma resposta que reflete o limite acumulativo de temperatura-tempo acima de uma temperatura crítica de referência; e os indicadores/ou integradores de temperatura/tempo (ITT), que tornam uma resposta visível contínua e dependente da temperatura ao longo do histórico do produto (TAOUKIS; LABUZA, 2003).

O desenvolvimento de um ITT baseia-se em mudanças de deformação mecânica (LEE et al., 2019; SUPPAKUL et al., 2017; ZABALA; CASTAÑON; MARTÍNEZ, 2015), químicas (GALLIANI et al., 2015; ROKUGAWA; FUJIKAWA, 2015), eletroquímicas (RAHMAN et al., 2018; WAN; KNOLL, 2016), enzimáticas (BRIZIO; PRENTICE, 2015; JHUANG et al., 2020a; MENG; QIAN; TANG, 2018; UDDIN; BOONSUPTHIP, 2019; YANG; KIM; LEE, 2019) ou microbiológicas (FENGJUAN et al., 2017; HSIAO; CHANG, 2017; MATARAGAS et al., 2018). Geralmente, expressas como resposta visível sob a forma de mudança ou movimento de cor (TAOUKIS; LABUZA, 2003).

O período de tempo entre a ativação e o término dos ITTs é normalmente refletido por alterações de cor, que correspondem à vida útil dos alimentos (KIM; SHIN; LEE, 2016). O

requisito básico para a eficiência de um ITT é apresentar uma reação clara, contínua e irreversível às mudanças de temperatura (TSIRONI et al., 2008). Além disso, são necessários um estudo cinético da resposta do ITT, com base em modelos confiáveis do prazo de validade e da cinética do produto (KOUTSOUMANIS; TAOUKIS; DROSINOS, 2000).

Como o tempo e a temperatura desempenham um papel essencial na dinâmica que afeta a deterioração dos alimentos, a implementação de um sistema baseado em ITT pode obter um controle realista da cadeia de frio, reduzindo assim o desperdício de alimentos e oferecendo aos consumidores informações autênticas sobre a vida útil dos mesmos (TSIRONI et al., 2011).

O ITT tem atraído cada vez mais atenção devido às suas vantagens de baixo custo, alta eficiência, visualização e fácil operação (LEE; KAWAMURA; KOSEKI, 2018). Sendo que, a maioria dos estudos e metodologias desenvolvidas referem-se a produtos perecíveis refrigerados e congelados, como: pescados (BRIZIO; PRENTICE, 2014; FENGJUAN et al., 2017; GARCÍA et al., 2017; TSIRONI et al., 2017; YE et al., 2022), produtos lácteos (CLAEYS; VAN LOEY; HENDRICKX, 2002; HAN et al., 2012; SCHMIDT; MAYER, 2018), produtos cárneos (KUSWANDI; NURFAWAIDI, 2017; MATARAGAS et al., 2018) frutas e vegetais congelados (BOBELYN; HERTOOG; NICOLAÏ, 2006; DERMESONLUOGLU et al., 2015; ESFAHANI; EMTIAZI; RABBANI, 2017).

1.5.1 Estudo cinético do ITT

Uma abordagem de modelagem cinética permite que o usuário potencial desenvolva um esquema de aplicação específico para um produto e selecione o ITT mais apropriado sem a necessidade de testes extensivos do produto e do indicador (TAOUKIS, 2010). Vários estudos experimentais têm procurado estabelecer correlações entre a resposta do ITT em função do tempo e valores dos parâmetros de qualidade selecionados dos alimentos, testando a significância estatística desta correlação (CHOI et al., 2014; HEISING et al., 2014; SUPPAKUL et al., 2018; TAOUKIS; LABUZA, 1989; TSIRONI et al., 2017; ZABALA; CASTAÑON; MARTÍNEZ, 2015).

A modelagem matemática é uma forma eficaz de prever as mudanças de qualidade dos alimentos devido as reações cinéticas, seguindo ordem zero, primeira ordem ou segunda ordem (HSIAO; CHANG, 2017; KIM et al., 2013). A energia de ativação pode ser usada para fins de previsão do prazo de validade através da medição de um ou mais parâmetros de qualidade, como cor, acidez, contagem microbiana, atributos sensoriais e conteúdo de componentes de riscos (MOHAMMADIAN; ALIZADEH-SANI; JAFARIA, 2020).

Os princípios básicos da modelagem e aplicação de ITT para monitoramento da qualidade são detalhados por Taoukis e Labuza (1989) e Taoukis (2001). Matematicamente, as mudanças de resposta dos ITTs podem ser modeladas em função do tempo (t) e da taxa de reação constante (k). Após a confirmação k, a energia de ativação (E_a) pode ser calculada usando a equação de *Arrhenius*.

A constante k é definida como a quantidade física que é recíproca do tempo necessário para um determinado sistema em evolução dinâmica completar um processo predefinido a uma temperatura constante. Os parâmetros de qualidade dos alimentos (A) sob investigação e as respostas mensuráveis dos ITTs (x) são definidos como uma função cinética de t que é o tempo de reação, caracterizada por k e k' que são as constantes de taxa de resposta em relação a A e R, expressos como:

$$F(A) = kt \quad (1)$$

$$F(x) = k't \quad (2)$$

Depois de determinar k, E_a pode ser calculado através da equação de *Arrhenius*, que tem sido amplamente utilizada para simular o efeito da temperatura em k de várias reações em alimentos e o efeito da temperatura em k' de reações de ITTs. A equação de *Arrhenius* pode ser expressa como:

$$k = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (3)$$

Onde R é a constante universal do gás (8,314 J/mol·K), T representa a temperatura absoluta (K), A é uma constante.

A vida útil de um produto alimentício avaliada pela medição de um índice de qualidade característico, A, assim como as reações dos ITTs, seguem o comportamento de *Arrhenius* dentro de uma determinada faixa de temperatura, as equações reparametrizadas podem ser incorporadas em f(A) e f(R):

$$f(A) = kt = k_{ref} \exp\left[\frac{-E_{A \text{ alimento}}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right] t \quad (4)$$

$$f(R) = k't = k'_{ref} \exp \left[\frac{-E_{A\ ITT}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] t \quad (5)$$

Onde k_{ref} e k'_{ref} são as constantes de velocidade de A e R na temperatura de referência (T_{ref}), respectivamente, E_a alimento e E_a ITT são a E_a da mudança na qualidade do alimento e a mudança de resposta dos ITTs, respectivamente.

Para a maioria dos ITTs, a informação das reações induzidas pela temperatura é convertida na mudança de cores, o que reflete a qualidade dos produtos alimentícios em tempo real. Como a resposta ITTs é facilmente mensurável e se relaciona com o desenvolvimento de reações, ΔE tem sido amplamente utilizada e sua eficácia foi confirmada em muitos estudos (BRIZIO; PRENTICE, 2015; FENGJUAN et al., 2017; HSIAO; HUANG, 2016). As mudanças de cor dos ITTs (ΔE) é realizada usando colorímetro, para leitura dos valores de L (luminosidade), a (verde a vermelho) e b (azul a amarelo), onde L_0 , a_0 e b_0 são os valores iniciais de L, a e b, na fórmula para cálculo de ΔE :

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

Para poder utilizar um ITT como indicador de qualidade para um produto alimentício específico é necessário que a energia de ativação (E_a) do ITT, corresponda a E_a do produto alimentício e o tempo de resposta do ITT (tempo em que o ponto final é atingido) deve ser igual ao prazo de validade do produto). Assim, para a escolha do ITT é essencial escolher os parâmetros de qualidade adequados dos alimentos e que a respostas dos ITTs sejam facilmente reconhecidos. Quanto mais perto a E_a do alimento e E_a do ITT estão, mais preciso é o monitoramento da qualidade do alimento. A vida útil significativa do ITT, mais longa ou mais curta comparada com a vida útil dos alimentos pode causar previsões incorretas, tornando o ITT inválido (GAO et al., 2020).

1.6 INDICADORES DE TEMPO E TEMPERATURA ENZIMÁTICOS

O ITT enzimático tem como princípio de funcionamento a mudança de atividade enzimática ou a entalpia residual da desnaturação da proteína após o aquecimento ou o resfriamento (GUIAVARCH et al., 2004). Os ITTs enzimáticos apresentam um desempenho estável, baixo custo de produção e fácil controle (LU et al., 2013), além de serem mais robustos e de fácil implementação (ANBUKARASU; SAUVAGEAU; ELIAS, 2017).

Variedades de ITT enzimáticos foram desenvolvidos, incluindo o ITT de lipase (GIANNOGLOU et al., 2019; KIM, et al., 2012; LU et al., 2013; WU et al., 2015), ITT de lacase (JHUANG et al., 2020b; KIM; KIM; LEE, 2012; KIM; SHIN; LEE, 2016; PARK et al., 2013), ITT de urease (WU et al., 2013), ITT de xilanase (VERVOORT et al., 2011), ITT de tirosinase (FENGJUAN et al., 2017; KOÇAK; SOYSAL, 2014) e ITT de amilase (BRIZIO; PRENTICE, 2015; GUIAVARC'H et al., 2004; YAN et al., 2008; YANG; KIM; LEE, 2019).

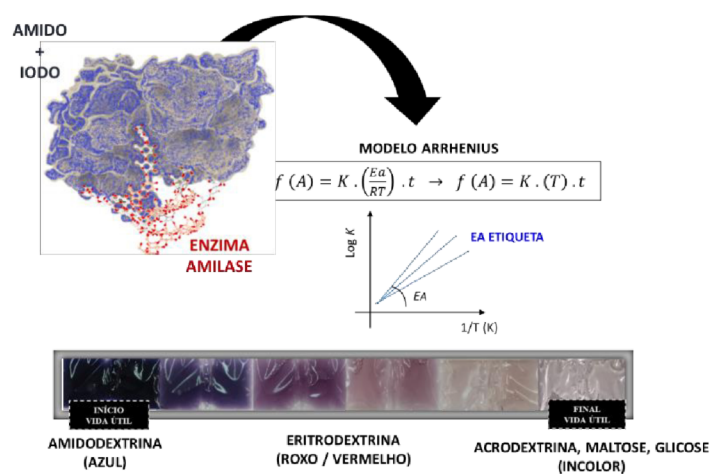
Entre os ITT enzimáticos, os que utilizam a enzima amilase provaram ser de grande valor na indústria de alimentos. As principais vantagens são o baixo custo e amplo espectro de atuação (SUGANUMA et al., 2007). Tem sido desenvolvido estudos de ITTs enzimáticos de α -amilase com atuação em processos de pasteurização e esterilização com as enzimas do gênero *Bacillus amyloliquefaciens* (MEHAUDEN et al., 2007; TOMAZIC; KLIBANOV, 1988, TUCKER et al., 2009, VAN LOEY et al., 1997) e *Bacillus licheniformis* (GUIAVARC'H et al., 2002, 2004; HAENTJENS et al., 1998; MEHAUDEN et al., 2008; TUCKER et al., 2002). Do mesmo modo que, tem sido estudado os ITTs em processos de refrigeração, utilizando enzimas α -amilase do gênero *Aspergillus oryzae* (BRIZIO; PRENTICE, 2015; YAN et al., 2008) .

A variação do conteúdo de α -amilase encontrando E_a entre 102 a 114 kJ mol⁻¹ (YAN et al., 2008) e E_a entre 62,59 a 101,88 kJ mol⁻¹ (BRIZIO; PRENTICE, 2015), e como esses valores estão nas proximidades das E_a dos processos de degradação de produtos perecíveis (LABUZA, 1982), essa enzima é uma boa opção para monitorar a perda de qualidade.

O ITT enzimático com o princípio ativo de origem fúngica (*Aspergillus oryzae*) atua sobre um polímero de alta massa molar (amido) associada a molécula de iodo. A cor azul inicial do ITT se altera para incolor, a uma velocidade dependente do tempo e da temperatura de armazenamento (BRIZIO; PRENTICE, 2015). A Figura 1 mostra um esquema da degradação enzimática do complexo amido-iodo que resulta na coloração azul da solução enzimática com o tempo de progresso.

A enzima α -amilase é uma endoamilase que catalisa hidrólise aleatória no interior de um polímero de alta massa molar (amido) associada a molécula de iodo (HOLLO; SZEJTLI, 1957). A coloração é desenvolvida devido ao aprisionamento de íons iodeto (I⁻³) formando cadeias de I₆ no interior da cadeia de amilose (CALABRESE; KHAN, 1999). A formação desse complexo amilose-iodo é responsável pela cor azul intensa, engendrada, por sua vez, a partir da absorção de luz na região do visível das cadeias de iodo presentes dentro da hélice da amilose (MCGRANCE; CORNELL; RIX, 1998).

Figura 1 - Representação esquemática da abordagem sistemática da reação do ITT enzimático.



O fim da reação de hidrólise do amido é evidenciado pelo desaparecimento da cor azul, pois ocorre a desestabilização da inclusão do iodo na estrutura da amilose. O que explica a redução da intensidade da cor através da hidrólise progressiva do amido, formando unidades de maltose e amilo-dextrina de cor violeta, a erito-dextrina de cor vermelho e a acro-dextrina, dextrina-limite e glicose que se apresentam incolor na reação (GUPTA et al., 2003).

A relação entre a dependência da temperatura e as constantes da velocidade de reação, é representada pela determinação da energia de ativação de Arrhenius, na qual representam parâmetros específicos, tais como processos de ligação, dissociação e reação química no curso da catálise enzimática (PARK; KIM; LEE, 2013).

Os estudos de ITT enzimáticos desenvolvidos com a enzima amilase, vêm sendo desenvolvidos através de duas concepções: ITT enzimático sólido (YAN et al., 2008) (CN101055255 (2005), CN201255668U (2008), e CN105865653 (2016) e líquido (BRIZIO; PRENTICE, 2015; YANG; KIM; LEE, 2019).

As patentes CN201255668U (2008) e CN105865653 (2016) desenvolveram um indicador de tempo-temperatura que utilizam enzimas em fase sólida. Estas patentes citam indicadores que mostram o efeito acumulativo do tempo e temperatura através da mudança de cor pela reação de hidrólise de uma enzima e amido com uma solução de iodo como agente indicador, conseguindo assim o propósito de indicar o tempo e temperatura durante o armazenamento e transporte. A concepção deste ITT se baseia no uso do amido (50 a 70 %) numa solução de iodo (30 a 50 %), secos e moídos, e depois homogeneizados em uma solução emulsificante com microcápsulas de enzimas (60 %). Assim, a pasta formada é revestida sobre uma placa de papel e seca novamente, sendo chamada também de cartão de indicação de tempo-

temperatura. Na patente CN101055255 (2005) foi determinada para ITT enzimático sólido a E_a de 112,98 kJ/mol (4 °C, 8 °C, 12 °C, 18 °C, 25 °C, 37 °C) e seu prazo de validade foi de aproximadamente 400 h na temperatura de armazenamento de 8 °C, sendo a principal causa de deterioração o crescimento microbiano.

A patente CN102495052 (2011) é um indicador de tempo e temperatura com a presença de uma enzima líquida, contemplando o uso de uma solução mista de dextrina e iodo com uma solução enzimática de protease glicosada, na qual são embaladas individualmente, e misturadas apenas no momento da ativação. A reação de hidrólise da enzima acontece sob uma solução de dextrina e iodo, que apresenta leitura direta sobre variação de cor avermelhada com a mudança do tempo e da temperatura.

O estudo realizado por Brizio e Prentice (2015) desenvolveu um protótipo de ITT enzimático líquido elaborados a partir de uma solução de amido-iodo, e α -amilase envasados em uma única embalagem plástica, armazenados sob congelamento. O estudo apresentou resultados precisos e de fácil aplicação em escala laboratorial e industrial.

O ITT com princípio ativo da α -amilase em solução líquida apresenta facilidade de preparação, amplo espectro de codificação de cores e custo baixo de produção. No entanto, algumas limitações permanecem nos ITTs enzimáticos, incluindo a instabilidade enzimática que pode ocorrer devido à alteração de temperatura durante a produção ou o armazenamento e o curto tempo de vida útil (CHEN et al., 2021; KIM; KIM; LEE, 2012).

1.7 ESTABILIDADE DA AMILASE

A enzima α -amilase de *Aspergillus oryzae* (EC 3.2.1.1) é mais aplicada em solução líquida, devido à facilidade de preparo e baixo custo de produção. Uma vez que, as enzimas líquidas perdem de 10 a 20 % de sua atividade em poucos meses de armazenamento, a estabilização é uma preocupação. A recomendação geral para o armazenamento da enzima é estar em condições de refrigeração para evitar a contaminação microbiana (CHOI et al., 2014; GUIAVARC'H et al., 2004; ILLANES, 2008).

Alguns aspectos desempenham papel significativo na estabilidade estrutural das α -amilases, como os fatores intrínsecos (por exemplo, sequência de aminoácidos) que confere resistência às temperaturas mais elevadas e os fatores extrínsecos, tais como pH e presença de íons de cálcio (YADAV, 2012).

Existem diferentes abordagens para estabilizar a enzima, imobilização que é um dos métodos mais utilizados (IYER; ANANTHANARAYAN, 2008), o *electrospinning*

(FATARELLA et al., 2014), nanofibras (XU et al., 2013), biopolímeros (ASGHER; NOREEN; BILAL, 2016) e o uso de conservantes, como: açúcares, polióis, álcoois poli-hídricos, surfactantes e íons na forma de sais (DEY et al., 2016; JADHAV; SINGHAL, 2013).

Estudos demonstram que o uso de conservantes auxiliam na proteção da enzima contra a desnaturação, podendo agir como uma camada protetora ao redor das moléculas da enzima (ASOODEH et al., 2014; CHAKRABORTY et al., 2011; DEY et al., 2016; JADHAV; SINGHAL, 2012; SAMBORSKA et al., 2006). A adição de açúcares e polióis nas soluções líquidas enzimáticas fortalecem as interações hidrofóbicas entre os resíduos de aminoácidos não-polares. Essas interações, juntamente com ligações de hidrogênio e interações iônicas e Van der Waals, são essenciais para manter a estrutura catalítica ativa da enzima. Com as interações hidrofóbicas fortalecidas as enzimas se tornam macromoléculas de proteínas mais rígidas e mais resistentes ao desdobramento térmico (FITTER, 2005).

1.8 ESTABILIDADE DO AMIDO-IODO

O complexo amido-iodo consiste de uma matriz linear de átomos de iodo que ocupam a cavidade de uma molécula de polissacarídeo helicoidal (STEIN; RUNDLE, 1948). Estruturalmente, o amido é constituído de amilose com uma estrutura linear e helicoidal e de amilopectina com estrutura ramificada (RUNDLE; FOSTER; BALDWIN, 1944). O iodo (forma I_3^-) é capaz de formar complexos com as moléculas de amilose e de amilopectina. A afinidade do iodo com amilose é de aproximadamente 20% formando uma cor azul absorvendo em comprimento de onda de 650 nm. A coloração vermelho-púrpura apresentada pelo iodo-amilopectina, representam menos de 1 % de afinidade e se refere a absorção em 540 nm (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

A formação de cor resultante e o comprimento de onda da absorção máxima dependem do comprimento do polímero de glucano e das várias espécies de poliiodeto ligadas (RENDLEMAN, 2003). O complexo é facilmente solúvel em água para produzir uma solução azul-escura. No entanto, a instabilidade do complexo sólido também é paralela em solução aquosa, dando origem ao iodo livre e aos produtos de hidrólise (MURDOCH, 1992).

Assim, quando uma solução é preparada a partir do complexo sólido, o iodo molecular dentro da hélice é lentamente convertido em íons, de modo que a hélice contém uma mistura de espécies I_2 e I_3^- . Se o iodo for suficientemente disponível, a mudança é rápida e o seu conteúdo se estabiliza (MURDOCH, 1992).

A instabilidade na solução do complexo ocorre porque os cristais de iodo não são altamente solúveis em água pura. O método convencional de preparação do complexo de AI envolve a adição de iodeto de potássio (KI) para aumentar a solubilidade dos cristais de iodo na água (CALABRESE; KHAN, 1999). Na ausência de KI, a dissolução de I₂ ocorre de forma bastante lenta apresentando influência direta do tempo de dissolução e do pH da solução (CHRASTIL, 1987; KUGE; ONO, 1960; ONO; TSUCHIHASHI; KUGE, 1953). Portanto, o uso de moléculas de surfactante iônico vem sendo estudas para estabilizar o complexo amilose-iodo (KARLBERG; PICULELL; HUANG, 2007; YANG; KIM; LEE, 2019).

1.9 ITTS COMERCIAIS

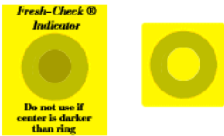
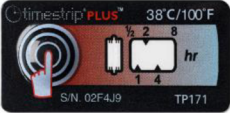
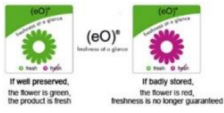
Sistemas de ITT estão disponíveis comercialmente em diversos países e o Quadro 1 mostra a classificação de acordo com o princípio ativo de ação e as condições de atuação e conservação (KUSWANDI et al., 2011). Uma descrição mais detalhada de alguns ITTs está descrita a seguir. O ITT OnVu™ (Bizerba, Alemanha) é em estado sólido e apresenta compostos fotosensitivos, como os espiropiranos, que são coloridos na exposição à luz em baixo comprimento de onda. Este estado colorido (azul escuro) inverte-se ao estado incolor inicial a uma taxa dependente da temperatura. O fator determinante para este ITT é o tempo de ativação; ou seja, quanto maior o tempo de carregamento, maior a vida útil do ITT (TAOUKIS; TSIRONI, 2018).

O ITT Fresh-Check® é utilizado em vacinas infantis nas campanhas da UNICEF, e aplicado em produtos alimentícios, incluindo a cadeia de varejo Monoprix (França), Carrefour em frutas e saladas embaladas, produtos lácteos e sucos Milco (GALAGAN; SU, 2008). O eO ITT (CRYOLOG, França) são aplicados pela empresa Monoprix (Clichy, França) em produtos de carne suína e pela empresa Leclerc (Braga, França) em sanduíches embalados frescos (CHOI et al., 2014).

O laboratório VITSAB Internacional desenvolveu um ITT com o nome comercial Checkpoint (VITSAB A.B., Malmo, Suécia) que funciona com base em reação enzimática. É constituído por dois compartimentos separados, um compartimento constituído por triglicerídeos como substrato e um indicador de pH, e o outro composto por uma solução de enzimas lipolíticas. Esses dois compartimentos são separados por um selo. É ativado quebrando o selo entre os dois compartimentos. Em seguida, ocorre uma mudança de cor devido à diminuição do pH causada pela hidrólise enzimática do substrato que produz ácido, causando uma queda de pH que passa de verde para amarelo brilhante. Estes ITTs são indicados para

aplicação em frutos do mar, nos voos da British Airways para monitorar a temperatura para o manuseio adequado das refeições servidas e em embalagens de frango fresco Kneuss (Suíça) (TAOUKIS et al., 2016; TAOUKIS, 2010).

Quadro 1 - Indicador de tempo e temperatura comerciais

Nome comercial	Empresa/País	Condição de atuação	Tipo de sensor	Condição de conservação	Ilustração
OnVu™	BIZERBA/ Alemanha	Refrigeração/ Congelamento	ITT químico fotossensível	Diversas	
Fresh-Check®	Temptime/ EUA	Refrigeração	ITT químico polimerização	-24°C	
Time strip PLC	Time strip PLC	Refrigeração/ Congelamento	ITT químico polimerização	22°C/ 2 anos	
Insignia Cold Inspection Intelligent Labels	Insignia Technologies Ltd/ Reino Unido	Refrigeração	ITT químico polimerização	25°C / 6 meses	
Traceo, Traceo restauration e eO	CRYOLOG AS. / França	Refrigeração	ITT biológico	-18°C	
Check Point®	VITSAB / Suécia	Refrigeração/ Congelamento	ITT enzimático	10°C	
MonitorMark™	3M/EUA	Refrigeração/ Congelamento	ITT físico difusão	15 a 26°C/ 2 anos	
Freeze Watch™	3M/EUA	Congelamento	ITT físico difusão	0 a 4°C/ 5 anos	
TT Sensor Plus	Avery Dennison / EUA	Aquecimento/ Refrigeração/ Congelamento	ITT físicoquímico	25°C/ 3 anos	
CoolVu™	FRESH POINT/ Israel	Aquecimento/ Refrigeração/ Congelamento	ITT físicoquímico	Diversas	

Fonte: adaptado de OnVu, disponível na internet: <http://www.onvu.com>; Fresh-Check, disponível na internet: <http://www.temptimecorp.com/>; Time strip PLC, disponível na internet: www.timestrip.com; Insignia Cold Inspection disponível na internet: <https://www.insigniatechnologies.com/home.php?video>;

Traceo, Traceo restauration e eO, disponível na internet: <http://cryolog.com/topcryo/>; Check Point, disponível na internet: www.vitsab.com ; MonitorMarK, disponível na internet: <http://www.tiptemp.com/>; Freeze Watch, disponível na internet: https://www.3m.com/3M/en_US/food-safety-us/; TT Sensor Plus, disponível na internet: <https://label.averydennison.com/en/home/products/intelligent-labels/time-temperature-tracking.html>;

CoolVu, disponível na internet: <http://insigniatechnologies.co.uk/products.asp>.

A TRACEO é uma empresa que desenvolveu um ITT comercial chamado CRYOLOG (França). Este ITT microbiano é composto por 3 camadas, onde contém bactérias lácticas, um indicador de cor (fucsina ácida) e um meio nutritivo para o crescimento de microrganismos. Quando exposto a uma temperatura superior à temperatura crítica, as camadas são quebradas, resultando em reação enzimática pela bactéria que faz com que a cor mude de verde para vermelho (KUSWANDI, 2020).

Para o desenvolvimento de um novo indicador inteligente, a Sociedade Americana de Testes e Materiais - ASTM F1416 desenvolveu um guia padrão com informações sobre a seleção de indicadores de tempo-temperatura disponíveis comercialmente para uso de embalagens externas não invasivos, utilizada em produtos perecíveis, como alimentos e produtos farmacêuticos (ASTM, 2003). Os principais requisitos para aceitação de uma etiqueta comercial na escala industrial é que o ITT seja confiável, reproduzível, flexível, adaptável a várias gamas de temperatura (por exemplo, congelada, refrigerada, temperatura ambiente) e que apresente respostas para períodos de alguns dias até vários meses (PARISI; BARONE; CARUSO, 2015). Isso quer dizer, que o ITT precisa ser integrado de maneira econômica, causando mudanças mínimas na área de produção, devem ter uma vida útil longa antes da ativação para uso e ser facilmente ativável. É necessário também, que o ITT resista a abusos mecânicos normais e que não represente risco de contaminação ao produto (BALDWIN, 2011; SOON; SAGUY, 2017).

CAPÍTULO III
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO I - AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO PRINCÍPIO ATIVO PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM INDICADOR DE TEMPO E TEMPERATURA ENZIMÁTICO

RESUMO

Os indicadores de tempo e temperatura enzimático (ITT) estão disponíveis comercialmente com o escopo de monitorar a qualidade dos alimentos. Podem ser anexados individualmente a uma embalagem para informar a inocuidade do produto, através de variação colorimétrica irreversível. Porém, a principal limitação para aceitação de um ITT comercial enzimático aplicado em escala industrial, está no modo de conservação antes do uso (refrigeração/congelamento). O presente estudo descreve o procedimento utilizado no desenvolvimento do princípio ativo de um ITT enzimático líquido, avaliando a estabilidade da enzima α -amilase e do substrato amido-iodo. Após a realização de análises para a verificação dos efeitos do pH, da temperatura e do uso de estabilizantes na estabilidade do princípio ativo enzimático verificou-se que os mesmos apresentaram no mínimo 6 meses de estabilidade em temperaturas que variaram de 4 e 35°C, quando a enzima estava em solução tampão TRIS (pH 8,0) e o amido diluído em solução aquosa, sem uso de conservantes. Desta forma, o ITT enzimático desenvolvido apresentou viabilidade para aplicação comercial por ser estável a temperatura ambiente sem a necessidade de grandes na área de produção industrial.

Palavras chaves: α -amilase. Amido-iodo. Estabilizantes. ITT.

2 INTRODUÇÃO

O controle e o gerenciamento efetivo da cadeia do frio de produtos alimentícios resfriados são importantes para sua viabilidade comercial, uma vez que desvios das especificações em relação às condições de temperatura, frequentemente ocorrem, podem ser prejudiciais à qualidade e segurança do alimento (ADIANI; GUPTA; VARIYAR, 2021; ALBRECHT et al., 2020; PANDIAN; CHATURVEDI; CHAKRABORTY, 2021). Assim, para atender as necessidades de controle de temperatura na cadeia de suprimentos, vem sendo estudado novas gerações de embalagens inteligentes, incluindo indicadores de tempo-temperatura (ITT) (GHORBANI; RABBANI, 2021; JHUANG et al., 2020c; LEE et al., 2021; OH; JO; LEE, 2021).

Os ITT são considerados uma alternativa promissora na atuação de alimentos refrigerados, isso porque informam quando o produto é submetido a temperaturas abusivas de uma forma rápida e fácil (PAVELKOVÁ, 2013). A sua ação baseia-se em mudança irreversível física (JAFRY et al., 2017; SUPPAKUL et al., 2018), química (GAO et al., 2021; LEE et al.,

2021; LEE et al., 2019), enzimática (JAISWAL et al., 2020; JHUANG et al., 2020b; OH; JO; LEE, 2021; PANDIAN; CHATURVEDI; CHAKRABORTY, 2021) ou microbiológica (GHORBANI; RABBANI, 2021; MATARAGAS et al., 2018), expressa como uma resposta visível na forma de deformação mecânica e desenvolvimento de cor (GIANNAKOUROU et al., 2005; TAOUKIS; LABUZA, 1989).

Um ITT desenvolvido com enzima α -amilase oriunda de *Aspergillus oryzae* líquida fornece uma série de vantagens, incluindo facilidade de preparação, um ensaio rápido, simples e barato (BRIZIO; PRENTICE, 2015; YAN et al., 2008). É baseado na reação entre o amido e o iodo (azul), com posterior atuação enzimática sobre esse complexo, cuja cor muda com os resultados da variação do tempo e da temperatura de armazenamento. Isso porque estas enzimas são termosensíveis, podendo ser facilmente adaptadas para controlar as condições de temperatura na cadeia de frio, além de apresentarem amplo espectro de especificidade (PANDIAN; CHATURVEDI; CHAKABORTY, 2021). Entretanto, as principais limitações são quanto ao modo de conservação antes do uso (refrigeração) e ao curto tempo de vida útil. Além, de a maioria dos estudos não revelarem as etapas de validação e avaliação da vida útil do princípio ativo na qual é composto o indicador inteligente.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a estabilidade da enzima α -amilase *Aspergillus oryzae* e do complexo amido-iodo em temperatura extremas de conservação e elaborar um protótipo de ITT.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Um esquema sequencial das principais etapas propostas para a validação dos princípios ativos do ITT desenvolvido é apresentado na Figura 1.

2.1 MATERIAL

A Tabela 1 contém a composição e as principais características da enzima α -amilase de *Aspergillus oryzae* (Fungamyl® 800L, Novozymes S/A, Bagsvaerd, Dinamarca) utilizada neste estudo.

Figura 1 - Esquema sequencial das etapas de validação dos princípios ativos (enzima e substrato) e elaboração do ITT

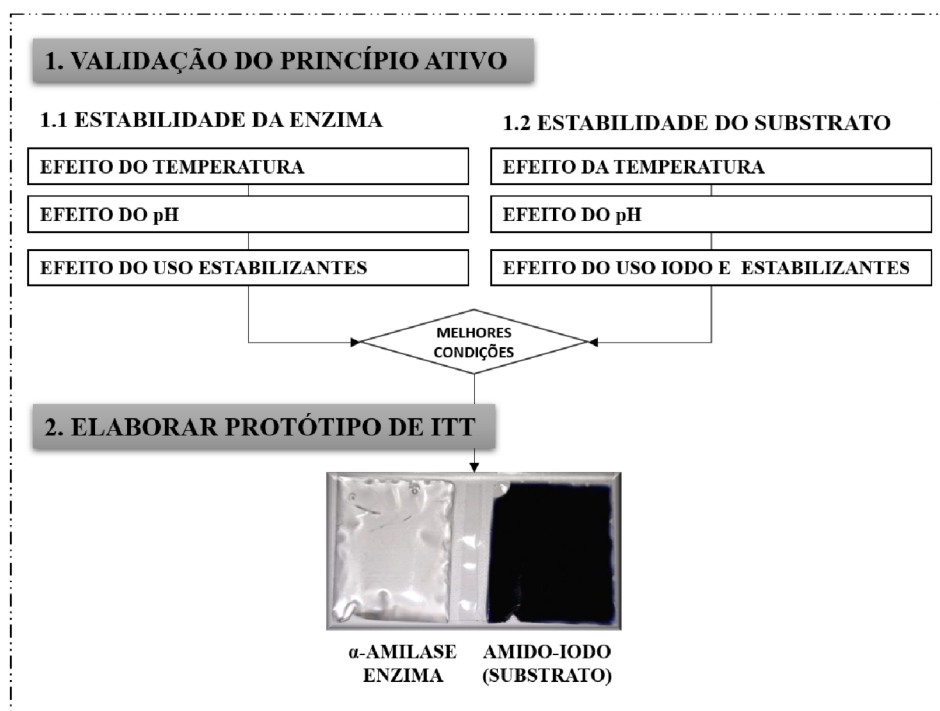


Tabela 1 - Características da enzima Fungamyl® 800L

Composição	% m/m
Água, CAS ¹ n°7732-18-5	46
Sorbitol, CAS n°50-70-4	32
Cloreto de Sódio, CAS n°7647-14-5	11
Sorbato de potássio, CAS n° 24634-61-5	0,2
α - amilase ² , CAS n°9000-90-4	11
Características (Unidade)	Valor
Densidade (g/mL)	1,26
pH a 25 °C ótimo	5,00
Temperatura ótima (°C)	30-40
Atividade Enzimática (UAF/g) ³	800
Temperatura de armazenamento (°C)	0-10
Tempo de armazenamento (meses)	3

¹Chemical Abstracts Service.

²Definido como enzima concentrada (base matéria seca).

³Unidade alfa-amilásica por grama.

Fonte: Ficha de Informação do Produto – Novozymes (2019).

A solução de amido de batata solúvel (Labsynth Produtos para Laboratórios LTDA, São Paulo, Brasil), a solução de iodo e os demais reagentes químicos utilizados foram de grau analítico.

2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA α -AMILASE

A atividade enzimática foi determinada pelo método iodométrico a partir da metodologia descrita por Garda-Buffon, Baraj e Badiale-Furlong (2010) com adaptação. 0,1 mL da enzima α -amilase (0,1 %) e 0,8 mL de tampão acetato de sódio (pH 5,0) foram adicionados em 4 mL de solução de amido (0,6%) e esta solução foi submetida à agitação em *Shaker* (Cientec, CT-712RNT, Piracicaba, Brasil) a 20 °C por 5 min. Em seguida, a reação foi inibida com a adição de 0,5 mL de HCl (1 M) e 0,32 mL de solução de iodo (0,3 % I_2 para 3,0 % KI). Após 20 min, determinou-se a atividade enzimática por espectrofotômetro (Bioespectro, SPP2, São Paulo, Brasil) a 620 nm. Uma curva padrão de amido-iodo foi utilizada para a obtenção da equação da reta com concentrações variando de 0,06 a 0,16 mg_{amido}/mL. A unidade da atividade enzimática foi definida como a capacidade da enzima em hidrolisar 1 μ g de amido em 1 min a 20°C.

2.3 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA α -AMILASE SOB EFEITO DO pH E TEMPERATURA

Para caracterizar a enzima α -amilase sua atividade foi avaliada sob efeito do tempo, da temperatura e do pH conforme a metodologia descrita por Dey e Banerjee (2015), com adaptação. O tempo de foi avaliada através dos intervalos de tempo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 30 e 60 min, com temperaturas de 10, 20 e 30 °C e pH variando de 3 a 8. Para avaliação a determinação da temperatura ótima, a enzima foi mantida no pH de 5,0 (Tabela 1) e foram testadas diferentes temperaturas na faixa de 10 a 55 °C com intervalos de 5 °C. Para a determinação do pH ótimo, a enzima foi mantida na temperatura de 30 °C (Tabela 1) variando pH de 3,0 a 11,0, sendo utilizado o tampão acetato de sódio para os pH entre 3 e 7 e o tampão tris-HCl para os pH 8,0 a 11,0.

2.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO USO DE ESTABILIZANTES NA ATIVIDADE DA ENZIMA α -AMILASE

O preparo da solução enzimática foi realizado segundo o método descrito por Dey; Banerjee (2015), com adaptação. A enzima em solução líquida (0,1 % v/v - pH 8,0) foi submetida às diferentes concentrações de estabilizantes a 20 °C por 30 min a 180 rpm em *Shaker*.

A atividade enzimática foi determinada pelo método iodométrico de acordo com a metodologia descrita por Garda-Buffon, Baraj e Badiale-Furlong (2010) descrita no item 2.2. Para expressar os resultados, foi utilizada a atividade enzimática residual percentual (AR) conforme Equação 1. Onde, a atividade enzimática residual é a relação da atividade enzimática do tratamento com o estabilizante (Ae) dividido pela atividade enzimática do tratamento sem estabilizantes (Ase).

$$AR (\%) = \frac{A_e}{A_{se}} \times 100 \quad (1)$$

No experimento controle não foram colocados estabilizantes. A escolha dos estabilizantes e as concentrações testadas foram determinadas a partir das referências descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentrações de estabilizante (%) em três categorias principais (sais metálicos, aditivos e solventes orgânicos)

Categorias	Estabilizantes	C1	C2	C3	Referências
Sais metálicos	Cloreto de bário	0,02	0,1	0,21	Assodeh et al., 2014
	Cloreto de cálcio	0,01	0,06	0,11	Assodeh et al., 2014; Chakraborty et al., 2011; Roy; Mukherjee, 2013
	Sulfato de cobre	0,02	0,08	0,16	Asoodeh et al., 2014; Chakraborty et al., 2011
	Cloreto de ferro	0,01	0,08	0,16	Asoodeh et al., 2014; Chakraborty et al., 2011
	Sulfato de zinco	0,01	0,02	0,08	Assodeh et al., 2014
	Sorbato de potássio	0,3	0,75	1,5	Autor
	Óxido de magnésio	0,01	0,01	0,02	Asoodeh et al., 2014; Chakraborty et al., 2011
	Cloreto de sódio	7	11	14	Chakraborty et al., 2011
	Digliconato Clorexidina	2,8	8,3	13,9	Autor
Aditivos	Glicerol	20	30	40	Asoodeh et al., 2014; Chakraborty et al., 2011; Jadhav; Singhal, 2012; Samborska et al., 2005
	Peróxido de hidrogênio	0,2	0,4	0,6	Chakraborty et al., 2011; Roy; Mukherjee, 2013
	Triton x	0,1	1	10	Asoodeh et al., 2014; Chakraborty et al., 2011; Roy; Mukherjee, 2013; Roy; Rai; Mukherjee, 2012

Continuação Tabela 2 - Concentrações de estabilizante (%) em três categorias principais (sais metálicos, aditivos e solventes orgânicos)

Categorias	Estabilizantes	C1	C2	C3	Referências
Aditivos	Tween 80	0,1	1	10	Chakraborty et al., 2011; Roy; Rai; Mukherjee, 2012
	Persulfato de amônia	0,1	0,2	1	Assodeh et al., 2014
	EDTA	0,02	0,06	1	Asoodeh et al., 2014; Roy; Rai; Mukherjee, 2012
	Sorbitol	30	40	50	Khajeh; Nemat-Gorgani, 2001; Samborska et al., 2005
	Uréia	6	12	30	Asoodeh et al., 2014; Chakraborty et al., 2011; Roy; Rai; Mukherjee, 2012
	Mercaptoetanol	0	0,01	0,04	Assodeh et al., 2014
Solventes Orgânicos	Clorofórmio	5	10	20	Assodeh et al., 2014
	Dimetil sulfóxido	5	10	20	Brum; Teague, 1989
	Etanol	5	10	20	Asoodeh et al., 2014; Roy; Mukherjee, 2013
	Hexano	5	10	20	Asoodeh et al., 2014; Kapfo et al. et al., 2013
	Tolueno	5	10	20	Assodeh et al., 2014
	Isobutil álcool	5	10	20	Assodeh et al., 2014
	Acetona	10	20	30	Asoodeh et al., 2014; Roy; Mukherjee, 2013
	Metanol	10	20	30	Asoodeh et al., 2014; Roy; Mukherjee, 2013
	Éter de petróleo	10	20	30	autor

C1: concentração 1; C2: concentração 2; C3: limite superior de concentração

2.4.1 Atividade inibitória dos estabilizantes sobre a enzima α -amilase

A partir dos tratamentos (enzimas+estabilizantes) que apresentaram os melhores resultados foi realizado o estudo cinético da atividade inibidora da α -amilase. O método foi realizado a partir da adição de 0,1 mL da enzima (0,1 %), contendo duas diferentes concentrações de estabilizantes para cada tratamento: óxido de magnésio (0,12 e 0,16 %), sorbato de potássio (0,75 e 1,50 %), peróxido de hidrogênio (0,4 e 0,6 %), triton x (0,1 e 1 %) e digliconato de clorexidina (8,30 e 13,89 %).

A atividade enzimática foi determinada pelo método iodométrico de acordo com metodologia descrita por Garda-Buffon, Baraj e Badiale-Furlong (2010), com adaptação. Foram adicionados 0,8 mL da solução enzima+estabilizante em tampão acetato de sódio (pH 5,0) em 4 mL de 6 diferentes soluções de amido (0,10; 0,16; 0,20; 0,25; 0,33; 0,5 mg/mL) por 5 min a 20°C. Em seguida, a reação foi inibida com a adição de 0,5 mL de HCl (1 M) e 0,32 mL de solução de iodo (0,3 % I_2 para 3,0 % KI). Após 20 min foi determinada a atividade enzimática em espectrofotômetro a 620 nm.

A constante de Michaelis (K_m) e a velocidade máxima ($v_{máx}$) foram determinadas utilizando o gráfico de Lineweaver-Burk (Lineweaver & Burk, 1934), também sendo avaliado o tipo de inibição causado pelos estabilizantes: reversível (competitiva, incompetitiva, não-competitiva) ou irreversível.

2.4.2 Estabilidade da enzima α -amilase frente a diferentes pHs e temperaturas

A partir dos resultados obtidos na atividade inibitória dos estabilizantes na α -amilase. A estabilidade enzimática foi avaliada em pH variando de 3,0 a 8,0, utilizando a metodologia descrita por Dey e Banerjee (2015) com adaptação. A enzima α -amilase foi pré-incubada com as diferentes soluções tampão, por 30 min a 20 °C e 180 rpm em Shaker. Após, a enzima foi armazenada em frasco âmbar nas condições de 4 e 35°C por um período de 6 meses. A solução enzimática foi deixada em temperatura ambiente para posterior análise. A atividade enzimática foi determinada pelo método iodométrico de acordo com metodologia descrita por Garda-Buffon; Baraj; Badiale-Furlong (2010) descrita no item 2.2.

2.5 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO COMPLEXO AMIDO E IODO

Para a elaboração da solução de amido-iodo, o amido de batata (0,6 % m/v) foi gelatinizado em chapa aquecedora a 85 °C por 10 ± 3 min. Após o arrefecimento da solução, foi adicionado uma solução de iodo (0,3 % I_2 para 3,0 % KI) na proporção 1:12 iodo/amido (m/v) (BRIZIO; PRENTICE, 2015).

O efeito do KI na estabilidade do complexo AI foi avaliado utilizando 3 soluções de amido-iodo em diferentes concentrações de KI (3, 5 e 8 %), nas temperaturas de 4 e 35 °C por 5 meses (1°, 4°, 8°, 17, 38°, 97° e 150° dia). A concentração do amido-iodo foi determinada em espectrofotômetro a 620 nm, utilizando como base de cálculo a curva padrão de amido-iodo nas concentrações de 0,06 a 0,16 mg/mL

A estabilidade do complexo AI foi avaliada em diferentes pH (4,0 a 8,0) e quanto ao efeito dos estabilizantes sorbato de potássio (0,015; 0,075; 0,150 %) e digliconato de clorexidina (2,800; 8,300; 13,89 %), sendo que as concentrações testadas foram escolhidas através de testes preliminares e foi considerado estável quando não havia precipitação das fases. Para isso a solução de amido-iodo foi pré-incubada nas diferentes soluções tampão, por 30 min a 20 °C e 180 rpm em *Shaker*. As soluções foram armazenadas em frascos âmbar, nas temperaturas de 4 e 35 °C por 6 meses para posterior análise. O experimento controle foi solubilizado em solução aquosa e a concentração do amido-iodo foi determinada em espectrofotômetro a 620 nm.

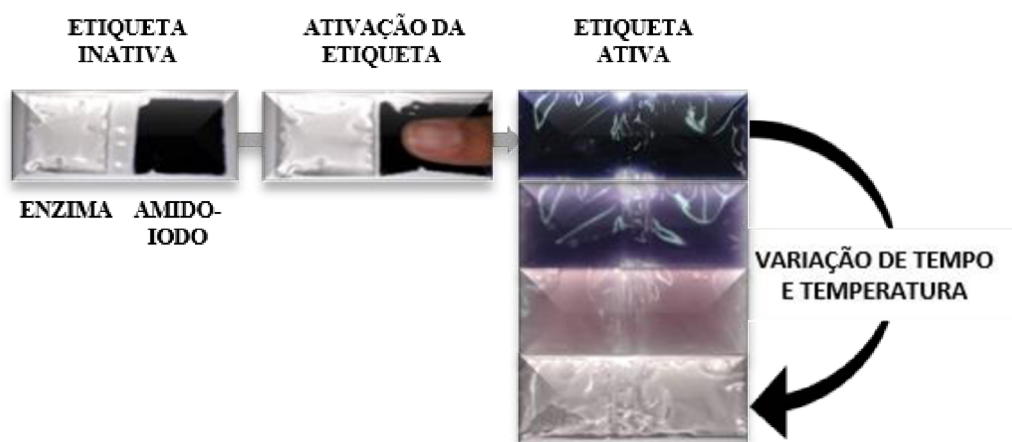
2.6 ELABORAÇÃO DOS PROTÓTIPOS DE ITT ENZIMÁTICOS

Os protótipos de ITT enzimáticos foram elaborados a partir das melhores condições encontradas na avaliação da estabilidade dos princípios ativos (enzima e amido-iodo). O protótipo de ITT foi produzido baseando-se no método empregado por Brizio e Prentice (2015), com adaptação. O novo protótipo de indicador de tempo e temperatura enzimático foi elaborado com conceito de etiqueta compartimentalizada, separando a solução de amido-iodo da solução enzimática.

A preparação dos protótipos de ITT foi realizada em temperatura ambiente, adicionando a enzima α -amilase em seis diferentes concentrações (1, 2, 3, 4, 5 e 6 % v/v de enzima diluída em tampão TRIS (pH 8,0)). Na elaboração da solução de amido-iodo, o amido de batata (0,6 % m/v) foi gelatinizado com água em chapa aquecedora a 85 °C por 10 ± 3 min. Após o arrefecimento da solução, foi adicionado uma solução de iodo (0,3 % I_2 para 3,0 % KI) na proporção 1:12 iodo/amido (m/v) (BRIZIO; PRENTICE, 2015).

Para a elaboração dos protótipos foram adquiridas embalagens plásticas (4x6 cm) de filme polietileno. O protótipo foi selado no meio com o auxílio de uma seladora (Modelo 200 S, SELOVAC Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil), dividindo o protótipo em dois compartimentos, apresentando uma selagem interna de fácil ruptura. Cada solução foi homogeneizada em agitador magnético e envasada com 2 mL da solução amido-iodo e 2 mL solução enzimática em cada compartimento. A selagem externa foi realizada com o auxílio de uma seladora, com vácuo e tempo de soldagem de 15 s. O esquema de funcionamento do ITT enzimático líquido compartimentalizado está demonstrado na Figura 2.

Figura 2 - Esquema do funcionamento do protótipo de ITT enzimático líquido



O princípio de funcionamento do protótipo do ITT enzimático da Figura 2, apresenta primeiramente a etiqueta inativa, onde se tem isoladamente em cada compartimento: enzima e amido-iodo. O método de ativação é realizado através da desobstrução manual da selagem interna, com a mistura das soluções, o ITT se encontra em estado ativo. A partir de então, ocorre uma reação colorimétrica através da hidrólise enzimática sob o substrato (amido-iodo), provocando mudança de cor do azul escuro em cores sequenciais até o incolor quando a variação de temperatura ao longo do tempo.

2.7 VALIDAÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS PARA ELABORAÇÃO DOS PROTÓTIPOS DE ITT

Os 6 diferentes protótipos de ITT foram armazenados em incubadoras (Marconi, MA 415/S, São Paulo, Brasil) nas temperaturas de 4, 10, 15, 25 e 35 °C, a variação da cor foi avaliada visualmente uma vez ao dia e mensuradas em colorímetro (Modelo Chroma Meter CR-400/410, Konica Minolta, Osaka, Japão), utilizando o sistema *CIELab* – *Comission Internationale de L'Eclairege* (iluminante D65), obtendo as dimensões L^* , a^* , b^* , onde L^* indica a luminosidade, a^* mede a variação entre a cor vermelha e verde, e o valor de b^* quantifica a intensidade da cor amarela a azul. A partir destes parâmetros foi calculada a diferença de cor (ΔE^*) através da Equação 1.

$$\Delta E = \sqrt[2]{\Delta L^2 * \Delta a^2 * \Delta b^2} \quad (1)$$

Onde: $\Delta L^* = L - L_{tempo\ zero}$; $\Delta a^* = a - a_{tempo\ zero}$; $\Delta b^* = b - b_{tempo\ zero}$.

As análises foram interrompidas quando nenhuma mudança de cor azul adicional poderia ser medida na etiqueta. O fim da vida-útil dos protótipos foi definido como o tempo que a cor azul escura do ITT leva, para chegar a uma condição incolor ($\Delta E^* = 78,0$).

2.8 CÁLCULO DOS CUSTOS DO PROTÓTIPO DE ITT

O cálculo dos custos foi avaliado através do somatório dos custos individuais das matérias-primas (enzima, tampão TRIS, amido, iodo, iodeto de potássio) e da embalagem, considerando-se três orçamentos de fornecedores diferentes.

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) com posterior Teste de Tukey, com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$), utilizando o programa Statistic 5.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA α -AMILASE

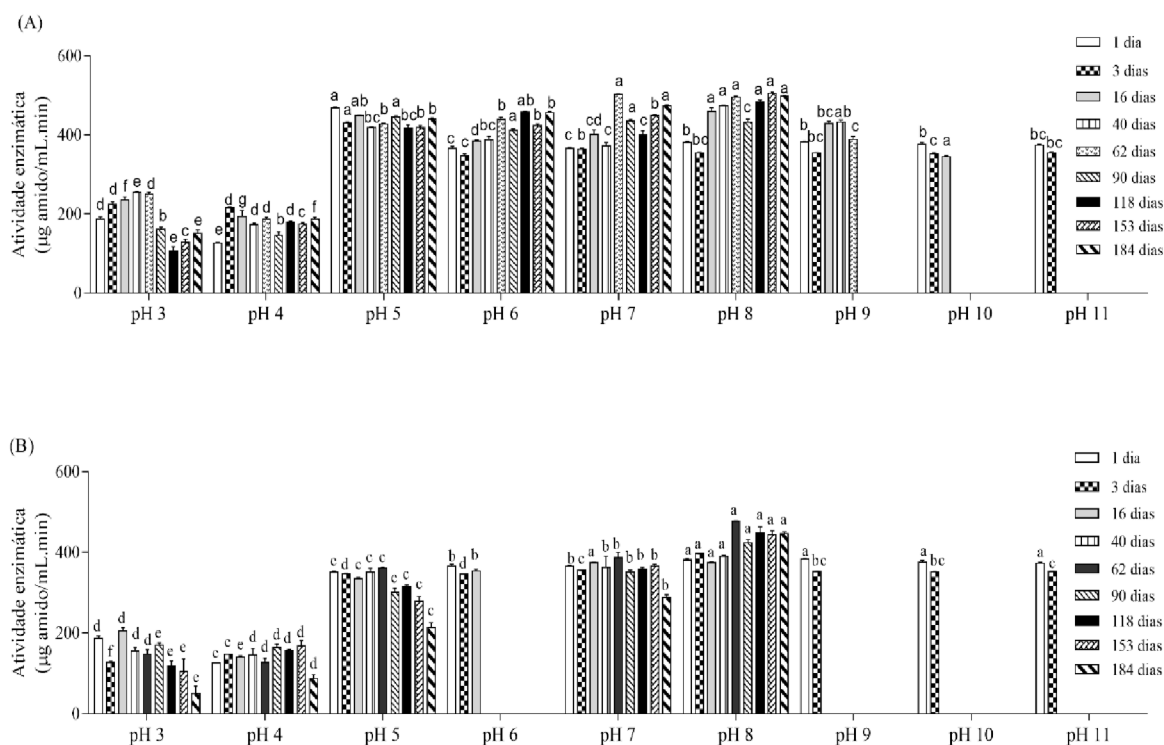
A enzima α -amilase apresentou atividade residual maior que 60 % entre 25 e 45°C e mais de 70 % da atividade amilolítica foi em pH ácido (3,0 a 5,0), cerca de 67 % em pH 7,0 e 40 % em pH 8,0 (Apêndice 1).

Com relação ao tempo de reação da enzima α -amilase sobre o complexo amido-iodo (Apêndice 2) pode-se observar que na região ácida e neutra a atividade enzimática foi de 400 a 800 μg amido/mL.min em 5 min de reação. E quando submetida em tampão alcalino (pH 8,0) a atividade foi de 125,79 μg amido/mL min, atingindo tempo reacional de 60 min. Em geral, α -amilases expressam maior atividade sob ambiente ácido (ASOODEH et al., 2014). Um dos fatores mais importantes que influenciam a atividade catalítica da amilase é o pH em que a α -amilase está dissolvida, isso porque a carga superficial da enzima muda em função do mesmo

(YANG et al., 2017). De acordo com pH do meio, os aminoácidos do centro ativo da enzima apresentam uma carga superficial diferente, interferindo diretamente na reação enzima-substrato (FELLER et al., 2011).

É possível observar pelos resultados obtidos que a enzima α -amilase em pH neutro e ácido está carregada positivamente, modificando a força iônica e aumentando a interação da enzima-substrato. Em contrapartida, em pH básico as proteínas carregadas negativamente diminuem as interações eletrostáticas entre a enzima e o substrato. As Figuras 3a e 3b mostram a atividade enzimática sob o efeito do pH por 6 meses, quando submetidas a temperatura de 4 e 35 °C, respectivamente.

Figura 3 - Atividade enzimática da α -amilase submetida a diferentes pHs nas temperaturas de 4 °C (a) e 35 °C (b) em 184 dias.



Letras minúsculas iguais para o mesmo tempo (dia), indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$); (Média $\pm$ desvio padrão).

Na faixa de pH de 5,0 a 8,0 quando submetida a temperatura de 4 °C para 35 °C, ocorre uma redução na estabilidade da enzima nos tratamentos, com exceção dos tratamentos com a enzima submetida ao pH 8. Estudos realizados por Carrlsen, Nielsen e Villadsen (1996) também mostraram que a α -amilase exibiu estabilidade na mesma faixa de pH. Na medida que uma enzima em solução aquosa é submetida ao aquecimento, suas moléculas se desdobram

parcialmente como resultado de um rompimento das interações não covalentes (CREIGHTON, 1983). De acordo com Illanes (2008) se este aquecimento persistir, a enzima perde a maior parte de sua estrutura secundária e terciária, ocorrendo a desnaturação.

A enzima na faixa de pH 3,0 a 4,0 apresentou baixa atividade enzimática ao longo do tempo (184 dias). Observou-se perda irreversível da atividade da enzima α -amilase quando submetida ao pH alcalino (9,0 a 11,0), que ocorreu devido a proliferação de bactérias nas amostras experimentais observada nos primeiros dias de análise através da turbidez da solução e presença de colônias de mofo.

O resultado obtido por Bayramoglu et al. (2004) com α -amilase em tampão fosfato 50 mM, pH 6,5, a 35°C, apresentou vida útil de 35 dias. No estudo realizado por He et al. (2014) a α -amilase armazenada em solução tampão fosfato (20 mM, pH 6,9) a 4°C, perdeu 80 % de sua atividade em até 30 dias. Outros estudos com α -amilase em tampão de acetato de sódio 0.1 M, pH 5,0 teve vida útil de 15 dias (NADAR .et al., 2016) e de 40 dias (YANG; SONG, 2016).

Os resultados do nosso trabalho, com a enzima α -amilase em tampão TRIS, pH 8,0 apresentou estabilidade por 184 dias, em temperatura extremas de conservação (4 e 35 °C). Ao comparar com os dados encontrados da literatura, estes resultados sem o uso de conservantes apresenta elevado tempo de vida útil (6 meses). Sendo esta, a condição recomendada para aplicação em protótipos de ITTe.

4.2 EFEITO DO USO DE ESTABILIZANTES NA ATIVIDADE DA ENZIMA α -AMILASE

A fim de encontrar novos estabilizantes que atuem na estabilidade da enzima em diferentes temperaturas a Tabela 3 apresenta os resultados da atividade residual da enzima α -amilase. O tratamento controle (sem estabilizante) foi realizado com a α -amilase em tampão TRIS, pH 8,0, considerando sua atividade residual de 100%.

A partir dos resultados da Tabela 3, percebe-se que na classe dos sais metálicos houve aumento na atividade da enzima α -amilase com o aumento das concentrações dos estabilizantes sorbato de potássio, óxido de magnésio e digliconato de clorexidina. Enquanto, os demais sais adicionados (Ba^+ ; Ca^+ , Cu^+ , Zn^{+2} , Na^{+2}) diminuiram a atividade de forma dependente. Houve inibição da atividade enzimática quando a enzima foi exposta a presença de cloreto de ferro na concentração de 5 e 10 mM (0,081e 0,162 % m/v). De acordo com Carvalho et al. (2008), a inibição da atividade enzimática pode ser compreendida pela competição entre o cátion ligado à proteína e o cátion exógeno.

Tabela 3 - Atividade residual (%) da enzima α -amilase sob efeito dos estabilizantes

Estabilizantes		Atividade Residual (%)		
		C1	C2	C3
Sais metálicos	Cloreto de bário	100,44±0,05 ^{bA}	99,88±0,06 ^{bB}	99,49±0,06 ^{bC}
	Cloreto de cálcio	99,46±0,07 ^{bA}	98,74±0,07 ^{bcdB}	86,49±0,26 ^{iC}
	Sulfato de cobre	99,93±0,13 ^{bA}	98,78±0,2 ^{bcdB}	91,04±,74 ^{hC}
	Cloreto de ferro	92,13±0,76 ^{hgA}	39,62±,68 ^{kB}	6,34±1,23 ^{lC}
	Sulfato de zinco	97,12±0,16 ^{cdeA}	94,14±0,2 ^{fgB}	72,35±1,81 ^{jC}
	Sorbato de potássio	96,71±0,39 ^{deC}	99,70±,15 ^{bb}	105,34±0,21 ^{aa}
	Óxido de Magnésio	92,19±0,09 ^{ghA}	98,72±0,01 ^{bcdB}	99,32±0,01 ^{bc}
	Cloreto de sódio	99,23±0,59 ^{bcA}	96,72±2,00 ^{deAB}	95,16±0,32 ^{efB}
	Digliconato de clorexidina	108,38±2,02 ^{aa}	109,51±01,87 ^{aa}	112,52±0,59 ^{aa}
Aditivos	Glicerol	99,71±0,03 ^{cA}	98,82±0,04 ^{cdB}	97,11±0,19 ^{fgC}
	Peróxido de hidrogênio	96,87±0,30 ^{fghB}	97,02±0,04 ^{fghB}	112,44±0,17 ^{aa}
	Triton X	93,01±0,04 ^{kC}	96,18±0,20 ^{ghB}	101,99±0,56 ^{ba}
	Tween 80	98,72±0,17 ^{cdeA}	71,84±0,18 ^{oB}	72,30 ±0,58 ^{oB}
	Persulfato de amônio	97,61±0,03 ^{efA}	95,97±0,06 ^{hB}	94,38±0,19 ^{ijC}
	EDTA	96,83±0,13 ^{fghA}	96,98±0,06 ^{fghA}	94,78±0,22 ^{iB}
	Sorbitol	96,05±0,11 ^{hA}	93,65±0,04 ^{ikB}	87,57±0,23 ^{nC}
	Ureia	96,12±0,08 ^{ghA}	97,96±0,21 ^{defA}	51,71±1,40 ^{pB}
	Mercaeptanol	91,27±0,07 ^{lA}	89,41±0,25 ^{mB}	87,64±0,45 ^{nC}
Solventes orgânicos	Clorofórmio	98,30±0,80 ^{defghA}	98,06±0,78 ^{defghAB}	96,28±0,80 ^{hijB}
	Dimetilsulfóxido	99,45±0,12 ^{defA}	94,56±0,18 ^{ijkB}	88,47±0,19 ^{nC}
	Etanol	99,86±0,05 ^{cdeA}	96,94±0,12 ^{fghiB}	83,55±0,09 ^{oC}
	Hexano	99,42±0,03 ^{defA}	98,85±0,13 ^{defgB}	93,39±0,09 ^{klC}
	Tolueno	99,34±0,25 ^{defA}	91,59±0,67 ^{lmB}	87,37±0,08 ^{nC}
	Álcool isobutil	100,55±0,07 ^{cdA}	76,61±0,09 ^{pB}	70,62±0,21 ^{qC}
	Acetona	96,31±0,02 ^{ghijA}	95,71±0,04 ^{hijkB}	93,86±0,13 ^{ikC}
	Metanol	97,91±0,07 ^{efghA}	81,24±0,87 ^{oB}	77,17±0,05 ^{pC}
	Éter de petróleo	102,12±0,11 ^{ca}	89,30±0,09 ^{mnb}	78,14±0,02 ^{pC}

C1: concentração 1; C2: concentração 2; C3: concentração 3 (concentrações definidas na Tabela 2 para cada estabilizante)

Letras minúsculas iguais para a mesma classe (sais metálicos/aditivos/solventes orgânicos) nas três concentrações, indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$); (Média ± desvio-padrão).

Letras maiúsculas iguais para cada estabilizante nas três concentrações, indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$); (Média ± desvio-padrão)

Na classe dos aditivos, a enzima α -amilase mostrou-se estável na presença do surfactante Triton X-100, pois a enzima reteve 101,99 % de sua atividade, quando incubada com 10 % do aditivo por 24 h. A α -amilase foi considerada estável na presença do agente oxidante H_2O_2 , na concentração de 0,6%, pois a atividade residual foi de 112,44 %. Roy, Rai e Mukherjee (2012) demonstraram significativa estabilidade da α -amilase na presença de agentes oxidantes e surfactantes como EDTA (2 mM, 101,0 %), Triton X-100 (1 %, 103,4 %) e Tween-

80 (1 %, 106,0 %). De acordo com Yoon e Robyt (2005), o triton X-100 liga-se na estrutura terciária da enzima α -amilase, conferindo maior resistência e estabilização.

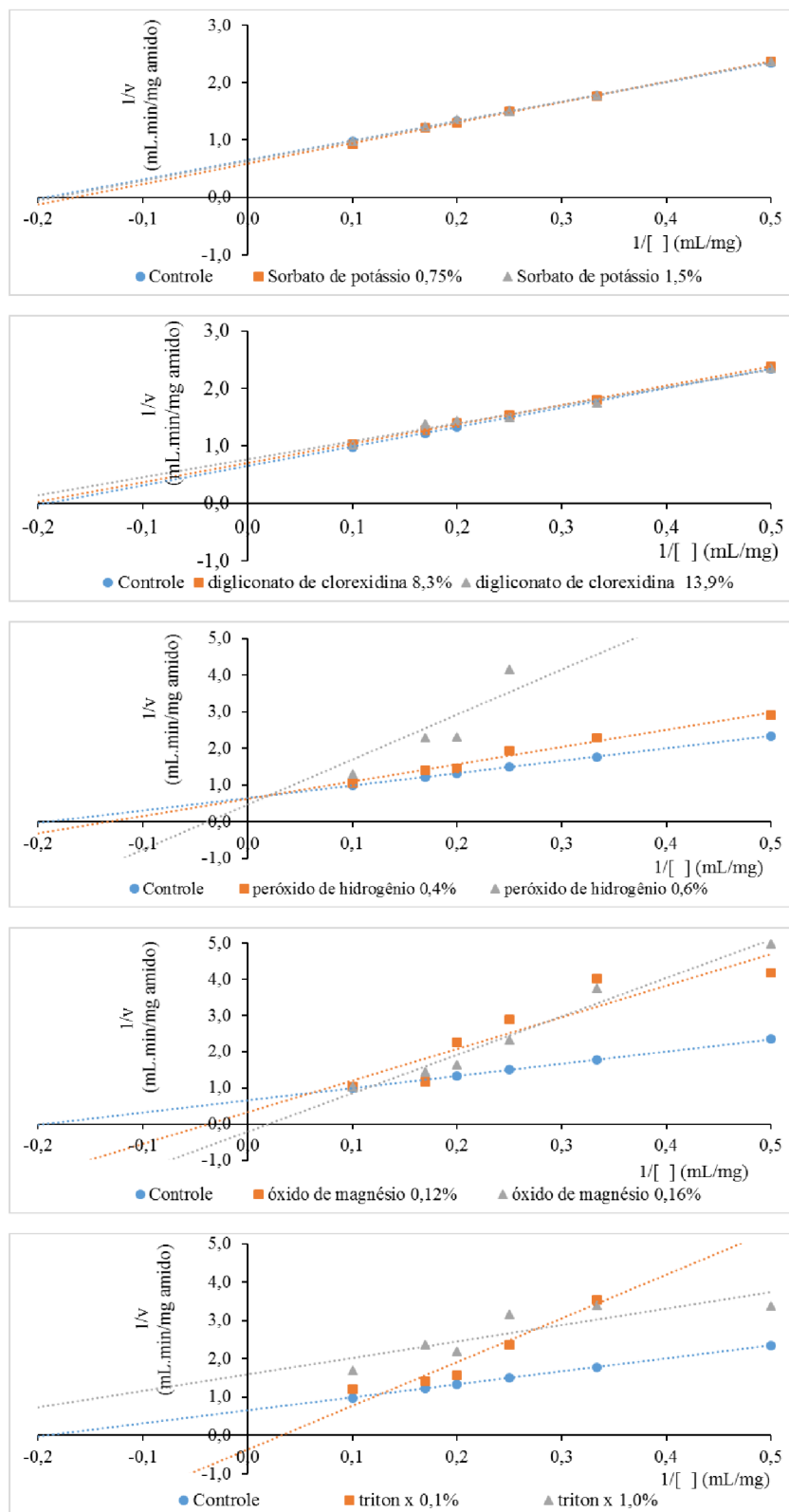
O glicerol, o sorbitol (até 40 %), o persulfato de amônio, EDTA, a ureia (até 12 %) e o mercaptanol (20 %) contribuíram para que a enzima se mantivesse estável em 90 %. A atividade da α -amilase foi moderadamente inibida em Tween 80 (acima de 30 %) e ureia (acima de 30 %). Resultado semelhante foi encontrado por Khajeh, Nemat e Gorgani (2001) ao estudar a enzima α -amilase incubada em diferentes concentrações de ureia (1, 2, 4, 6 e 8 M) à temperatura ambiente e vários intervalos de tempo. Em todos os casos, a perda de atividade enzimática foi maior para a enzima mesofílica em comparação com a termofílica.

Os solventes orgânicos em baixas concentrações não apresentaram nenhum efeito deletério na conformação ativa da enzima, ao invés disso, apresentam características estabilizantes. A α -amilase reteve mais de 80 % de atividade original na presença dos solventes orgânicos, com exceção do álcool isobutil (acima de 20 %), do metanol (20 %) e do éter de petróleo (20 %). Dey e Banerjee (2015) constataram atividade residual acima de 100 % quando a α -amilase de *A. oryzae* foi submetida à presença de metanol (30 e 100 %), etanol (30 e 106,8 %) e álcool isoamílico (30 %, e 104,2 %).

A avaliação do efeito dos estabilizantes mostrou que o aumento da atividade enzimática foi dependente do aumento da concentração dos estabilizantes: sorbato de potássio, digliconato de clorexidina, óxido de magnésio, peróxido de hidrogênio e triton X. A partir de então, os 5 estabilizantes selecionados foram avaliados através do seu efeito inibitório (irreversível ou reversível) e os mecanismos de inibição (competitivo, não competitivo ou incompetitivo).

A Figura 4 mostra o gráfico de duplo-recíproco Lineweaver-Burk que determina o tipo de mecanismo de inibição quando a enzima α -amilase sem estabilizante (controle) é comparada com a enzima adicionada dos estabilizantes em duas concentrações (sorbato de potássio, digliconato de clorexidina, óxido de magnésio, peróxido de hidrogênio e triton X). De acordo com Lehninger (1993) quando a linha (K_m/V_{max}) intercepta pelo eixo “y” obtém-se o valor de $1/V_{max}$, e quando intercepta o eixo “x” obtém-se o valor de $-1/KM$. Assim, é possível encontrar os dados da concentração do substrato (K_m) requerida para que a reação alcance a metade da velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) (Tabela 4).

Figura 4 - Gráficos de Lineweaver-Burk para avaliação da inibição da α -amilase em diferentes estabilizantes



* Para interpretação das referências a cor e figura nesta legenda, os diferentes tratamentos e concentrações: sorbato de potássio ($\circ$:0 %, $\square$: 0,75% e Δ :1,5%), digliconato de clorexidina ($\circ$:0 %, $\square$: 8,3% e Δ :13,9%), peróxido de hidrogênio ($\circ$:0 %, $\square$: 0,4% e Δ :0,6%), óxido de magnésio ($\circ$:0 %, $\square$: 0,12% e Δ :0,16%), triton X ($\circ$:0 %, $\square$: 0,10% e Δ :1,0%)

Tabela 4 - Constantes cinéticas calculadas para a α -amilase em relação aos diferentes estabilizantes e seus mecanismos de inibição

Estabilizantes	V _{máx} (mg amido/mL min)	K _m (mg/mL)	R ²	Mecanismo de inibição
Controle	1,54	5,22	0,9998	
Sorbato (0,75%)	1,50	5,06	0,9991	incompetitivo
Sorbato (1,50%)	1,55	5,16	0,9991	incompetitivo
Clorexidina (8,30%)	1,42	4,75	0,9996	incompetitivo
Clorexidina (13,90%)	1,30	4,06	0,9785	incompetitivo
H ₂ O ₂ (0,40%)	1,60	7,53	0,978	competitivo
H ₂ O ₂ (0,60%)	2,14	26,31	0,7636	competitivo
MgO ₂ (0,12%)	3,12	27,33	0,8343	competitivo
MgO ₂ (0,16%)	4,67	49,50	0,9711	competitivo
Triton X (0,10%)	2,24	29,29	0,9659	competitivo
Triton X (1,00%)	2,69	30,76	0,9714	competitivo

A partir dos gráficos de Lineweaver-Burk (Figura 4) e da Tabela 4, percebe-se aumento de K_m e V_{máx} maior que o controle para os tratamentos da enzima com peróxido de hidrogênio, óxido de magnésio e Triton X, evidenciando efeito inibidor competitivo nos tratamentos.

Desta forma, estes estabilizantes não são recomendados para aplicação na enzima α -amilase, pois irão competir diretamente com o substrato pelo sítio de ligação. Em geral, este tipo de inibição reduz a concentração da enzima livre disponível para ligação com o substrato. Desta forma, a competição entre o inibidor e substrato pela enzima livre tem o efeito de exigir o aumento da concentração do substrato (K_m) para que a reação alcance a metade da sua velocidade máxima (V_{máx}), não sendo vantajoso o uso como estabilizante.

Os tratamentos da enzima com sorbato de potássio e digliconato de clorexidina revelaram efeito inibidor incompetitivo. Isso significa que o estabilizante se liga exclusivamente ao complexo enzima substrato, porém não influencia diretamente no comportamento da enzima frente ao substrato.

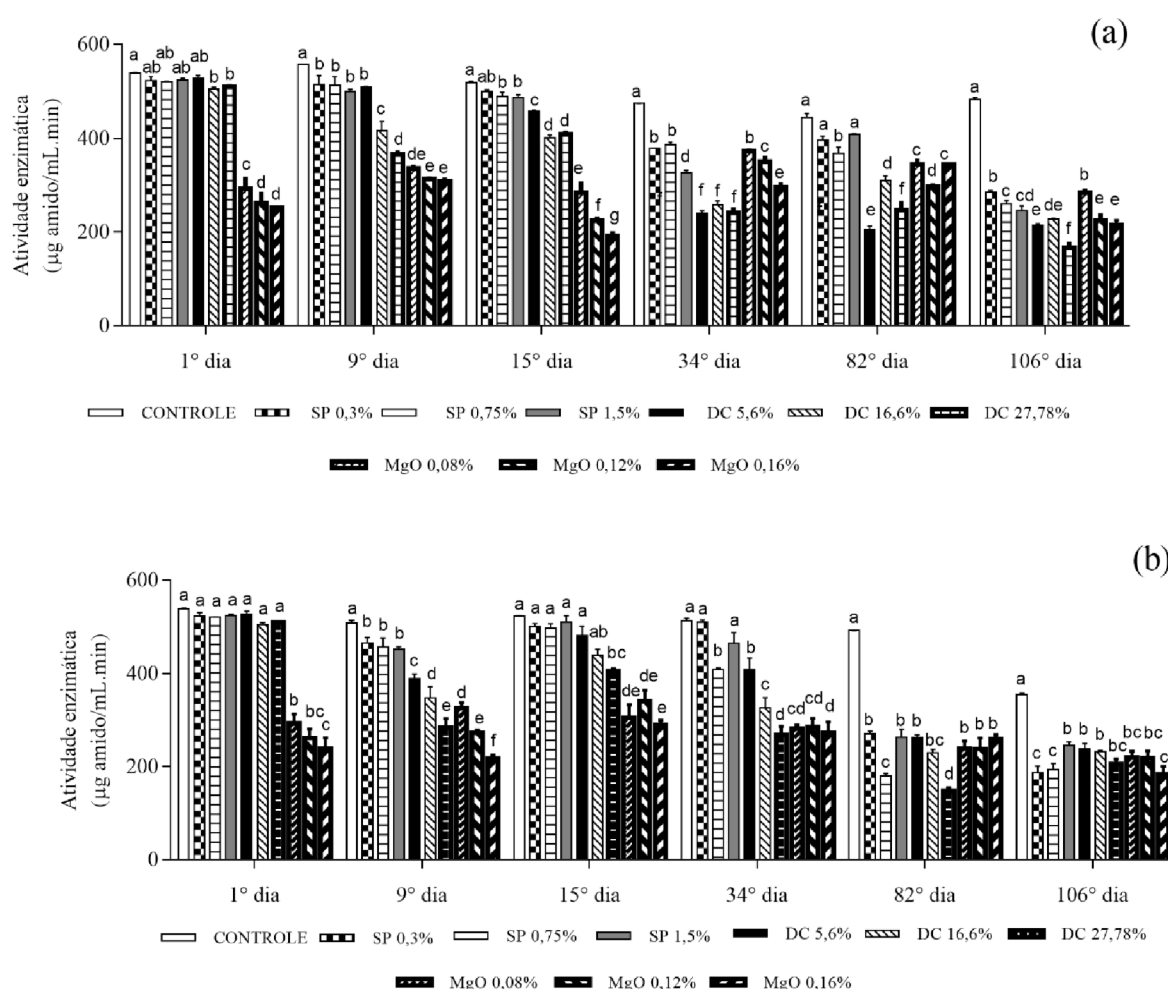
Com a intenção de avaliar a vida útil da enzima em relação aos estabilizantes com caráter incompetitivo, a Figura 5 mostra as atividades enzimáticas sob o efeito dos estabilizantes (sorbato de potássio e digliconato de clorexidina) nas temperaturas de 4 °C e 35 °C. Os resultados foram comparados com o tratamento controle (enzima em pH 8,0).

Durante os 106 dias nas temperaturas 4 e 35°C, o tratamento controle (enzima em pH 8,0) apresentou maior estabilidade do que as enzimas adicionadas de conservantes. Entre os estabilizantes avaliados, o sorbato de potássio mostrou maior estabilidade, se mantendo a

enzima ativa por 82 dias (35 °C). A enzima com sorbato na concentração de 0,3 % se manteve ativa por 82ºdia quando submetida a 35 °C, sendo que em temperatura de refrigeração (4 °C) se manteve ativa em todo período analisado. Segundo Wang (2000), o sorbato de potássio auxilia na conservação da enzima, por período de tempo maior por apresentar ação antimicrobiana (JAY, 2005).

Com relação a enzima com digliconato de clorexidina (DC) maior estabilidade foi por 15 dias nas temperaturas de 4 e 35 °C, reduzindo a atividade após este tempo. De acordo com Río-Carbajo e Vidal-Cortés, (2018) a clorexidina por ser um composto catiônico, é incompatível com derivados aniônicos, que precipitam em pH alcalino. Desta forma, a enzima submetida inicialmente em tampão alcalino (pH 8,0) e com posterior adição do DC, pode ter inibido a ação conservante, pois com o aumento da concentração do DC houve redução da atividade enzimática.

Figura 5 - Estabilidade da α -amilase submetida aos diferentes estabilizantes nas temperaturas de 4 °C (a) e 35 °C (b)



Controle: enzima em tampão TRIS (pH;8,0); SP: enzima com sorbato de potássio; DC: enzima com digliconato de clorexidina; MgO: enzima com óxido de magnésio. Letras minúsculas iguais para o mesmo tempo

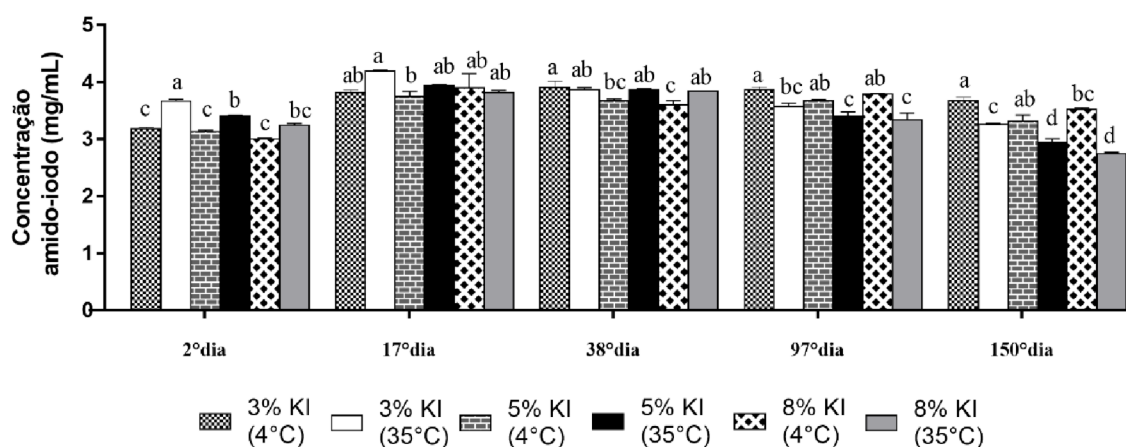
(dia), indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$); (Média $\pm$ desvio padrão).

A partir dos resultados obtidos, foram escolhidas, para a elaboração dos protótipos de ITTe, a solução enzimática com tampão TRIS (pH 8,0) (tratamento controle) que apresentou maior estabilidade nas temperaturas de 4 e 35 °C por 184 dias, e a solução enzimática com sorbato de potássio que apresentou maior estabilidade nas temperaturas de 4 e 35 °C por 82 dias.

4.3 ESTABILIDADE DO COMPLEXO AMIDO-IODO (AI)

A principal razão para a desestabilização do complexo AI é a desnaturação da estrutura helicoidal da amilose, resultando na quebra deste complexo (HATCH, 1982). O efeito do iodeto de potássio (Figura 6), do pH (Figura 7), dos estabilizantes (Figura 8) e das temperaturas (Figura 9) foi avaliada na estabilidade do complexo AI.

Figura 6 - Concentração do amido-iodo em diferentes concentrações de KI



*Letras minúsculas iguais para o mesmo dia, nas temperaturas (4 e 35°C) e nos diferentes tratamentos KI (3; 5; 8%) indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$); (Média $\pm$ desvio-padrão).

No final do 150º dia, ao avaliar a concentração de KI nas diferentes temperaturas, observa-se estatisticamente que as soluções com 3 % KI (3,679 mg/mL a 4 °C e 3,225 mg/mL a 35 °C) apresentaram maior concentração de amido-iodo comparado com os tratamentos 5 % KI (3,319 mg/mL a 4 °C e 2,944 mg/mL a 35 °C) e 8% KI (3,526 mg/mL a 4 °C e 2,756 mg/mL a 35°C). Sendo que, os tratamentos submetidos a temperatura de refrigeração (4°C) apresentaram maior interação AI, consequentemente, maior estabilidade na reação.

Nas três condições testadas houve aumento na concentração de amido-iodo nos 17° e 38° dias. Após, o 97° dia a concentração do AI gradualmente diminuiu devido à decomposição do complexo.

Alguns pesquisadores trouxeram interpretações diferentes em relação a função do KI na reação do complexo AI (CALABRESE; KHAN, 1999; KLIMAVICIUTE et al., 2012; MURDOCH, 1992; THOMA; FRENCH, 1961). A adição de iodeto de potássio (KI) é utilizado junto ao complexo para aumentar a solubilidade dos cristais de iodo na água (CALABRESE; KHAN, 1999) e o aumento da concentração de iodeto, pode influenciar na mudança de absorção para comprimentos de onda mais curtos (IMMEL; LICHTENTHALER, 2000). Ou seja, a formação de cor azul e o comprimento de onda da absorção máxima (650 nm) dependem do comprimento do polímero e das várias espécies de poliiodeto ligadas (RENDLEMAN, 2003).

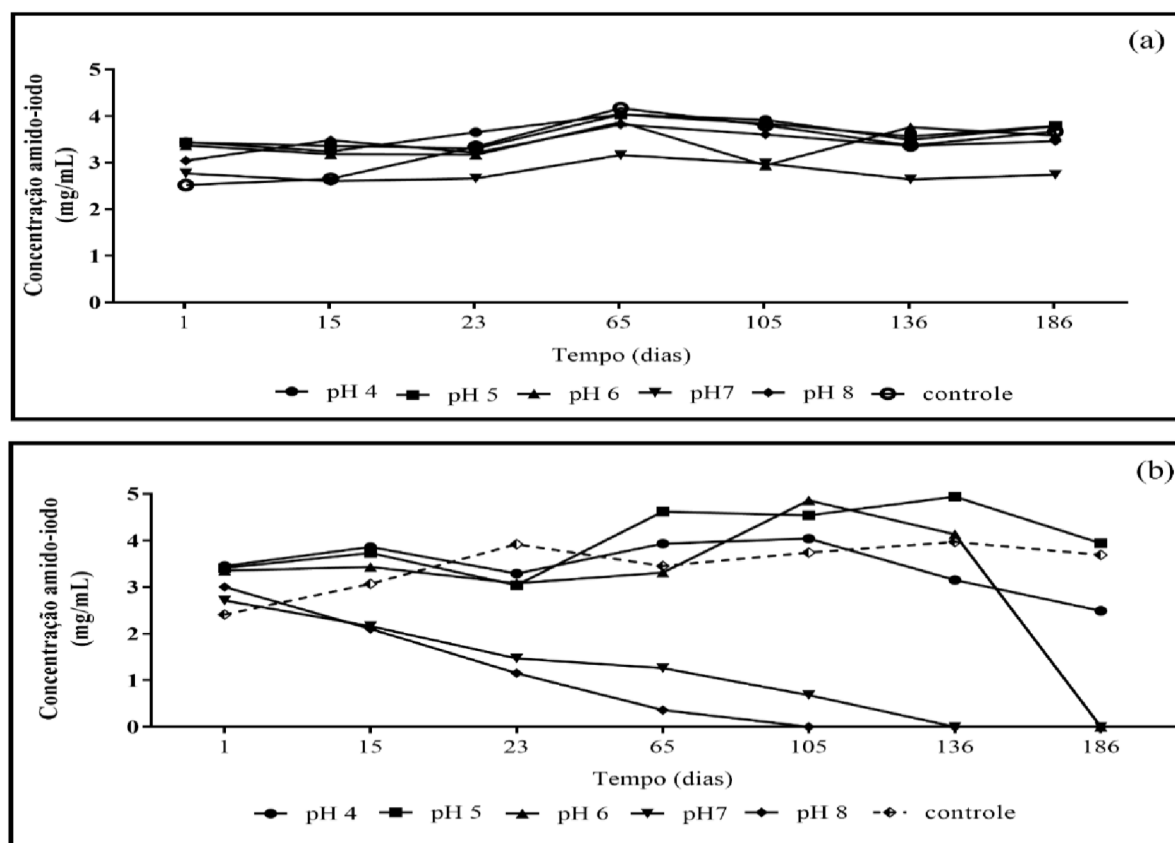
De acordo com a análise calorimétrica da reação AI, Minick, Fotta e Khan (1991) encontraram que para cada hélice de amilose é liberado 110 KJ/mol de I_2 . Sabendo-se que, a energia de dissociação da ligação é de 149 KJ/mol de I_2 , a dissociação do iodo molecular não poderá ocorrer durante a formação do complexo. Sendo assim, os íons não estão envolvidos na formação do complexo, e sim, em uma unidade neutra de poli-iodina, $(I_2)_n$ que deve estar envolvida na formação do complexo.

A partir dos resultados obtidos e baseados nos autores acima citados, acredita-se que o uso de KI auxilia na solubilização do I_2 no complexo AI, porém o aumento da concentração de iodeto não influencia na estabilidade do complexo. Assim, determinou-se o uso da menor concentração de KI (3%) para aplicação nos protótipos de ITTe.

A fim de avaliar o efeito do pH (4,0 a 8,0) sob a estabilidade do complexo AI, a Figura 7 mostra a concentração amido-iodo nas temperaturas 4 e 35 °C.

O complexo AI avaliado na temperatura de 4 °C (Figura 7 a) apresentou maior estabilidade nos diferentes pH testados. A temperatura de 35 °C (Figura 7 b) a estabilidade do complexo ocorreu em meio ácido (pH 4,0 e 5,0) e para o tratamento controle, resultado semelhante foi encontrado por Yang, Kim e Lee (2019). Resultados encontrados por Bendoraitiene et al., (2013) demonstraram que o complexo AI quando submetido a pH ácidos interagem com grupos catiônicos do amido, contribuindo para a estabilidade da solução. Em contrapartida, para o complexo amido-iodo submetido aos pH 6,0; 7,0 e 8,0, houve a redução na concentração de amido-iodo formado, inibindo a reação colorimétrica nos dias 186°, 136° e 105°, respectivamente. E de acordo com Murdoch (1992), o pH neutro e básico, contribuem para acelerar a degradação do complexo amido-iodo.

Figura 7 - Concentração do amido-iodo em diferentes pH a 4 °C (a) e 35 °C (b)

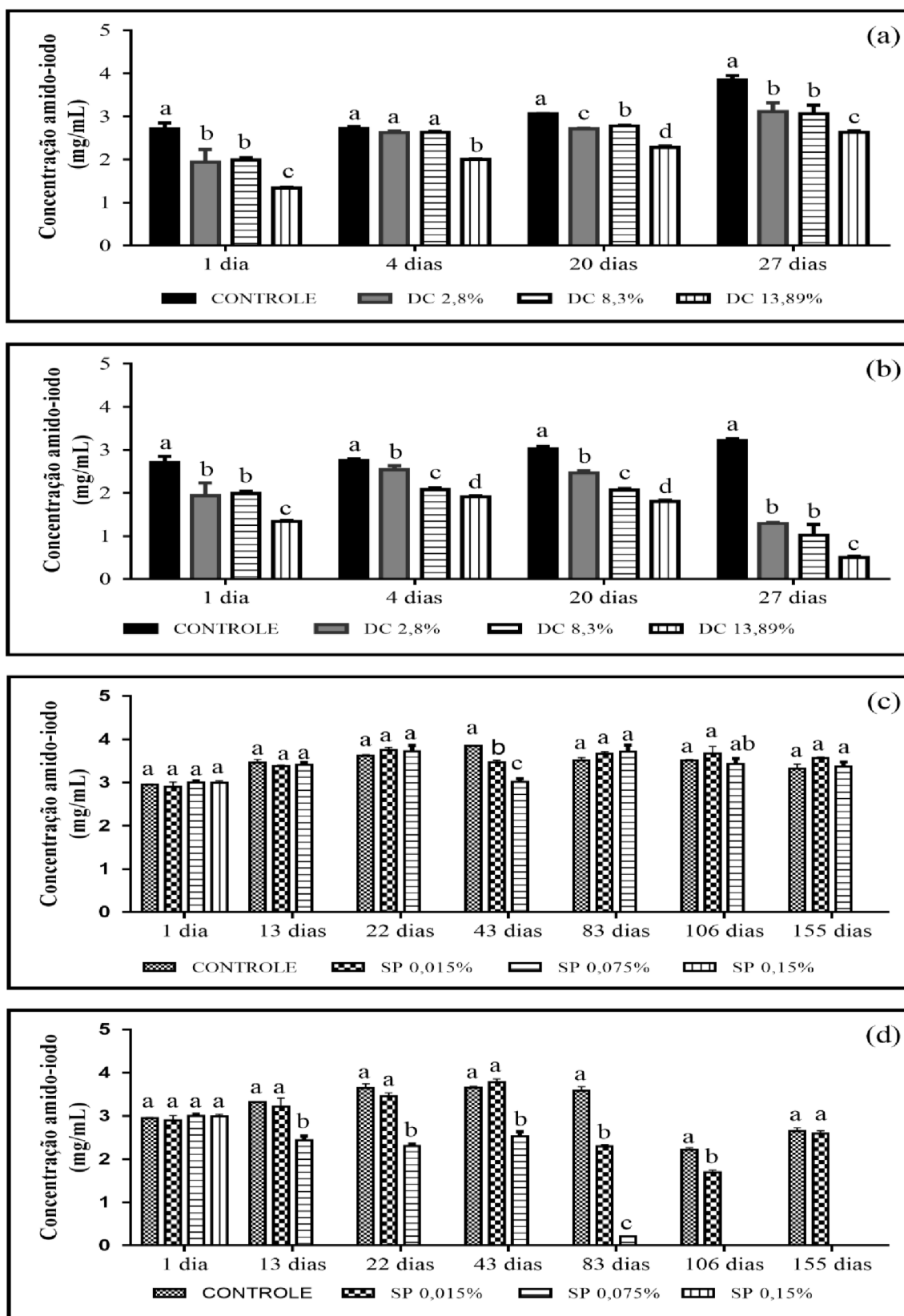


A Figura 8 mostra os resultados da avaliação da estabilidade do amido-iodo, com os estabilizantes sorbato de potássio e digliconato de clorexidina em diferentes concentrações.

Nas três concentrações testadas com digliconato de clorexidina (DC) quando armazenadas a 4 °C houve aumento na estabilidade do complexo AI. Estudos demonstraram que a clorexidina em baixas concentrações é potente agente de membrana ativa contra bactérias. Porém, a clorexidina induz a precipitação em elevadas concentrações (BROOKES et al., 2020; RUSSELL, 1986). Este fato pode ser verificado nas Figuras 8A e 8B, com o aumento da concentração de DC na solução amido-iodo houve redução na formação do complexo.

Houve maior estabilidade do complexo amido-iodo quando foi submetido ao sorbato de potássio em baixas concentrações (0,015 e 0,075 %) em 155 dias a 4 °C. Na temperatura de 35°C, houve a desestabilização do complexo em 83 dias no tratamento SP 0,015 %, 43 dias no tratamento SP 0,075 %, e na concentração SP 0,150 % o complexo de amido-iodo apresentou estabilidade por poucas horas.

Figura 8 - Concentração do amido-iodo formado sob a ação dos estabilizantes digliconato de clorexidina a 4 °C (A) e 35 °C (B) e sorbato de potássio a 4 °C (C) e 35 °C (D)



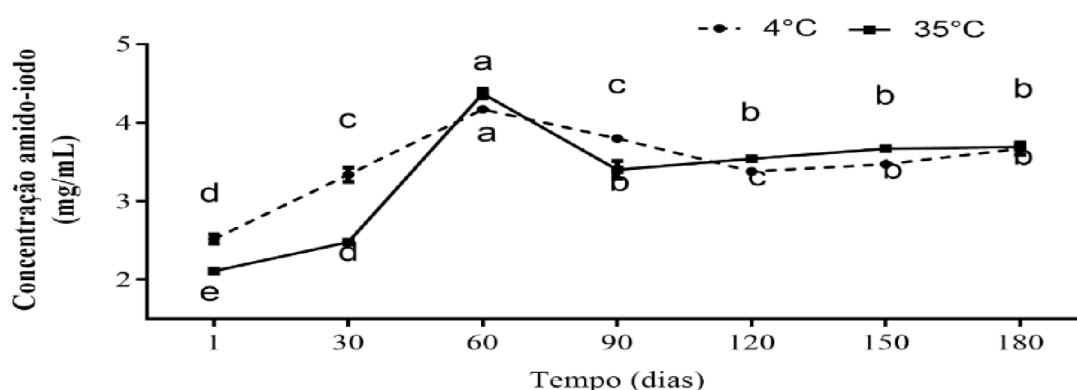
Controle: amido e iodo em solução aquosa; SP: amido-iodo com sorbato de potássio; DC: amido-iodo com digliconato de clorexidina; Letras minúsculas iguais para o mesmo tempo (dia) e temperatura, indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$).

A estabilidade das soluções diminui, com o aumento de eletrólitos externos, presentes como excesso da adição de sais (BILIADERIS; SENEVIRATNE, 1990). Em alguns casos, a estabilização é claramente apenas cinética, uma vez que as soluções acabam se separando (após dias ou semanas). Em altos graus de ligação de estabilizantes e baixos níveis de eletrólito, a situação é menos clara (KARLBERG; PICULELL; HUANG, 2007).

Os resultados para os efeitos do uso de estabilizantes no complexo amido-iodo não foram satisfatórios, mesmo em baixas concentrações. De forma que com o aumento da temperatura (35°C) o complexo amido-iodo é desestabilizado de forma mais rápida.

Assim, foi escolhida a melhor condição 8 % I_2 /amido em 3% KI em solução aquosa para utilização no desenvolvimento do protótipo de ITTe. A estabilidade do complexo AI nas temperaturas de 4 e 35 °C por 6 meses foi avaliada e os resultados podem ser observados na Figura 9.

Figura 9 -Estabilidade do complexo do amido-iodo nas temperaturas de 4 e 35 °C



Letras iguais para mesma temperatura nos 180 dias, indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$); (Média $\pm$ desvio-padrão).

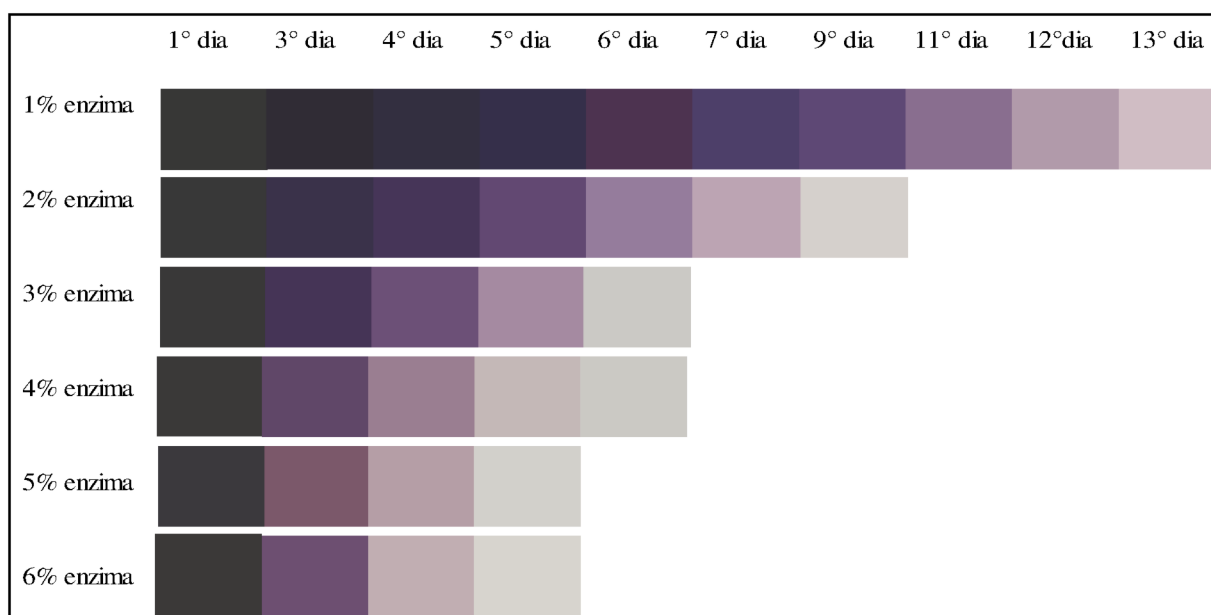
A concentração de amido-iodo teve comportamento similar nas duas temperaturas, que apresentou influência direta na estabilidade do complexo AI nos 180 dias. A partir do 150º dia a concentração de amido-iodo não apresentou diferença significativa, embora tenha aumentado no 60º dia de análise e reduzido no 90º dia. Segundo Calabrese e Khan (1999), a temperatura influencia no aumento da solubilidade de I_2 , porém em tempo prolongado, o que pode corroborar com a desestabilização do complexo, devido a evaporação do iodo ou desnaturação do amido.

A partir destes resultados, foi escolhida para elaboração do ITT enzimático a solução de amido (0,6 %) e a solução de iodo (0,3 % I_2 para 3,0 % KI), sem o uso de estabilizantes.

4.4 DESENVOLVIMENTO DO PROTÓTIPO DO ITT ENZIMÁTICO

A Figura 10 mostra a resposta à variação de cor (ΔE) de seis protótipos de ITT enzimáticos em dois tratamentos: enzima α -amilase nas concentrações de 1 a 6 % sem e com o uso de conservante (sorbato de potássio), solução de amido (0,6 %) e solução de iodo (0,3 % I_2 para 3,0 % KI) durante o armazenamento a 4 °C.

Figura 10 - Resposta à variação de cor (ΔE) apresentada pelos 6 protótipos de ITTe sem conservante (A) e com conservante sorbato de potássio (B) a 4°C



Nos protótipos de ITTe ilustrados na Figura 10, observa-se que a reação da enzima α -amilase com a solução de amido-iodo, proporciona nítida mudança de cor do azul escuro em cores sequenciais, até o incolor. De acordo com Gupta et al., 2003; Whitaker, Voragen e Wong, 2003; a α -amilase catalisa a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 do amido para produzir unidades de maltose e amilo-dextrina (cor violeta), erito-dextrina (cor vermelho) e a acro-dextrina, dextrina-limite e glicose que se apresentam incolores na reação.

À medida que a concentração de enzima aumentou houve aumento das taxas de variação de cor (ΔE) ao longo do tempo. Os pontos finais podem ser detectados por avaliação

visual incolor. Portanto, o ponto final da cor do ITTe foi definido como ΔE de 78. A cor do ITTe atingiu a descoloração mais rápida com a concentração de enzima 6% do que para os ITTes com menores quantidades de enzima, conforme o esperado. As concentrações de enzimas testadas nos protótipos mostraram que o tempo total de resposta foi de 5 a 13 dias (sem estabilizantes) e de 7 a 20 dias (com o uso de estabilizantes).

Outro mecanismo subjacente para a perda de cor é a desestabilização da estrutura helicoidal da amilose. Entretanto, a estabilidade da amilose pode ser aumentada pela adição de sais (HATCH, 1982), como o sorbato de potássio. Através da representação gráfica (Figura 10), pode ser observado que a taxa de variação de cor do ITTe apresentou uma reação mais rápida com a enzima sem o uso do conservante do que para os ITTe com o uso do conservante.

O resultado dos seis protótipos de ITTes desenvolvidos seguiram padrão colorimétrico semelhante, indicando que a enzima α -amilase pode ser aplicada como potencial indicador dependente do tempo-temperatura. Esta ferramenta pode ser usada para decidir qual concentração de enzima no ITT deve ser utilizada para determinado tipo de produto alimentício, através da integração da validade do alimento com o ITT (BRIZIO; PRENTICE, 2015). Para isso, o ponto final do ITT deve coincidir com o fim da vida útil do produto em uma temperatura de referência (TAOUKIS, 2010). Portanto, os ITT enzimáticos desenvolvidos podem ser ajustados para uso em diversos alimentos perecíveis, quando validados através da cinética.

4.5 ANÁLISE DE CUSTO DO ITT

A Tabela 5 apresenta o cálculo do custo do protótipo de ITT.

Tabela 5 - Custo final do produto

Princípio ativo	Custo (R\$/Kg)	Quantidade (g)	R\$/UNI
Enzima	65,91	0,1400*	0,0092*
Tampão TRIS pH 8,0	385,00	0,0440	0,0169
Amido	91,06	0,0120	0,0011
Iodo	1550,00	0,0002	0,0004
Iodeto de potássio	694,00	0,0024	0,0017
Embalagem	Custo (R\$/un)	Quantidade (un)	R\$/UNI
Embalagem plástica	0,014	1,0000	0,0140
CUSTO TOTAL			0,0433

*a quantidade de enzima empregada será variável para cada ITTe desenvolvido, simulando a maior concentração utilizada nos protótipos testados

A relutância dos produtores de alimentos em aceitar os benefícios do ITT são questões de custo, confiabilidade e aplicabilidade (TAOUKIS; LABUZA, 2003). A escolha dos

insumos de baixo custo para conservação da enzima e do amido-iodo na elaboração do protótipo de ITTe foi o objetivo principal deste trabalho, resultando em um custo final de R\$ 0,0433 por unidade. Portanto, a análise de custo-benefício deste protótipo de ITTe favorece a aceitação comercial.

Comprando com os dados de literatura existente, o custo depende do volume, e pode variar de US\$ 0,02 a 0,20 por unidade (R\$ 0,102 a 1,020). (TAOUKIS, 2010).

5 CONCLUSÃO

O protótipo de ITT foi elaborado a partir de uma embalagem composta por dois compartimentos separando a solução enzimática e o substrato indicador (amido-iodo). As condições de maior estabilidade da enzima (pH 8,0; sem conservantes) e da solução de amido-iodo (pH 7,0; sem conservantes) proporcionaram vida útil de 6 meses em temperaturas extremas de estocagem (4 e 35 °C).

Os protótipos de ITTs enzimáticos desenvolvidos apresentam uma embalagem composta por dois compartimentos, que pode ser utilizada em formato de etiqueta adesiva e aplicado individualmente em cada produto. Além disso, os resultados mostram que com a variação da concentração da enzima nos protótipos de ITT, estes oferecem a possibilidade de serem aplicados como indicador de qualidade em produtos refrigerados, através da integração das suas validades (ITT e produto).

Desta forma, o protótipo apresenta uma concepção diferenciada, por ser indicador enzimático líquido de tempo e temperatura, que possibilita o uso de baixas concentrações de solução enzimática (1 a 6,0 %), solução de amido (0,6 %) e iodo (0,3 % I₂ para 3,0 % KI) para alcançar o efeito termodinâmico e colorimétrico. De modo que o ITT apresenta baixo custo, mecanismo de reação simples e estável em temperatura extremas de estocagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIANI, V.; GUPTA, S.; VARIYAR, P. S. A simple time temperature indicator for real time microbial assessment in minimally processed fruits. **Journal of Food Engineering**, v. 311, p. 8, 2021.
- ALBRECHT, A.; IBALD, R.; RAAB, V.; REICHSTEIN, W.; HAARER, D.; KREYENSCHMIDT, J. Implementation of Time Temperature Indicators to Improve Temperature Monitoring and Support Dynamic Shelf Life in Meat Supply Chains. **Journal of Packaging Technology and Research**, v. 4, n. 1, p. 23–32, 2020.
- ASOODEH, A.; EMTENANI, S.; EMTENANI, S.; JALAL, R.; HOUSAINDOKHT, M. R. Molecular cloning and biochemical characterization of a thermoacidophilic, organic-solvent tolerant α -amylase from a Bacillus strain in Escherichia coli. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 114–120, 2014.
- BAYRAMOĞLU, G.; YILMAZ, M.; ARICA, M. Y. Immobilization of a thermostable α -amylase onto reactive membranes: Kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 84, n. 4, p. 591–599, 2004.
- BENDORAITIENE, J.; SARKINAS, A.; DANILOVAS, P. P.; RUTKAITE, R.; KLIMAVICIUTE, R.; ZEMAITAITIS, A. Cationic Starch Iodophores. **Cationic Starch Iodophores**, p. 4346–4354, 2013.
- BILIADERIS, C. G.; SENEVIRATNE, H. D. On the supermolecular structure and metastability of glycerol monostearate-amylose complex. **Carbohydrate Polymers**, v. 13, n. 2, p. 185–206, 1990.
- BRIZIO, A. P. D. R.; PRENTICE, C. Development of an intelligent enzyme indicator for dynamic monitoring of the shelf-life of food products. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 30, p. 208–217, 2015.
- BROOKES, Z. L. S.; BESCOS, R.; BELFIELD, L. A.; ALI, K.; ROBERTS, A. Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. **Journal of Dentistry**, v. 103, p.12, 2020.
- CALABRESE, V. T.; KHAN, A. Amylose-iodine complex formation without KI: Evidence for absence of iodide ions within the complex. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 37, n. 15, p. 2711–2717, 1999.
- CARLSEN, M.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Kinetic studies of acid-inactivation of α -amylase from Aspergillus oryzae. **Chemical Engineering Science**, v. 51, n. 1, p. 37–43, 1996.

CARVALHO, R. V.; CÔRREA, T. L. R.; SILVA, J. C. M.; MANSUR, L. R. C. D. O.; MARTINS, M. L. L. Properties of an amylase from thermophilic bacillus sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 102–107, 2008.

CREIGHTON, T. E. An empirical approach to protein conformation stability and flexibility. **Biopolymers**, v. 22, n. 1, p. 49–58, 1983.

DEY, T. B.; BANERJEE, R. Purification, biochemical characterization and application of α -amylase produced by *Aspergillus oryzae* IFO-30103. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 83-90, 2015.

FELLER, B. E.; KELLIS, J. T.; CASCÃO-PEREIRA, L. G.; ROBERTSON, C. R.; FRANK, C. W. Interfacial biocatalysis on charged and immobilized substrates: The roles of enzyme and substrate surface charge. **Langmuir**, v. 27, n. 1, p. 250–263, 2011.

GAO, T.; SUN, D. W.; TIAN, Y.; ZHU, Z. Gold–silver core-shell nanorods based time-temperature indicator for quality monitoring of pasteurized milk in the cold chain. **Journal of Food Engineering**, v. 306, p. 9, 2021.

GHORBANI, L.; RABBANI, M. Fabrication of a time-temperature indicator by inkjet printing of a spore-based bio-ink. **Bioprinting**, v. 21, p. 27, 2021.

GIANNAKOUROU, M. C.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G. J. E.; TAOUKIS, P. S. Field evaluation of the application of time temperature integrators for monitoring fish quality in the chill chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, n. 3, p. 323–336, 2005.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: A biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599–1616, 2003.

HATCH, G. L. Effect of Temperature on the Starch-Iodine Spectrophotometric Calibration Line. **Analytical Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 2002–2005, 1982.

HE, T.; TIAN, Y. LE; QI, L.; ZHANG, J.; ZHANG, Z. Q. Improved performance of α -amylase immobilized on poly (glycidyl methacrylate-co-ethylenedimethacrylate) beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, p. 492–499, 2014.

ILLANES. **Enzyme biocatalysis: Principles and applications**. 1st. ed. Netherlands: Springer., 2008.

IMMEL, S.; LICHTENTHALER, F. W. The Hydrophobic Topographies of Amylose and its Blue Iodine Complex. **Starch - Stärke**, v. 52, n. 1, p. 1–8, 2000.

JAFRY, A. T.; LIM, H.; SUNG, W.-K.; LEE, J. Flexible time–temperature indicator: a versatile platform for laminated paper-based analytical devices. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 21, n. 3, p. 57, 2017.

JAISWAL, R. K.; MENDIRATTA, S. K.; TALUKDER, S.; SONI, A.; CHAND, S.; SAINI, B. L. Application of lipase based enzymatic time temperature indicator (TTI) as quality marker for frozen chicken meat. **Food Science and Technology Research**, v. 26, n. 1, p. 9–16, 2020.

JAY, M. J. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. São Paulo: [s.n.].

JHUANG, J. R.; LOU, S. N.; LIN, S. BIN; CHEN, S. H.; CHEN, L. C.; CHEN, H. H. Immobilizing laccase on electrospun chitosan fiber to prepare time-temperature indicator for food quality monitoring. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 63, p. 10, 2020.

KARLBERG, M.; PICULELL, L.; HUANG, L. Solubility of amylose / ionic surfactant complexes in dilute aqueous solutions: Dependence on surfactant concentration. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, p. 350–354, 2007.

KHAJEH, K.; NEMAT-GORGANI, M. Comparative studies on a mesophilic and a thermophilic alpha-amylase. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 90, n. 1, p. 47–55, 2001.

KLIMAVICIUTE, R.; BENDORAITIENE, J.; RUTKAITE, R.; SIUGZDAITE, J.; ZEMAITAITIS, A. Preparation, stability and antimicrobial activity of cationic cross-linked starch-iodine complexes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 5, p. 800–807, 2012.

LEE, J. H.; KOO, Y. K.; CHO, H. W.; CHA, H. J.; SHIN, D. U.; OH, T. G.; LEE, S. J. Cysteine-loaded pH-responsive liposome/gold nanoparticles as a time-temperature indicator with instantaneous color change. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 73, p. 8, 2021.

LEE, S. B.; KIM, D. H.; JUNG, S. W.; LEE, S. J. Air-activation of printed time – temperature integrator: A sandwich package case study. **Food Control**, v. 101, p. 89–96, 2019.

LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**. 6. ed. São Paulo: [s.n.], p. 262, 1993.

MATARAGAS, M.; BIKOULI, V. C.; KORRE, M.; STERIOTI, A.; SKANDAMIS, P. N. Development of a microbial Time Temperature Indicator for monitoring the shelf life of meat. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, p. 47, 2018.

MINICK, M.; FOTTA, K.; KHAN, A. Polyiodine units in starch-iodine complex: INDO CI study of spectra and comparison with experiments. **Biopolymers**, v. 31, n. 1, p. 57–63, 1991.

MURDOCH, K. A. The amylose-iodine complex. **Carbohydrate Research**, v. 233, p. 161–174, 1992.

NADAR, S. S.; MULEY, A. B.; LADOLE, M. R.; JOSHI, P. U. Macromolecular cross-linked enzyme aggregates (M-CLEAs) of α -amylase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 84, p. 69–78, 2016.

OH, T. G.; JO, J. A.; LEE, S. J. Evaluation of time–temperature integrator for indicating the ripeness of kiwifruit in plastic container at home. **Journal of Food Science**, v. 86, n. 7, p. 2872–2885, 2021.

PANDIAN, A. T.; CHATURVEDI, S.; CHAKRABORTY, S. Applications of enzymatic time–temperature indicator (TTI) devices in quality monitoring and shelf-life estimation of food products during storage. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 15, n. 2, p. 1523–1540, 2021.

PAVELKOVÁ, A. Time temperature indicators as devices intelligent packaging. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, v. 61, n. 1, p. 245–251, 2013.

RENDLEMAN, J. A. The reaction of starch with iodine vapor. Determination of iodide-ion content of starch-iodine complexes. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, n. 2, p. 191–202, 2003.

ROY, J. K.; RAI, S. K.; MUKHERJEE, A. K. Characterization and application of a detergent-stable alkaline α -amylase from *Bacillus subtilis* strain AS-S01a. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 219–229, 2012.

RUSSELL, A. D. Chlorhexidine : Antibacterial Action and Bacterial Resistance. **Infection**, v. 14, n. 5, p. 212–215, 1986.

SUPPAKUL, P.; KIM, D. Y.; YANG, J. H.; LEE, S. B.; LEE, S. J. Practical design of a diffusion-type time-temperature indicator with intrinsic low temperature dependency. **Journal of Food Engineering**, v. 223, p. 22–31, 2018.

TAOUKIS, P. S. **Commercialization of time-temperature integrators for foods**. Case studies in novel food processing technologies. Woodhead Publishing Limited, p. 351-366, 2010.

TAOUKIS, P. S.; LABUZA, T. P. Time-temperature indicators (TTIs). **Novel food packaging techniques**. Cambridge: Woodhead: [s.n.]. p. 589, 2003.

TAOUKIS, P. S.; LABUZA, T. P. Applicability of Time-Temperature Indicators Monitors of Food Products as Shelf Life. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 4, p. 783–788, 1989.

THOMA, J. A.; FRENCH, D. The starch-iodine-iodide interaction. part II. Potentiometric investigations. **Potentiometric investigation of starch-iodine-iodide interact**, v. 65, p. 1825–1828, 1961.

RÍO-CARBAJO, L; VIDAL-CORTÉS, P; Tipos de antisépticos, presentaciones y normas de uso. **Medicina intensiva**, p.6, 2018.

WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. G. J.; WONG, D. W. S. **Handbook of food enzymology**. New York, p. 1052, 2003.

YAN, S.; HUAWEI, C.; LIMIN, Z.; FAZHENG, R.; LUDA, Z.; HENGTAO, Z. Development and characterization of a new amylase type time-temperature indicator. **Food Control**, v. 19, n. 3, p. 315–319, 2008.

YANG, H. J.; SONG, K. B. Application of Lemongrass Oil-Containing Polylactic Acid Films to the Packaging of Pork Sausages. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 36, n. 3, p. 421–426, 2016.

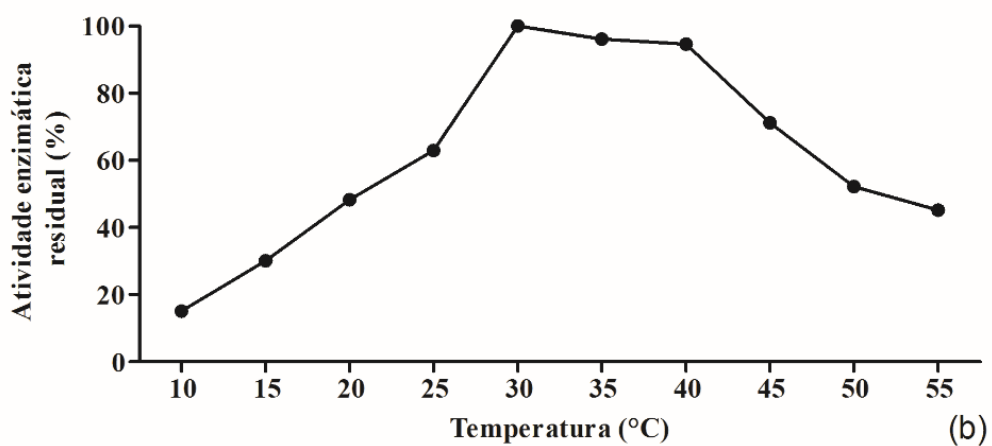
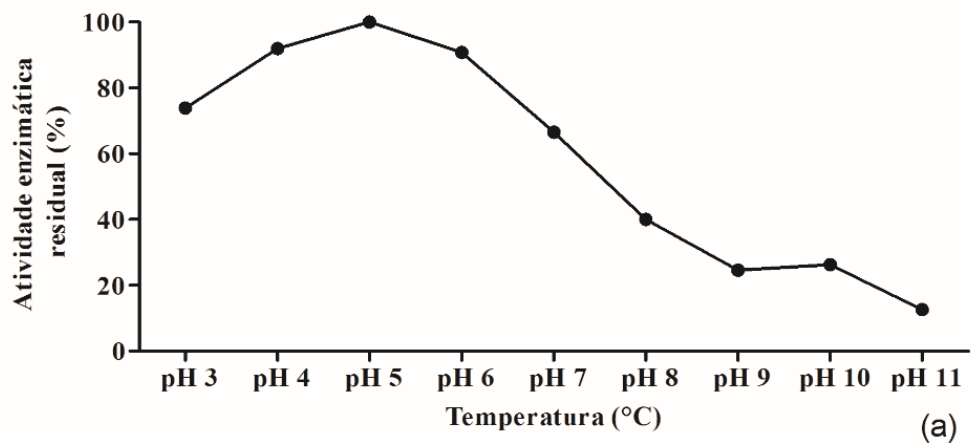
YANG, J. H.; KIM, D. H.; LEE, S. J. Heat-activated time-temperature integrator indicating instant cup noodle doneness. **Journal of Food Engineering**, v. 256, p. 37–45, 2019.

YANG, L.; LEI, M.; ZHAO, M.; YANG, H.; ZHANG, H.; LI, Y.; ZHANG, K.; LEI, Z. Synthesis of the light/pH responsive polymer for immobilization of α -amylase. **Materials Science and Engineering C**, v. 71, p. 75–83, 2017.

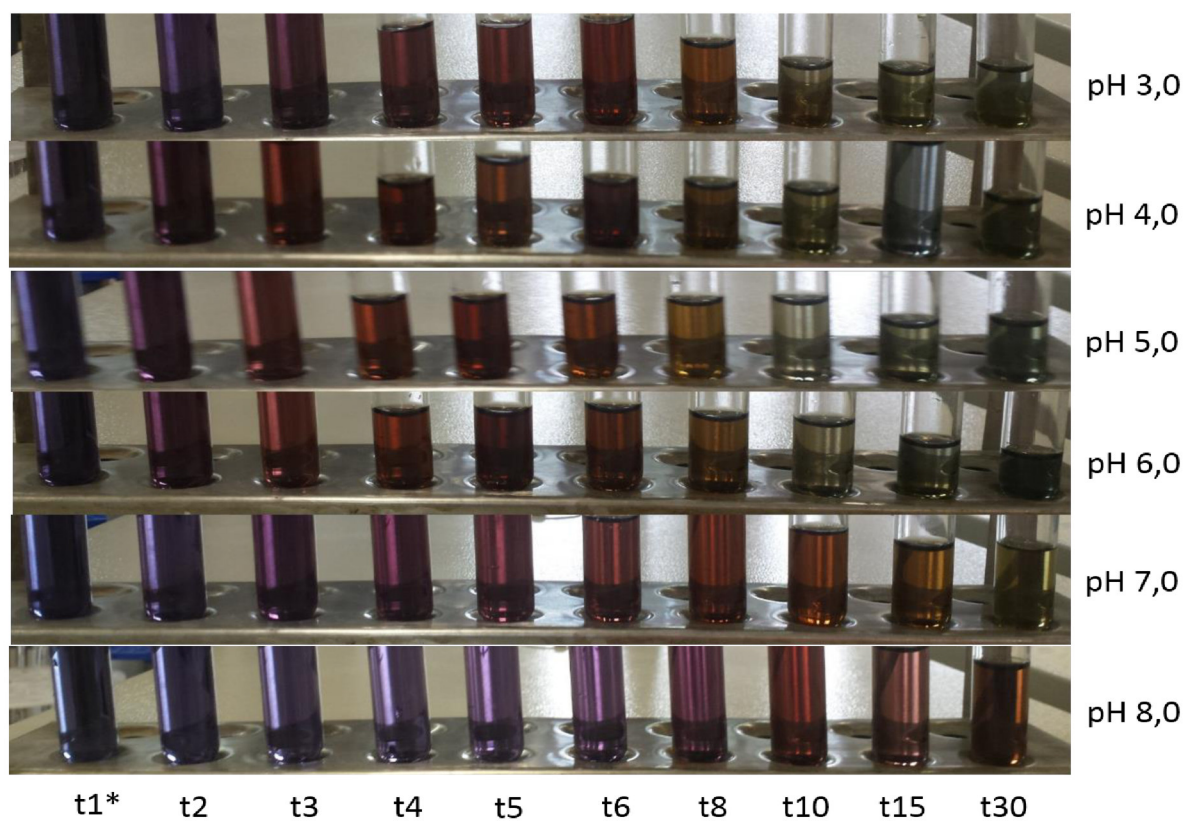
YOON, S. H.; ROBYT, J. F. Activation and stabilization of 10 starch-degrading enzymes by Triton X-100, polyethylene glycols, and polyvinyl alcohols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 5, p. 556–562, 2005.

APÊNDICE 1

Efeito do pH na temperatura de 30 °C (a) e temperatura em pH 5,0 (b) sobre a atividade da enzima α -amilase



APÊNDICE 2



*tempo de hidrólise (t1 a t30) em minutos e temperatura de 20°C

Atividade enzimática (μg amido/ $\text{mL}\cdot\text{min}$) da α -amilase através dos parâmetros de pH, temperatura e tempo.

tempo (min)	T (°C)	5	10	15	30	60	R ²
pH 3	10	364,20 $\pm$ 6,88 ^b	295,00 $\pm$ 8,72 _b	212,67 $\pm$ 7,37 _a	114,70 $\pm$ 3,4 _{6^a}	55,17 $\pm$ 2,0 _{2^a}	0,90 6
	20	610,61 $\pm$ 11,2 _{6^b}	353,97 $\pm$ 17,6 _{8^{ab}}	250,68 $\pm$ 10,0 _{7^a}	124,53 $\pm$ 3,5 _{0^a}	62,64 $\pm$ 1,5 _{2^a}	0,82 6
	30	690,24 $\pm$ 7,01 ^a	348,04 $\pm$ 10,1 _{6^{bc}}	254,35 $\pm$ 5,51 _a	126,81 $\pm$ 5,5 _{3^a}	65,07 $\pm$ 3,0 _{0^a}	0,78 7
pH 4	10	461,57 $\pm$ 10,0 _{5^a}	334,80 $\pm$ 10,5 _{1^a}	206,73 $\pm$ 12,0 _{7^a}	108,03 $\pm$ 7,0 _{0^a}	56,17 $\pm$ 3,0 _{1^a}	0,85 8
	20	682,23 $\pm$ 9,58 ^a	378,55 $\pm$ 39,8 _{2^a}	150,58 $\pm$ 15,0 _{3^{bc}}	125,69 $\pm$ 5,0 _{3^a}	62,49 $\pm$ 1,5 _{0^a}	0,73 3
	30	700,09 $\pm$ 414,54 ^a	358,7 $\pm$ 9,51 ^b	231,02 $\pm$ 4,00 _b	112,96 $\pm$ 5,0 _{0^b}	56,13 $\pm$ 2,0 _{1^b}	0,77 8
pH 5	10	330,23 $\pm$ 8,59 ^c	234,90 $\pm$ 8,65 _{cd}	178,23 $\pm$ 7,01 _b	87,40 $\pm$ 3,50 _b	43,57 $\pm$ 2,5 _{0^b}	0,89 1
	20	502,67 $\pm$ 12,5 _{0^c}	253,42 $\pm$ 12,0 _{2^{cd}}	162,14 $\pm$ 15,4 _{5^b}	81,38 $\pm$ 3,07 _c	41,18 $\pm$ 2,0 _{2^c}	0,77 5
	30	701,92 $\pm$ 18,9 _{5^a}	408,22 $\pm$ 7,52 _a	252,68 $\pm$ 5,51 _a	124,09 $\pm$ 3,0 _{0^a}	65,13 $\pm$ 2,0 _{1^a}	0,79 6
pH 6	10	360,06 $\pm$ 5,00 ^b	244,19 $\pm$ 4,01 _{cd}	182,99 $\pm$ 4,58 _b	91,23 $\pm$ 4,02 _b	43,22 $\pm$ 2,0 _{4^b}	0,88 0
	20	455,63 $\pm$ 10,0 _{6^d}	203,13 $\pm$ 18,0 _{0^d}	126,32 $\pm$ 7,36 _c	61,78 $\pm$ 1,15 _d	32,41 $\pm$ 1,5 _{1^d}	0,73 9
	30	671,57 $\pm$ 11,0 _{3^{ab}}	389,34 $\pm$ 5,86 _a	255,25 $\pm$ 5,02 _a	128,41 $\pm$ 5,1 _{0^a}	64,08 $\pm$ 2,0 _{1^a}	0,81 2
pH 7	10	314,22 $\pm$ 10,0 _{1^c}	218,22 $\pm$ 10,0 _{1^d}	195,31 $\pm$ 5,03 _a	105,18 $\pm$ 5,0 _{1^a}	53,23 $\pm$ 2,0 _{4^a}	0,91 2
	20	323,25 $\pm$ 10,2 _{7^e}	306,97 $\pm$ 11,5 _{3^{bc}}	231,17 $\pm$ 15,1 _{3^a}	108,98 $\pm$ 6,2 _{3^b}	56,00 $\pm$ 2,0 _{0^b}	0,93 2
	30	642,34 $\pm$ 11,5 _{0^{bc}}	342,39 $\pm$ 9,06 _{bc}	243,04 $\pm$ 4,00 _{ab}	130,08 $\pm$ 2,0 _{1^a}	67,24 $\pm$ 4,0 _{2^a}	0,79 6
pH 8	10	92,13 $\pm$ 3,01 ^d	99,14 $\pm$ 3,01 ^e	30,53 $\pm$ 1,00 ^c	18,15 $\pm$ 1,88 _c	12,53 $\pm$ 1,0 _{6^c}	0,76 9
	20	125,79 $\pm$ 5,52 ^f	136,40 $\pm$ 13,8 _{9^e}	40,51 $\pm$ 2,80 ^d	27,04 $\pm$ 2,00 _e	27,47 $\pm$ 6,67 _e	0,72 7
	30	634,13 $\pm$ 12,8 _{1^c}	335,12 $\pm$ 7,87 _c	62,18 $\pm$ 2,02 ^c	33,42 $\pm$ 0,95 _c	22,61 $\pm$ 0,2 _{1^c}	0,68 7

*Letras minúsculas iguais para a mesmo tempo e pH, indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$); (Média $\pm$ desvio-padrão).

**ARTIGO II – VALIDAÇÃO DE ITT ENZIMÁTICO NO GERENCIAMENTO
DA CADEIA DE RESFRIAMENTO DO PESCADO ESPADARTE (*XIPHIAS
GLADIUS*)**

ARTIGO II – VALIDAÇÃO DE ITT ENZIMÁTICO NO GERENCIAMENTO DA CADEIA DE RESFRIAMENTO DO PESCADO ESPADARTE (*XIPHIAS GLADIUS*)

RESUMO

Os protótipos de ITTs enzimáticos compartimentalizados, que apresentam como princípio ativo a reação enzimática entre a enzima α -amilase e o complexo amido-iodo, foram validados na cadeia de resfriamento do pescado Espadarte. As reações enzimáticas foram mais rápidas nos protótipos sem o uso de conservantes e na avaliação da vida útil do pescado o abate em instalações terrestres resultou em um menor prazo de validade em contagem microbiológica quando comparados com os abatidos a bordo de navio. Sugerindo que este é o método mais eficaz e sustentável. Os microrganismos específicos de deterioração predominantes do pescado espadarte foram as bactérias psicotróficas e as *Pseudomonas*. Os indicadores N-BVT, pH e cor não obtiveram relação direta com o fim da vida útil do pescado refrigerado. O protótipo de ITT com 4% de enzima e uso de conservante comprovou o tempo de vida útil (8 dias) semelhante ao previsto na análise de *Pseudomonas*, sendo este o melhor indicador de qualidade para monitorar o frescor do pescado espadarte armazenado com gelo a 4°C. O esquema MIQ proposto possibilitou a confirmação do fim da vida útil no oitavo dia de armazenamento, sendo que os parâmetros que determinaram o ponto de rejeição foram a consistência e a cor do abdômen (interno).

Palavras-chaves: Controle de qualidade. ITT enzimático. Pescado espadarte. Método MIQ.

1 INTRODUÇÃO

O peixe espadarte, *Xiphias gladius*, também conhecido como Meca, é um importante recurso pesqueiro encontrado em vários ambientes marinhos (Atlântico, Pacífico e Índico) (KINAS, 2013b). De acordo com o ICCAT (2019), o Brasil é o segundo país com maior volume de captura desta espécie (28.427 ton). O volume do Meca refrigerado para exportação em 2019 foi de 1.236 ton, gerando uma receita anual de US\$ 6.500.671,00.

O pescado espadarte exportação é vendido como fresco refrigerado (ICCAT, 2019). No caso do pescado fresco vendido como um produto inteiro, há um processamento industrial mínimo baseado em evisceração, lavagem e armazenamento a frio, utilizando-se gelo (BOZIARIS, 2014). Torna-se evidente que o monitoramento e controle de temperatura dentro da cadeia de frio é um pré-requisito para determinar o tempo de vida útil deste pescado (TSIRONI; TAOUKIS, 2018). Uma opção empregada atualmente na indústria para o controle da temperatura é o uso de equipamentos portáteis e sensores sem fio. No entanto, estes equipamentos são de uso limitado, devido ao pouco tempo de funcionamento, há alterações na

transmissão de dados em produtos de alta umidade e também apresenta um alto custo (SPAGNOL et al., 2018).

Para atender estas necessidades, estão sendo estudadas soluções de embalagem inteligente, como os indicadores de tempo-temperatura (ITT) (GAO et al., 2021; TAOUKIS; TSIRONI, 2018; TSIRONI; TAOUKIS, 2018). Os ITTs são ferramentas de registro de qualidade de alimentos que refletem o histórico de temperatura total ou parcial, expressando resposta visível sob a forma de mudança colorimétrica (GIANNOGLOU et al., 2014; TAOUKIS; LABUZA, 1989; TSIRONI et al., 2017). O período de tempo entre a ativação e o término dos ITTs é normalmente por alterações de cor, que correspondem o tempo da vida útil dos alimentos (KIM; SHIN; LEE, 2016).

Um número crescente de protótipos de ITT tem sido elaborado e validado, com o intuito de avaliar o potencial das etiquetas para monitoramento de qualidade aplicadas em produtos de pescado, como: salmão refrigerado (AHVENAINEN, 2003), peixe boga (*Boops Boops*) (TAOUKIS; KOUTSOUMANIS, 1999), peixe dourada (GIANNAKOUROU et al., 2005), frutos do mar frescos (MENDOZA et al., 2004), peixe leite (*Chanos chanos*) (KUSWANDI et al., 2012a), filés de tubarão azul (GIANNOGLOU et al., 2014), peixe cobia (BRIZIO; PRENTICE, 2014), filés de garoupa embalada a vácuo (HSIAO; HUANG, 2016), bacalhau fresco (GARCÍA et al., 2017), ostra (TSIRONI et al., 2017) e turbot sashimi (LIU et al., 2017), contudo, não existem estudos para o peixe espadarte.

O requisito básico para eficiência de um ITT é apresentar reação clara, contínua e irreversível às mudanças de temperatura (TSIRONI et al., 2008). Além disso, são necessários estudos cinéticos da resposta do ITT; com base em modelos confiáveis do tempo de vida útil do pescado (KOUTSOUMANIS; TAOUKIS; DROSINOS, 2000).

Para determinar o tempo de vida útil do pescado refrigerado são aplicados procedimentos sensoriais previamente validados por métodos físicos, químicos e microbiológicos (BRASIL, 2020; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2020). O método de índice de qualidade (MIQ) é um dos procedimentos mais comuns utilizados para avaliar o frescor durante o armazenamento de pescados *in natura* (NOLLET; TOLDRÁ, 2009) e têm mostrado resultados satisfatórios na indústria pesqueira (BONILAURI et al., 2019; CAMPUS et al., 2011; ESTEVES; ANÍBAL, 2021; FREITAS; DO AMARAL, 2011; GHANI KUVEI; KHODANAZARY; ZAMANI, 2019; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2020). No entanto, não se encontra na literatura científica estudo específico para peixe espadarte (*Xiphias gladius*) (FREITAS; VAZ-PIRES; CÂMARA, 2021; SANT'ANA; SOARES; VAZ-PIRES, 2011).

A primeira etapa deste estudo, teve o objetivo desenvolver um protótipo de ITT enzimático compartimentalizado, estabelecendo um modelo matemático para aplicar em pescado. A segunda etapa, foi realizar o estudo cinético da vida útil do pescado espadarte refrigerado através de análises físico-química e microbiológica. E na terceira etapa foi realizado o estudo da vida útil do pescado através de análise sensorial, utilizando método MIQ para selecionar o ITT apropriado que monitore e gerencie distribuição do pescado Espadarte refrigerado na cadeia do frio.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

O material utilizado neste estudo inclui enzima α -amilase Fungamyl 800 L (EC 3.2.1.1) produzida a partir de *Aspergillus oryzae*, pela Novozymes S/A (Bagsvaerd, Dinamarca), cuja atividade enzimática é de 800 UAF/g³ (Unidade de amilase fúngica), pH ótimo de 5,0, temperatura ótima de 30 a 40°C. Também foi utilizado amido de batata, e os reagentes iodo (I₂) e iodeto de potássio (KI) que foram adquiridos da empresa Labynt Produtos para Laboratório LTDA (São Paulo, Brasil). Os demais produtos químicos utilizados foram de grau analítico.

2.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO PROTÓTIPO DE ITT ENZIMÁTICO

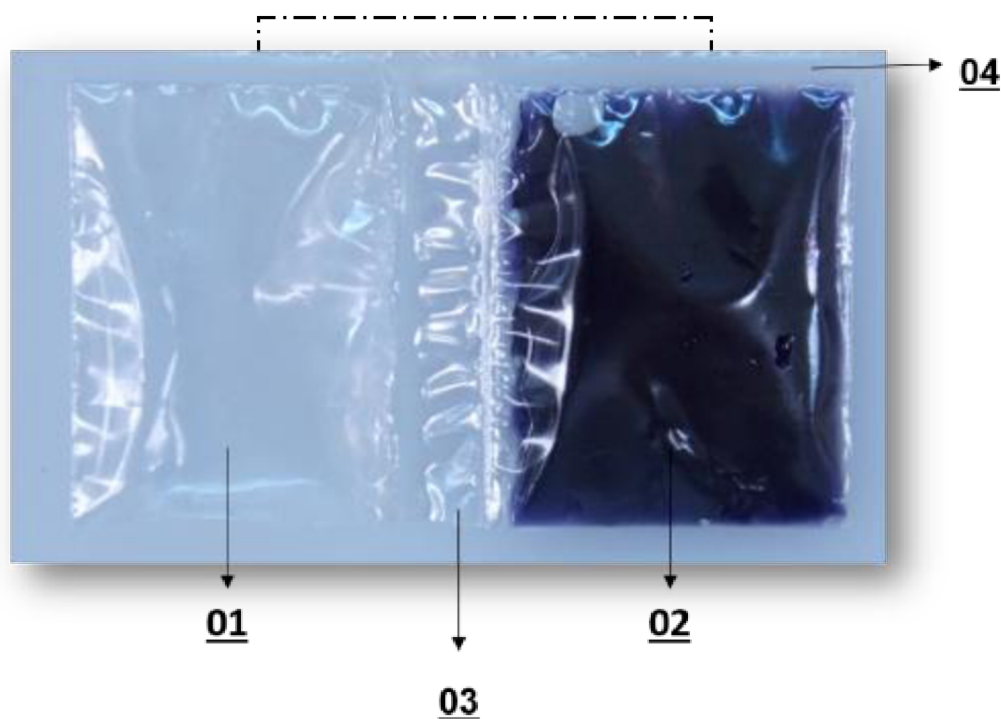
O desenvolvimento do protótipo de ITT enzimático foi baseado no método empregado por Brizio & Prentice (2015), com adaptação. O conceito do novo protótipo indicador de tempo e temperatura foi elaborar um indicador compartimentalizado separando a solução de amido-iodo da solução enzimática, possibilitando ativação do indicador no momento do uso.

Para a preparação dos protótipos de ITT foi adicionado a enzima α -amilase em diferentes concentrações e a solução de amido-iodo (0,6%), produzindo seis diferentes protótipos de ITT. A solução enzimática líquida foi realizada nas concentrações de 1; 2; 3; 4; 5 e 6% (v/v) de enzima diluída em tampão TRIS (pH 8,0) e para os tratamentos com conservante foi adicionado 3% (m/v) de sorbato de potássio. A solução de amido solúvel foi previamente gelatinizada 0,6% (m/v) em solução aquosa nas condições de 80°C por 5 min e, após

arrefecimento, foi misturada à solução de I_2 na proporção de 1:12,5 $V_{\text{iodo}}/V_{\text{amido}}$, tornando a mistura azul intensa.

Para a elaboração do protótipo foi adquirido no comércio local sacos plásticos polietileno (4 x 6 cm). O protótipo de ITT enzimático líquido compartimentalizado (Figura 1), onde: enzima amilase (1), solução de amido-iodo (2), selagem interna (3) e selagem externa (4). Inicialmente, o protótipo de ITT foi selado no meio com o auxílio de uma seladora (Modelo 200 S, SELOVAC Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil) por 8 s, dividindo o saco em dois compartimentos, apresentando uma selagem interna de fácil ruptura. Cada solução foi homogeneizada e envasada com 2 mL da solução amido-iodo e 2 mL de solução enzimática em cada compartimento e posteriormente selada com o mesmo equipamento por 15 s.

Figura 1 - Protótipo de ITT enzimático líquido compartimentalizado; (1) enzima amilase, (2) solução de amido-iodo, (3) selagem interna e (4) selagem externa



O ITT utiliza como princípio ativo a reação enzimática entre a enzima amilase e o complexo amido-iodo, caracterizado por se apresentar como embalagem compartimentalizada, e que poderia ser produzido em formato de etiqueta adesiva, a ser colocado individualmente em cada produto.

A Figura 2 representa esquematicamente a sequência experimental que foi utilizada após o desenvolvimento do protótipo de ITT compartimentalizado.

Figura 2 - Desenvolvimento experimental para validação do protótipo ITT enzimático

VALIDAÇÃO DO PROTÓTIPO ITT

MUDANÇA COLORIMÉTRICA ITT	INDICADOR DE QUALIDADE PESCADO	
Estudo cinético (Arrhenius) 1; 2; 3; 4; 5; 6% de amilase 4, 10, 15, 25, 35°C	Análise físico-química e microbiológica 4, 10, 15°C	Análise sensorial (método MIQ) 4°C
RESPOSTA DO PROTÓTIPO DE ITT	RESPOSTA PRODUTO	
Ea ITT Tempo de vida útil ITT	Ea produto	Tempo de vida útil produto

*Ea: energia de ativação

Para avaliação cinética do ITT diferentes concentrações de enzima foram investigadas, com o objetivo de analisar a influência da quantidade de enzima sobre sua descoloração quando armazenados em diferentes temperaturas (4, 10, 15, 25, 35°C). Para a avaliação cinética do produto, foi realizado o estudo do tempo de vida útil do pescado refrigerado sob parâmetros de qualidade (físico-químico e microbiológico) em diferentes temperaturas (4, 10 e 15°C). Também, foi avaliado o tempo de vida útil através da análise sensorial (método MIQ). A validação do protótipo foi obtida quando a energia de ativação do produto for semelhante à energia de ativação do protótipo de ITT (TAOUKIS; KOUTSOUMANIS; NYCHAS, 1999). Assim como, o tempo de vida útil encontrado do protótipo de ITT apresentar o mesmo tempo de vida útil do pescado quando avaliado através da análise sensorial.

O protótipo de ITT após rompimento da compartimentalização foi ativado e armazenado em uma incubadora de alta precisão (Marconi, MA 415/S, São Paulo, Brasil), diariamente a descoloração dos diferentes protótipos de ITT (1; 2; 3; 4; 5; 6% de amilase) com e sem conservantes, armazenados nas temperaturas de 4 (situação ideal), 10, 15, 25, 35 (situações de abuso) $\pm$ 0,5 °C. A coloração foi avaliada através de observação visual e quantificada com uso de colorímetro (Modelo Chroma Meter CR-400/410, Konica Minolta, Osaka, Japão). Os dados colorimétricos foram do sistema *CIELab* – *Comission Internationale de L'Eclairage* (iluminante D65), obtendo as dimensões L*, a*, b*, onde L* indica a luminosidade, a* mede a variação entre a cor vermelha e verde, e o valor de b* quantifica a

intensidade da cor amarela a azul. A partir destes parâmetros foi calculada a diferença de cor (ΔE^*) através da Equação 1.

$$\Delta E = \sqrt[2]{\Delta L^2 * \Delta a^2 * \Delta b^2} \quad (1)$$

Onde: $\Delta L^* = L - L \text{ tempo zero}$; $\Delta a^* = a - a \text{ tempo zero}$; $\Delta b^* = b - b \text{ tempo zero}$.

As análises foram interrompidas quando nenhuma mudança de cor azul adicional poderia ser medida no protótipo de ITT. O fim da vida-útil dos protótipos foi definido como o tempo que leva a sua cor azul escura para chegar a uma condição incolor ($\Delta E^* = 58,0$). As características da resposta do ITT enzimático foram analisadas com base na equação de Arrhenius. De acordo com o método de Taoukis e Labuza (1989), as variáveis de resposta de cor dos ITT foram modeladas através da cinética de ordem zero conforme a Equação 2. Onde $f(x)$ representa a mudança de cor (ΔE), K é a constante cinética de velocidade da reação, e t expressa o tempo de armazenamento (h). A dependência da temperatura da taxa de resposta do ITT foi modelada com a equação de Arrhenius. A Equação 3 determina o valor de Energia de ativação (E_a) através da correlação entre $\ln K$ versus $1/T$, sob diferentes temperaturas de armazenamento, 4, 10, 15, 25, 35°C.

$$f(x) = K \cdot t \quad (2)$$

Onde: T é a temperatura absoluta (K), E_a é a energia de ativação ($\text{kJ mol}^{-1} \cdot \text{K}$), R é a constante universal de gás ($0,0083 \text{ kJ mol}^{-1} \cdot \text{K}$), e A é fator pré-exponencial (TAOUKIS ; LABUZA, 1989).

$$\ln K = \frac{E_a}{R \cdot T} + \ln A \quad (3)$$

2.3 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE PESCADO ESPARTE E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Espécimes de peixe espadarte (*Xiphias gladius*) foram pescados nos períodos de setembro de 2019, fevereiro e dezembro de 2020, e janeiro e março de 2021 no sul do Oceano Atlântico (localização da pesca: latitude 33°49'; 34°15'; 34°30' e longitude 50°45'; 50°55'; 51°06'), por uma indústria pesqueira localizada na cidade do Rio Grande, RS, Brasil. O procedimento

utilizado após a captura foi o abate por desnuca, evisceração e higienização com auxílio de faca. Posteriormente, o pescado foi embalado em sacos de polietileno com macrofuros com operação de gotejamento durante 12 - 15 h sob condições de refrigeração (0 °C). Após este período, os pescados foram armazenados sob manta de gelo (20 cm), e empilhados em 6 camadas. Ao chegar à indústria pesqueira foi realizada lavagem com água potável e um refile final. Após, o pescado foi classificado pelo grau de qualidade determinado por análise sensorial visual por especialista treinado. O pescado espadarte padrão foi embalado em caixas isotérmicas e após a pesagem média final (150 kg/caixa), sacos de gelo foram colocados por cima e dentro do abdômen do pescado (Figura 3). As caixas foram lacradas e armazenadas a temperatura de 4 °C.

Para manter as mesmas condições do produto final, as amostras foram coletadas na empresa nos dias das análises. Portanto, o pescado foi mantido em câmara fria a 4 °C em caixa isotérmica com gelo embalado, sendo então filetadas nas porções de aproximadamente 150 ± 20 g, obtidos da região dorsal média dos pescados e embalados com selagem simples e encaminhados em caixas isotérmicas ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA-FURG) para as avaliações de qualidade.

Figura 3 - Embalagem exportação do pescado



2.4 ESTUDO CINÉTICO DA QUALIDADE DO PESCADO ESPARTE

A identificação dos organismos específicos de deterioração do pescado espadarte foi determinada pelo estudo do crescimento de diferentes micro-organismos realizados em dois momentos diferentes de evisceração: pescado eviscerado no barco e pescado eviscerado na indústria. Pescados com peso de 23,00 kg (eviscerado no barco) e 19,50 kg (eviscerado na fábrica). Parte destes foram analisados no dia do descarregamento na planta fabril (tempo zero) e, o restante das amostras foram armazenadas sob condições de temperatura de 4, 10 e 15 °C onde foram avaliados nos tempos 1, 3, 5 e 7 dias. As análises de contagem total de micro-organismos aeróbios psicrotróficos, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas*, conforme metodologia oficial do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2003) e American Public Health Association (APHA, 2001).

O estudo cinético para avaliar a qualidade do pescado foi realizado a partir do método de Taoukis; Labuza (1989). As variáveis de resposta para a qualidade do pescado foram os dois micro-organismos predominantes supracitados e as análises físico-químicas de NBV-T, pH e cor. Estes indicadores de qualidade determinados para o pescado foram modelados conforme as Equações 2 e 3, sob diferentes temperaturas de armazenamento (4, 10 e 15°C) durante o 1, 3, 5, 7 e 9º dia de vida útil. Para esta avaliação, foi reservado dois pescados, com peso de 37,50 e 42,00 kg.

A análise de nitrogênio de bases voláteis total (N-BVT) foi determinado pela precipitação da proteína com ácido tricloroacético (TCA 7,5%) utilizando o método de extração de micro Kjeldhal, de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). O pH foi determinado utilizando o músculo homogeneizado em água destilada numa proporção de 1:10 (p/v) (AOAC, 1995). A medição da cor dos filés foi realizada com um colorímetro (CR - 400 Chroma Meter, Konica Minolta Instrument Systems) que tem uma área circular de medição de 8 mm, e foram determinados os parâmetros de L *, a * e b *.

2.5 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial foi realizada na indústria pesqueira, após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FURG (CEP/FURG) CAAE 31233820.1.0000.5324. O

desenvolvimento do esquema MIQ e treinamento do painel sensorial foi baseada em métodos descritos por Freitas e Amaral (2011), com adaptação. Foram selecionados 6 julgadores de ambos os sexos, habituados a análise diária da qualidade do pescado. Todos os membros tiveram treinamento prévio com o uso do esquema MIQ. As observações dos pescados foram realizadas em condições padronizadas à temperatura refrigeração e com o mínimo de distração possível. Para o treinamento dos julgadores, um primeiro lote contendo dois peixes inteiros sem cabeça foram armazenados na caixa isotérmica em temperatura de refrigeração (4 °C), pesando 87,50 e 92,00 kg, avaliadas no 1, 3, 5, 6, 8, 10° dia de vida útil.

Os parâmetros observados foram aspecto geral, abdômen (interno) e pele durante o armazenamento, segundo a classificação apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Método de Índice de Qualidade (MIQ) para peixe espadarte (*Xiphias gladius*)

Parâmetro		Descrição	Pontuação
Aspecto geral	Consistência	muito firme/rígida	0
		firme/elástica	1
		ligeiramente mole	2
(internamente)	cor	branca prateada	0
		esbranquiçada ou ligeiramente amarelada	1
		Amarelada esverdeada	2
	peritônio	intacto e aderente	0
		pouco aderente	1
		desprendido	2
	odor	característico de peixe fresco	0
		maresia	1
		amoniacal	2
		pútrido	3
	textura	firme, intacta	0
		pouco firme, mas ainda intacta	1
		mole, enrugada, ruptura	2
Pele	Cor/Aparência	Pigmentação viva, cores vivas	0
		Perda de brilho, cores mais opacas	1
		Sem brilho, cores desvanecidas	2
	Muco	Claro e fluido	0
		Leitoso e espesso	1
		Amarelo e espesso	2
	Odor	Frescor	0
		Neutro a metal, grama seca, grãos	1
		Acre	2
		Rançoso	3

As pontuações foram dadas para cada atributo de qualidade de acordo com descrições, variando de 0 a 3. As pontuações dadas para todos os atributos de qualidade foram resumidas pelo Índice de Qualidade, que aumenta com o tempo de armazenamento. Cada amostra foi codificada com um número aleatório de três dígitos não relacionado ao tempo de armazenamento. Os pescados armazenados nas caixas foram colocados sobre a mesa durante 30 min para avaliação.

Para o estudo de vida útil do pescado foram selecionados dois peixes, pesando 46,50 e 42,00 kg, ambos foram avaliados no 1, 3, 5, 6, 8 e 10º dia de vida útil, com duração de 30 minutos para cada sessão.

O cálculo do escore geral de cada amostra foi determinado pelo índice de qualidade (IQ) em cada tempo de armazenamento avaliado. A relação linear entre o Índice de Qualidade e o tempo de armazenamento foi estimada através da determinação da equação da reta (SVEINSDOTTIR et al., 2003). A partir da equação, calculou-se o tempo de armazenamento correspondente a cada unidade de IQ até sua deterioração completa.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey a 5 % de significância, utilizando o programa Statistic 5.0 (Statsoft, USA). Os parâmetros cinéticos de Arrhenius das equações (3) e (4) foram avaliados por regressão linear e desvio padrão utilizando o Excel 2016.

Na análise sensorial foi calculado a equação de melhor ajuste e o coeficiente de correlação (r) entre o IQ e o tempo de armazenamento. A análise das pontuações para diferentes atributos avaliados com MIQ foi realizada com o programa estatístico utilizando o programa Statistic 5.0 (Statsoft, USA).

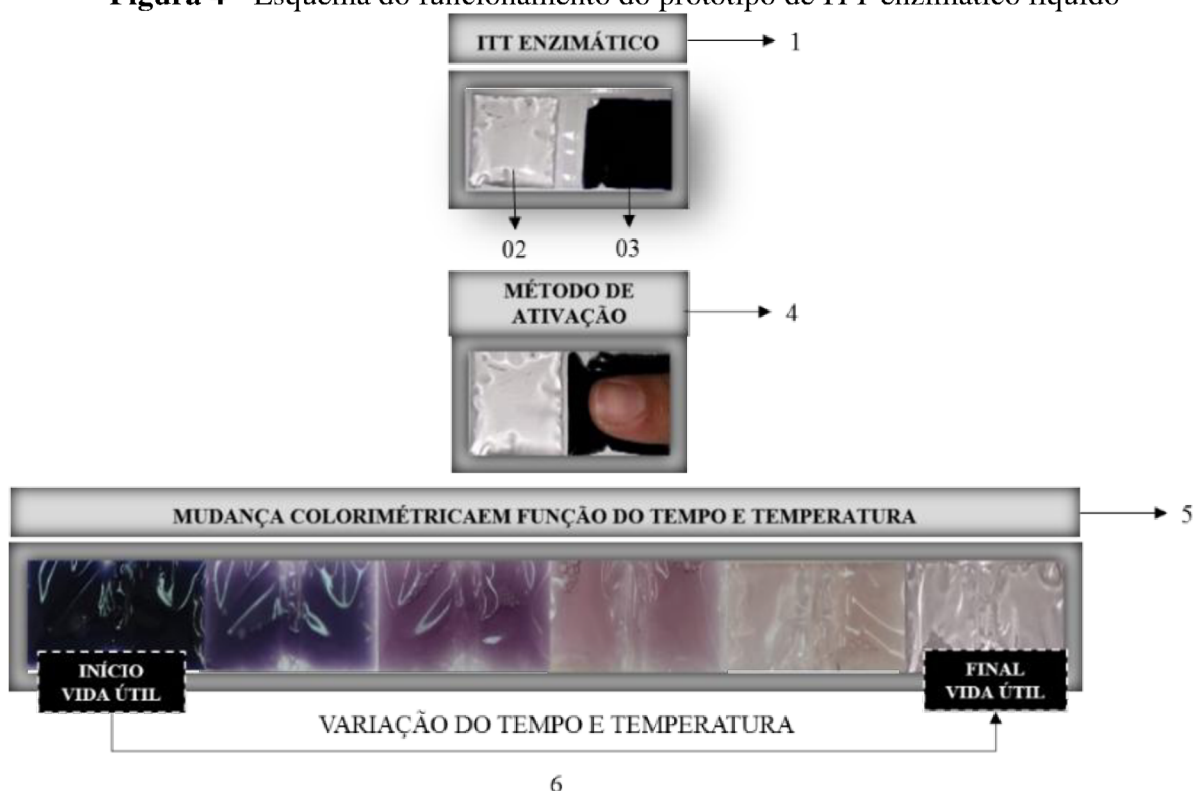
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO PROTÓTIPO DE ITT

O ITT tem como propósito informar o final da vida útil de um produto refrigerado quando submetido a alterações na temperatura originalmente definida. Seu princípio de funcionamento está ilustrado na Figura 4.

A etiqueta em estado inativo (1) apresenta isoladamente em um dos compartimentos a solução enzimática (2) e no outro o substrato composto de uma solução de amido-iodo (3). O método de ativação (4) ocorre através da desobstrução manual na selagem presente entre os dois compartimentos com a mistura de forma mecânica. No ITT em estado ativo (5), a reação subsequente realizará a hidrólise enzimática que provoca a mudança da cor do azul escuro, em cores sequenciais, até o incolor, de acordo com a variação de temperatura ao longo do tempo (6).

Figura 4 - Esquema do funcionamento do protótipo de ITT enzimático líquido



Os protótipos de ITTs enzimáticos foram avaliados utilizando a Equação 1 e 2 para avaliar a mudança de cor (ΔE) e temperatura (4 a 35 °C) nas diferentes concentrações de enzima (1 a 6%) sem o uso de conservante (Figura 5) e com o uso de conservante (sorbato de potássio) (Figura 6).

Com a variação da temperatura e concentração enzimática foi possível avaliar a mudança de cor dos protótipos de ITT, com a variação de ΔE 0 a 58. As reações enzimáticas foram mais rápidas nos protótipos de ITT sem o uso de conservantes. Na Figura 6, pode-se observar que o sorbato de potássio adicionado nos ITTs diminuiu a atividade enzimática, aumentando o tempo final de descoloração. De acordo com Pereira et al., (2013), o sorbato de potássio pode inibir a atividade de vários sistemas enzimáticos, rompendo processos vitais

envolvidos nas funções de transporte, metabolismo celular, crescimento, replicação, diminuindo o número de sítios ativos da enzima e consequentemente, a atividade enzimática.

Figura 5 - Descoloração dos protótipos de ITT submetidas a 4 °C (A), 10 °C (B), 15 °C (C), 25 °C (D), 35 °C (E) sem uso de conservante

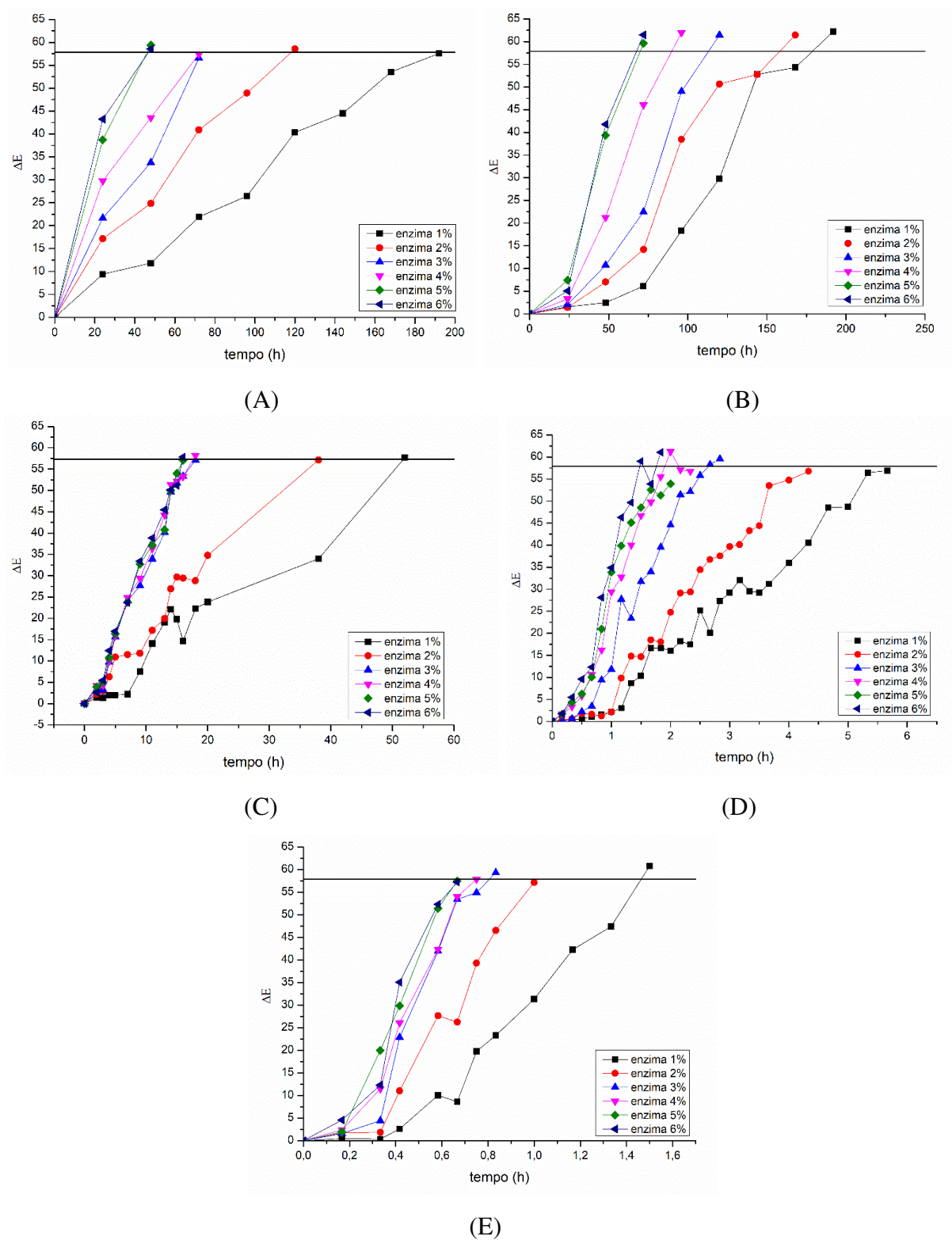
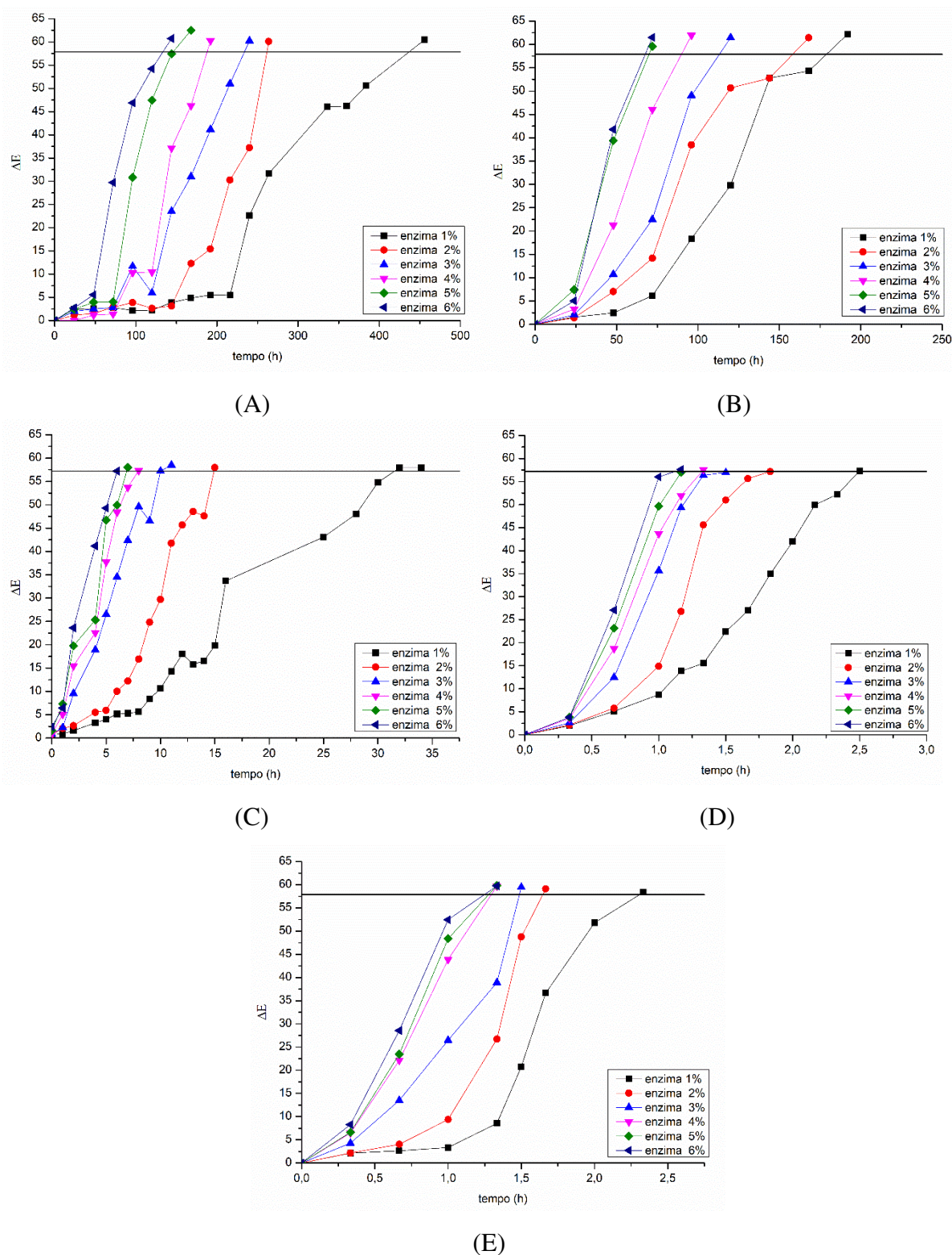


Figura 6 - Descoloração dos protótipos de ITT submetidas em 4 °C (A), 10 °C (B), 15 °C (C), 25 °C (D), 35 °C (E) com uso de conservante (sorbato de potássio)



* ΔE^* = 58,0 representa a diferença de cor definida como fim da vida-útil do ITT.

Os princípios básicos da modelagem e aplicação de ITT para monitoramento da qualidade foram detalhados por Taoukis e Labuza (1989) e Taoukis (2001). Este cálculo foi

realizado a partir da dependência da temperatura e da velocidade de reação, onde a energia de ativação (E_a) de Arrhenius foram obtidas por regressão linear, de acordo com a inclinação (E_a/R) e o intercepto ($\ln A$) no gráfico da Figura 7. Os valores da E_a e os dados dos coeficientes de determinação (R^2) dos protótipos de ITTs da enzima α -amilase com e sem o uso de conservantes estão apresentados na Tabela 2.

Figura 7 - Ln da constante de velocidade de resposta da descoloração dos ITT com 1 a 6 % de amilase sem conservantes (A) e com conservantes (B) plotados versus $1/T$ (K)

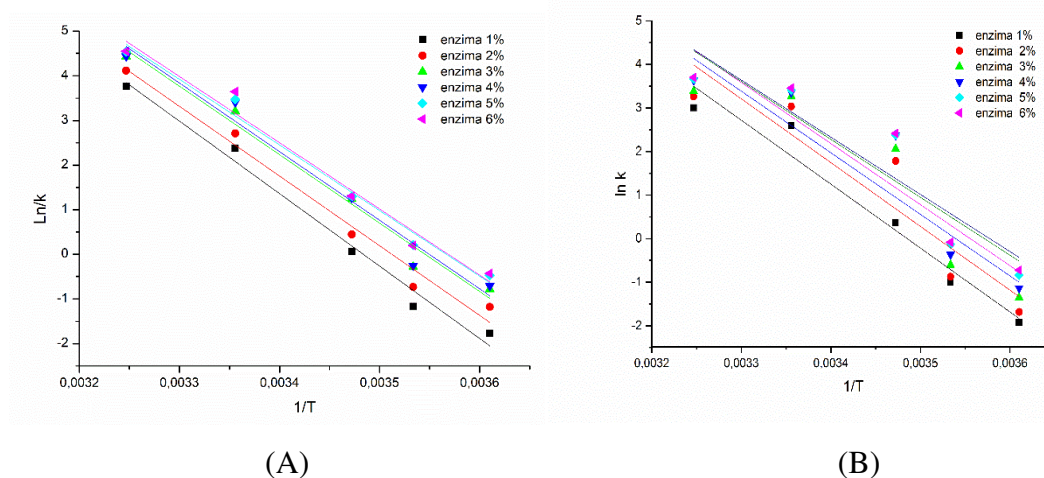


Tabela 2 - Parâmetros cinéticos dos protótipos de ITT enzimáticos (1 a 6 %) nas temperaturas 4, 10, 15, 25, 35 °C

	Sem sorbato de potássio			Com sorbato de potássio		
Cinética Arrhenius	E_a (kJ mol ⁻¹)	R^2 *	Tempo** (dias)	E_a (kJ mol ⁻¹)	R^2 *	Tempo** (dias)
ITT enzima 1%	134,77	0,9856	12	121,83	0,9550	19
ITT enzima 2%	129,60	0,9814	8	121,54	0,8685	11
ITT enzima 3%	127,28	0,9809	5	117,38	0,8538	10
ITT enzima 4%	127,57	0,9734	5	116,40	0,8533	8
ITT enzima 5%	122,00	0,9847	4	110,39	0,8621	7
ITT enzima 6%	123,11	0,9764	4	108,98	0,8616	6

*correlação do coeficiente de determinação

** tempo de vida útil a 4°C

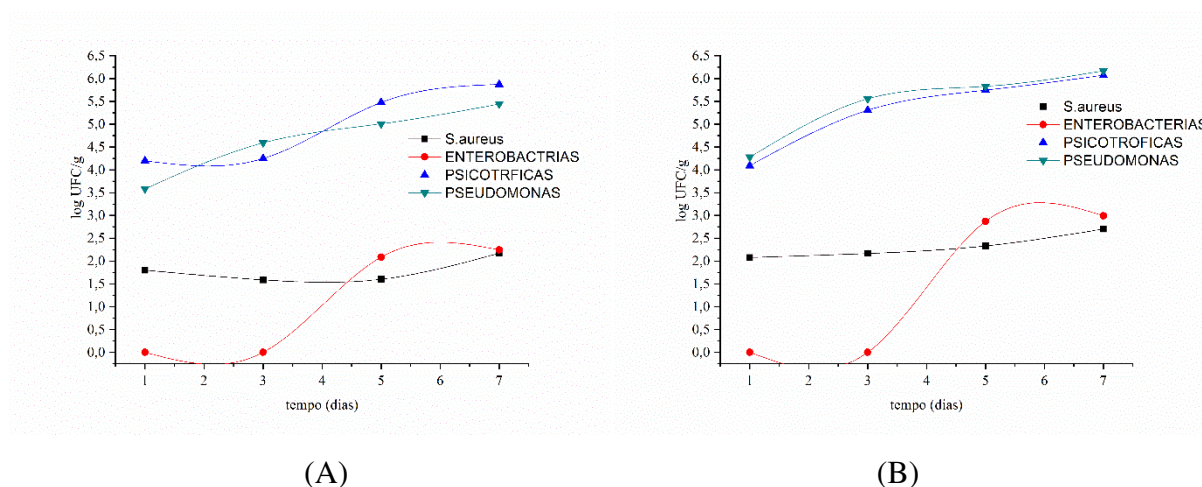
O modelo de Arrhenius permitiu estimar a dependência da temperatura na taxa de resposta de cor dos indicadores, em termos de energia de ativação. O valor E_a para os protótipos de ITTs enzimáticos sem o uso de conservantes foram maiores, apresentando correlações lineares acima de 0,97, indicando que o modelo proposto representou uma forte precisão.

Estudos que também elaboraram ITTs enzimáticos variando o conteúdo de α -amilase encontraram E_a entre 102 e 114 kJ mol⁻¹ (YAN et al., 2008) e 62,59 a 101,88 kJ mol⁻¹ (BRIZIO; PRENTICE, 2015). Observou-se também que a E_a dos protótipos dos ITTs enzimáticos deste estudo foram consistentes com o ITT enzimático disponível comercialmente pela empresa Vitsab AB (Malmö, Suécia), que relataram E_a para os ITTs do tipo S (102,16 kJ mol⁻¹) aplicados ao pescado (*boops boops*) (TAOUKIS; KOUTSOUMANIS, 1999).

3.2 ESTUDO CINÉTICO DA QUALIDADE DO PESCADO ESPARTE

A avaliação da microbiota presente no pescado espadarte eviscerado no barco (PEB) e pescado eviscerado na indústria (PEI), está apresentada na Figura 8A e 8B, respectivamente.

Figura 8 - Contagem de *S. aureus* (■), *Enterobacteriaceae* (●), psicotróficas (▲) e *Pseudomonas* (▼) em pescado eviscerado no barco(A) e pescado eviscerado na indústria (B)



A população microbiana de *S. aureus* foi de 1,50 para 2,17 log UFC/g para PEB e 2,08 para 2,70 UFC/g para PEI em 7 dias, apresentando contagens mais baixas ($P < 0,05$) do que para outras espécies microbianas em amostras de espadarte. Os resultados obtidos nas análises do pescado cru refrigerado indicaram conformidade com os padrões da legislação que exige limite máximo de 2 a 3 log UFC/g (BRASIL, 2019b).

O crescimento inicial das *Enterobacteriaceae* foi no 5º dia e a contagem final foi de 2,25 log UFC/g para PEB e 2,99 UFC/g para PEI. Enquanto, Pantazi et al., (2008), ao avaliar

o pescado espadarte refrigerado (4°C) alcançou valores 5,6 log UFC/g em 16 dias nas mesmas condições de armazenamento avaliados neste estudo.

As bactérias psicotróficas e *Pseudomonas* foram predominantes no pescado. A contagem inicial de psicotróficas foi de 4,2 para 5,87 log UFC/g para PEB e de 4,09 para 6,07 log UFC/g para PEI no 7º dia de análise. A população de *Pseudomonas*, micro-organismo gram-negativo da flora natural do espadarte, foi de 3,58 para 5,44 log UFC/g para PEB e de 4,28 para 6,17 UFC/g para PEI em 7 dias.

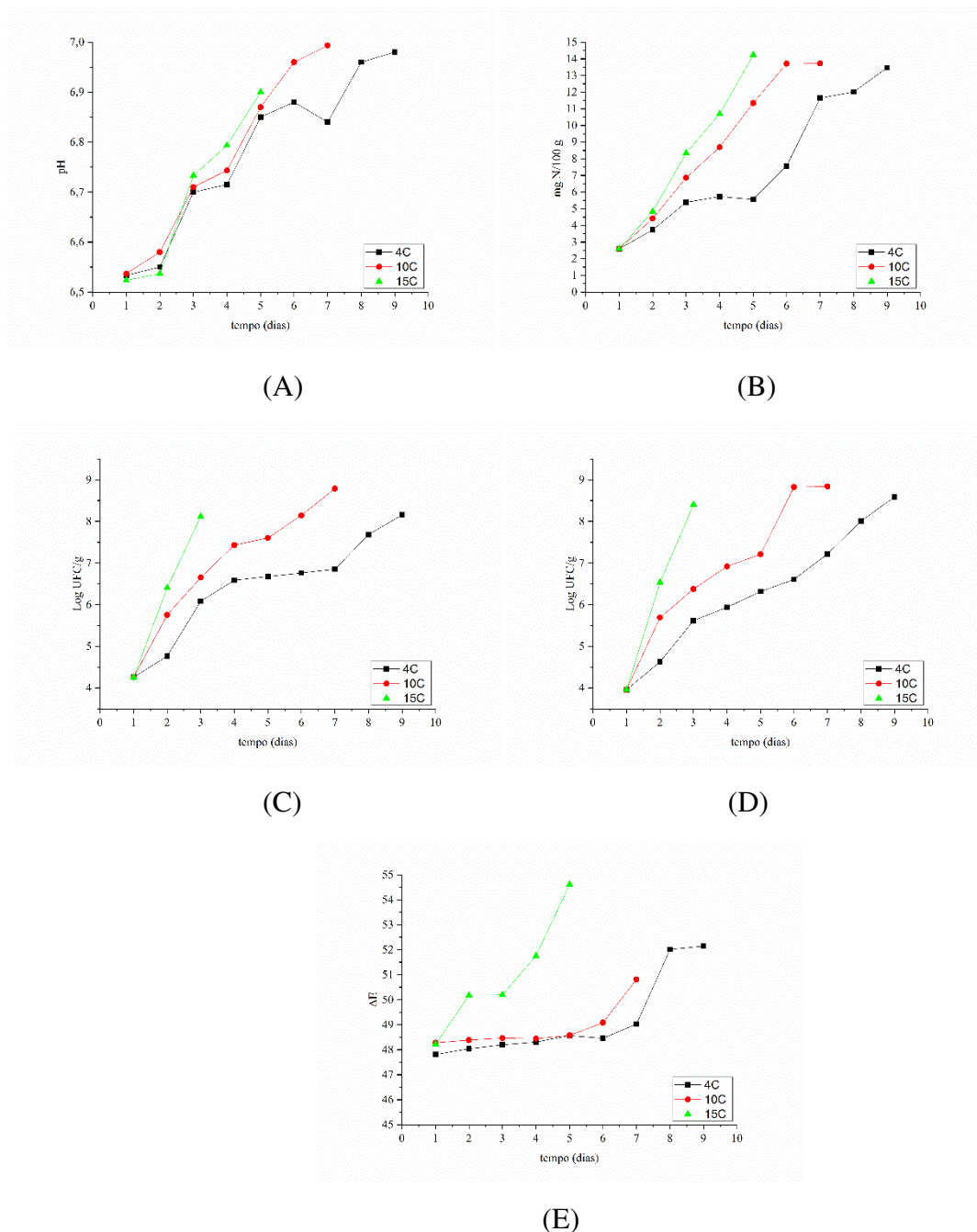
Após 7 dias de armazenamento, os pescados eviscerados da fábrica apresentaram um valor significativamente maior ($p < 0,05$) do que nos pescados eviscerados no barco, para todos os micro-organismos avaliados. De acordo com Skare et al. (2021) o abate em instalações terrestres resulta em um menor prazo de validade com base em um maior escore de MIQ e contagem microbiológica em comparação com aqueles abatidos a bordo do navio. Sugerindo o abate a bordo de um navio o método mais eficaz e sustentável.

Uma vez que a contagem de bactérias psicotróficas e *Pseudomonas* foram as espécies dominantes na deterioração do pescado nos dois tratamentos, optou-se por analisar a cinética do frescor do pescado e calcular a energia de ativação da diminuição do frescor através destes dois indicadores microbianos a partir do pescado eviscerado no barco. E, com o intuito de avaliar a vida útil deste pescado, foram analisados os indicadores N-BVT, cor e pH em diferentes temperaturas, conforme mostrado na Figura 9.

Os valores de pH de todas as amostras de pescado apresentaram-se dentro dos parâmetros permitidos pela legislação brasileira que é de 7,0 (BRASIL, 2020) nos 9 dias analisados. Os valores iniciais de N-BVT (2,6 mg N/100 g de músculo de pescado) e a contagem de psicotróficas foi relativamente baixa (3,96 log UFC/g), o que indica que o pescado apresentou baixa contaminação microbiana antes de ser embalado.

Os valores de N-BVT no final dos 9 dias foi de 13,5 mg N/100 g. Ao comparar com Pantazi et al. (2008), os valores de N-BVT em 100 g músculo de pescado foi de 42,0 mg N, excedendo o exigido no oitavo dia quando armazenado em embalagem na presença de ar. Os resultados encontrados para N-BVT se encontraram dentro dos limites permitidos (30 mg N/100g) pelo RIISPOA (BRASIL, 2020) durante os 9 dias de vida útil (13,5 mg N/100 g). Comparando com Pantazi et al. (2008), que obteve valores de N-BVT em 100 g músculo de pescado de 42,0 mg N, excedendo o exigido no oitavo dia quando armazenado em embalagem na presença de ar. Zhang et al. (2015) relata que as condições aeróbicas na produção de filé de carpa durante o armazenamento, favoreceram o aumento dos valores de N-BVT de 12,43 mg/100 g para 26,41 mg/100 g no 8º dia.

Figura 9 - Avaliação da vida útil do pescado espadarte através das mudanças de pH (A), N-BVT (B), *Pseudomonas* (C), psicotrófica (D), variação de cor (ΔE) submetida as temperaturas de 4, 10 e 15°C



A contagem de *Pseudomonas* e psicotróficas aumentaram com o tempo de armazenamento (Figuras 9C e 9D). Sendo que, a contagem total de *Pseudomonas* excedeu 7 log de UFC/g no oitavo dia de armazenamento a 4°C. Apesar da legislação brasileira não estabelecer limites para *Pseudomonas* e as psicotróficas em alimentos, foi demonstrado que, independentemente da temperatura de armazenamento, a vida útil dos pescados pode ser

prevista como o tempo necessário para que a contagem final de 7 log UFC/g (KOUTSOUMANIS et al., 2002; KOUTSOUMANIS; TAOUKIS; DROSINOS, 2000; TAOUKIS; KOUTSOUMANIS; NYCHAS, 1999).

As bactérias do gênero *Pseudomonas* são importantes na deterioração de alimentos e predominantes em pescados estocados a temperatura de refrigeração (4°C). Assim como, as bactérias psicotróficas são capazes de metabolizar a maioria dos aminoácidos presentes no pescado e produzir compostos sulfurados que atribuem ao pescado sabor, cor e odor indesejáveis (ALCANTARA; MORAIS; SOUZA, 2012).

A cor é um dos mais importantes atributos de qualidade do pescado devido à sua relação com o frescor dos produtos, além disso, tem efeito direto na percepção do consumidor (LAWLESS; HEYMANN, 2010). Baseado nisso, foi avaliado a cor dos filés de pescado durante a vida útil, na qual foi possível observar que não houve diferença dos valores de ΔE a 4 °C nos 7 primeiros dias. No entanto, no oitavo dia houve um aumento significativo no ΔE , onde L^* aumentou de 47,81 para 52,15 e tornou-se mais pálido durante o armazenamento em gelo. O sistema CIELAB mostrou uma leve diminuição nos valores de croma a^* (0,30 para 0,11) e um ligeiro aumento no croma b^* (-0,10 para 0,56) no músculo do pescado. De acordo com Chan et al. (2020); Erikson e Misimi (2008); Ozbay, Spencer e Gill (2006) a perda de vermelhidão do filé de peixe e a cor mais amarelada no armazenamento contínuo em gelo por 7 dias, pode estar correlacionada com a desnaturação da proteína e maior perda de líquido.

O modelo de Arrhenius nos permitiu estimar a taxa de resposta dos indicadores de qualidade (*Pseudomonas*, psicotróficas, N-BVT, pH e cor) dependente da temperatura em termos de energia de ativação, conforme mostra a Tabela 3. Para selecionar a concentração de enzima mais apropriada com base nos estudos cinéticos de qualidade para o pescado espadarte, é necessário que a resposta da E_a do protótipo de ITT corresponda à E_a de um dos indicadores de qualidade avaliados na Tabela 3.

De acordo com os resultados do estudo, as E_a dos indicadores de qualidade apresentaram valores entre 33,87 e 89,12 kJ mol⁻¹ para monitoramento da vida útil do pescado espadarte.

Ao avaliar o potencial dos ITTs para monitoramento de qualidade aplicadas em produtos de pescado alguns estudos avaliaram a E_a sob o acompanhamento do crescimento de *Pseudomonas* em peixe boga (*Boops Boops*) (E_a = 81,66 kJ mol⁻¹) (TAOUKIS; KOUTSOUMANIS, 1999), em peixe dourada (E_a = 65,38 kJ mol⁻¹) (GIANNAKOUROU et al., 2005), em peixe-leite (chanos chanos) (KUSWANDI et al., 2012b) e em filé de peixe com CO₂ (E_a = 65,4 kJ mol⁻¹) (KOUTSOUMANIS; TAOUKIS; DROSINOS, 2000). Estes

resultados encontraram valores de E_a mais baixo do que o avaliado neste estudo ($89,12 \text{ kJ mol}^{-1}$).

Tabela 3 - Efeito dos parâmetros cinéticos de *Arrhenius* do pescado nas temperaturas de 4, 10 e 15 °C

Análises de qualidade	$E_a \text{ (kJ mol}^{-1}\text{)}$	R^2	Tempo* (dias)
<i>Pseudomonas</i>	89,12	0,99	8
Psicotróficas	82,98	0,92	7
N-BVT	44,86	0,99	**
pH	33,87	0,99	**
Cor	56,94	0,38	Não há padrão

*tempo de vida útil a 4 °C

** manteve-se dentro do padrão durante os 9 dias de análises

As análises de N-BVT têm sido tradicionalmente utilizadas como indicadores de qualidade em produtos de pescados armazenados sob refrigeração. Giannoglou et al. (2014) ao avaliarem do índice de N-BVT encontrou E_a de 117 kJ mol^{-1} para filés de tubarão azul e $80,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ para lula e $117,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ para filés de garoupa embalada a vácuo (HSIAO; HUANG, 2016). O presente estudo mostra que a E_a ($44,86 \text{ kJ mol}^{-1}$) calculada com o índice de N-BVT apresenta valores menores do que aos encontrados na literatura.

Portanto, a escolha do protótipo de ITT e o indicador de qualidade para pescado espadarte refrigerado foi baseado no valor da E_a e no tempo de vida útil. Considerando que a diferença permitida na E_a dos indicadores de qualidade do pescado e os protótipos de ITT analisados devem ser menor que 25 kJ mol^{-1} (TAOUKIS, 2001) para prever a qualidade de vida útil com menor erro.

Conforme Tabela 2, a E_a dos protótipos de ITT nas concentrações de enzima 4 %, 5 % e 6 % com o uso de conservantes foi de 166,40; 110,39 e $108,98 \text{ kJ mol}^{-1}$ respectivamente, apresentando as menores diferenças quando comparado com o indicador de *Pseudomonas* ($89,12 \text{ kJ mol}^{-1}$). No entanto, o protótipo de ITT com 4% de enzima e uso de conservante prevê o tempo de vida útil (8 dias) semelhante ao tempo de vida útil previsto na análise de *Pseudomonas*, sendo este o protótipo de ITT mais indicado para aplicação em pescado espadarte armazenado a 4°C.

3.2.1 Avaliação da vida útil através do MIQ

Para estabelecer de forma confiável a vida útil do pescado espadarte, os resultados anteriores foram analisados juntamente com dados sensoriais. Os parâmetros que foram selecionados e incluídos no método de índice de qualidade (MIQ) para pescado espadarte (*Xiphias gladius*) foram baseados em características externas (consistência, cor, odor e muco) e internas do abdômen (textura, cor, odor e peritônio). No esquema final do MIQ, o índice de qualidade atingiu 19 pontos deméritos, descrevendo 8 atributos sensoriais (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores médios dos escores sensoriais das amostras do pescado espadarte armazenadas durante 8 dias

Atributos sensoriais	1 dia	3 dias	5 dias	6 dias	8 dias
Consistências externa	0,60±0,55 ^a	1,00±0,00 ^a	1,00±0,00 ^a	1,60±0,55 ^a	2,00±0,00 ^a
Cor interna	0,00±0,00 ^a	0,40±0,55 ^{ab}	1,00±0,00 ^a	1,00±0,00 ^a	2,00±0,00 ^a
Peritônio	0,00±0,00 ^a	0,40±0,55 ^{ab}	0,60±0,55 ^a	1,00±1,00 ^a	1,60±0,55 ^a
Odor interno	0,00±0,00 ^a	0,60±0,55 ^{ab}	0,80±0,45 ^a	1,40±0,55 ^a	1,80±0,45 ^a
Textura interna	0,40±0,55 ^a	1,00±0,00 ^a	1,00±0,00 ^a	1,20±0,45 ^a	1,80±0,45 ^a
Cor externa	0,60±0,55 ^a	1,00±0,00 ^a	1,20±0,45 ^a	1,40±0,55 ^a	1,80±0,45 ^a
Muco	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^b	0,80±0,45 ^a	1,00±0,00 ^a	1,60±0,55 ^a
Odor externa	0,00±0,00 ^a	0,60±0,55 ^{ab}	0,80±0,45 ^a	1,20±0,45 ^a	1,60±0,55 ^a
Índice Qualidade	1,30±0,20	4,40±0,24	6,80±0,25	10,60±0,13	13,9±0,10

* Letras minúsculas iguais para o mesmo tempo (dia), indicam que não há diferença significativa entre os parâmetros sensoriais ($p > 0,05$); (Média ± desvio padrão).

Durante o armazenamento, todos os parâmetros incluídos no esquema MIQ apresentaram mudanças com o tempo. O índice de qualidade aumentou linearmente com o período de armazenamento do pescado, com taxa de mudança de 1,3 a 13,9, mostrando a perda da qualidade nas características sensoriais dos filés testados. Sua evolução pode ser expressa pela equação $IQ = 1,818x - 0,965$ ($R^2 = 0,9748$). O parâmetro mais importante para a definição do ponto de rejeição foi a consistência e a cor do abdômen (interno) seguidos de odor interno, textura e cor externa, apesar de os valores não diferiram entre si.

O pescado espadarte exportação é armazenado sem cabeça, eviscerado e com gelo, o abdômen é parte do pescado de maior exposição com o meio, contribuindo para proliferação microbiana. Apesar da proteção do peritônio visceral, este pode sofrer alterações dependendo

da manipulação que é realizada durante o processo de evisceração e lavagem. De acordo com o relato dos julgadores, no oitavo dia o peritônio já estava desprendido do abdômen e a cor cinza inicial sofreu alterações para a cor amarelo esverdeado, acompanhada de odor pútrido.

De acordo com Sant'ana; Soares; Vaz-Pires (2011) a cor é considerada a parte do pescado mais suscetível à decomposição microbiana e portanto, o grau de deterioração pode ser facilmente visto com a mudança de cor. A formação de compostos voláteis, durante a deterioração do pescado, pode promover alterações nas características sensoriais. Dentre os principais compostos encontrados em pescados, pode-se citar o grupo dos aldeídos, álcoois, hidrocarbonetos, cetonas e aminas (IGLESIAS et al., 2009). Os álcoois têm, tipicamente, menor limiar de odor que os aldeídos e cetonas e não contribuem muito para os odores de deterioração. Altas concentrações de cetonas têm sido encontradas em amostras com maiores índices de deterioração e correlacionadas com odores doce/azedo e atributos de “off flavor” e sabor (JONSDOTTIR et al., 2008).

Portanto, o ponto de rejeição sensorial, baseado na avaliação dos atributos ocorreu no oitavo dia de armazenamento, confirmando o tempo de vida útil do pescado cru refrigerado, semelhante aos parâmetros testados anteriormente.

O presente estudo permitiu uma modelagem cinética para o fim da vida útil do pescado espadarte refrigerado e a seleção de um protótipo de ITT, como parte de um sinal de validade ativa para aplicação específica neste produto, que pode ser aplicado sem a necessidade de testes extensos lado a lado do produto e do indicador.

4 CONCLUSÃO

As reações enzimáticas foram mais rápidas nos protótipos de ITT sem o uso de conservantes, conseqüentemente, o valor da E_a foi maior ao comparar com os protótipos de ITT com conservante.

O abate em instalações terrestres resultou em um menor prazo de validade em contagem microbiológica em comparação com aqueles abatidos a bordo do navio. Sugerindo o abate a bordo de um navio o método mais eficaz e sustentável. Os organismos específicos de deterioração predominantes do pescado espadarte foram as bactérias psicotróficas e as *Pseudomonas*. No entanto, os indicadores N-BVT, pH e cor não obtiveram relação direta com o fim da vida útil do pescado refrigerado. O esquema MIQ proposto possibilitou a confirmação do fim da vida útil no oitavo dia de armazenamento e os parâmetros que determinaram o ponto de rejeição foram a consistência e a cor do abdômen (interno).

O protótipo de ITT com 4% de enzima e uso de conservante prevê o tempo de vida útil (8 dias) semelhante ao tempo de vida útil previsto na análise de *Pseudomonas*, sendo este o melhor indicador de qualidade para monitorar o frescor do pescado espadarte armazenado com gelo a 4°C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHVENAINEN, R. **Novel Food Packaging Techniques**, 589 p., 2003.

ALCANTARA, M.; MORAIS, I. C. L.; SOUZA, C. M. O. C. C. Principal Microorganisms involved in the decay of sensory characteristics of meat products. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 6, n. 1, p. 1–20, 2012.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists (ed. 16), **Official Methods of Analysis**. Washington, DC, USA, 1995.

APHA. American Public Health Association. Washington, DC, USA, 2001.

BONILAURI, P.; GRISENTI, M. S.; DAMINELLI, P.; MERIALDI, G.; RAMINI, M.; BARDASI, L.; TADDEI, R.; COSCIANI-CUNICO, E.; DALZINI, E.; FRUSTOLI, M. A.; GIACOMETTI, F.; PIVA, S.; SERRAINO, A. Reduction of *Salmonella spp.* populations in Italian salami during production process and high pressure processing treatment: Validation of processes to export to the U.S. **Meat Science**, v. 157, p. 1-6, 2019.

BOZIARIS, I. S. Introduction to Seafood Processing-Assuring Quality and Safety of Seafood. **Seafood Processing: Technology, Quality and Safety**, p. 1–8, 2014.

BRASIL. Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para o controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 02 de janeiro de 2001, seção I, p. 45-53, 2001.

BRASIL. Instrução Normativa nº60, 23 de dezembro 2019. Lista de padrões microbiológico para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, 2019.

BRASIL. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Decreto Nº 10.468, DE 18 de agosto de 2020, **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. 2020.

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

BRIZIO, A. P. R.; PRENTICE, C. Validação do tempo de vida útil apresentado por sensor fotocrômico de tempo e temperatura. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 32, n. 1, p. 47–54, 2014.

CAMPUS, M.; BONAGLINI, E.; CAPPUCCINELLI, R.; PORCU, M. C.; TONELLI, R.; ROGGIO, T. Effect of modified atmosphere packaging on quality index method (QIM) scores of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) at low and abused temperatures. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 3, p. 185–191, 2011.

CHAN, S. S.; ROTH, B.; JESSEN, F.; LØVDAL, T.; JAKOBSEN, A. N.; LERFALL, J. A comparative study of Atlantic salmon chilled in refrigerated seawater versus on ice: from whole fish to cold-smoked fillets. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.

ERIKSON, U.; MISIMI, E. Atlantic salmon skin and fillet color changes effected by perimortem handling stress, rigor mortis, and ice storage. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 2, 2008.

ESTEVES, E.; ANÍBAL, J. Sensory evaluation of seafood freshness using the quality index method: A meta-analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 337, n. September 2020, p. 108934, 2021.

FREITAS, D. D. G. C.; DO AMARAL, G. V. Método do Índice de Qualidade (MIQ) para a Avaliação Sensorial da Qualidade de Pescado. **Embrapa Agroindústria de Alimentos-Documentos**, p. 1–20, 2011.

FREITAS, J.; VAZ-PIRES, P.; CÂMARA, J. S. Quality Index Method for fish quality control: Understanding the applications, the appointed limits and the upcoming trends. **Trends in Food Science and Technology**, v. 111, p. 333–345, 2021.

GAO, T.; SUN, D. W.; TIAN, Y.; ZHU, Z. Gold–silver core-shell nanorods based time-temperature indicator for quality monitoring of pasteurized milk in the cold chain. **Journal of Food Engineering**, v. 306, p. 1-9, 2021.

GARCÍA, M. R.; CABO, M. L.; HERRERA, J. R.; RAMILO-FERNÁNDEZ, G.; ALONSO, A. A.; Balsa-Canto, E. Smart sensor to predict retail fresh fish quality under ice storage. **Journal of Food Engineering**, v. 197, p. 87–97, 2017.

GHANI KUVEI, F.; KHODANAZARY, A.; ZAMANI, I. Quality index method (QIM) sensory scheme for gutted greenback grey mullet *Chelon subviridis* and its shelf life determination. **International Journal of Food Properties**, v. 22, n. 1, p. 618–629, 2019.

GIANNAKOUROU, M. C.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G. J. E.; TAOUKIS, P. S. Field evaluation of the application of time temperature integrators for monitoring fish quality in the chill chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, n. 3, p. 323–336, 2005.

GIANNOGLOU, M.; TOULI, A.; PLATAKOU, E.; TSIRONI, T.; TAOUKIS, P. S. Predictive modeling and selection of TTI smart labels for monitoring the quality and shelf-life of frozen seafood. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 26, p. 294–301, 2014.

HSIAO, H. I.; HUANG, K. L. Time-temperature transparency in the cold chain. **Food Control**, v. 64, p. 181–188, 2016.

ICCAT, S. D. **MS Excel pivot table to obtain nominal catches of Atlantic tunas and tuna-like fish (including sharks), by gear, region and flag**. [s. n.], 2019.

IGLESIAS, J.; MEDINA, I.; BIANCHI, F.; CARERI, M.; MANGIA, A.; MUSCI, M. Study of the volatile compounds useful for the characterisation of fresh and frozen-thawed cultured gilthead sea bream fish by solid-phase microextraction gas chromatography – mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1473–1478, 2009.

JONSDOTTIR, R.; OLAFSDOTTIR, G.; CHANIE, E.; HAUGEN, J. E. Volatile compounds suitable for rapid detection as quality indicators of cold smoked salmon (*Salmo salar*). **Food Chemistry**, v. 109, p. 184–195, 2008.

KINAS, P. **Boletim Estatístico da Pesca Marinha e Estuarina do sul do Rio Grande do Sul**. Rio Grande: [s.n.]. Disponível em: <http://www.imef.furg.br/images/stories/documentos/boletim_furg_2015.pdf>.

KOUTSOUMANIS, K.; GIANNAKOURE, M. C.; TAOUKIS, P. S.; NYCHAS, G. J. E. Application of shelf life decision system (SLDS) to marine cultured fish quality. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 375–382, 2002.

KOUTSOUMANIS, K. P.; TAOUKIS, P. S.; DROSINOS, E. H. Applicability of an Arrhenius Model for the Combined Effect of Temperature and CO₂ Packaging on the Spoilage Microflora of Fish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3528–3534, 2000.

KUSWANDI, B.; JAYUS; RESTYANA, A.; ABDULLAH, A.; HENG, L. Y.; AHMAD, M. A novel colorimetric food package label for fish spoilage based on polyaniline film. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 18–189, 2012a.

LAWLESS, H. T.; HEYMANN, H. **Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices**. 2nd ed., New York, NY: [s.n.], 2010.

LIU, B.; XU, H.; ZHAO, H.; LIU, W.; ZHAO, L.; LI, Y. Preparation and characterization of intelligent starch/PVA films for simultaneous colorimetric indication and antimicrobial activity for food packaging applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 842–849, 2017.

MENDOZA, T. F.; WELT, B. A.; OTWELL, S.; TEIXEIRA, A. A.; KRISTONSSON, H.; BALABAN, M. O. Kinetic Parameter Estimation of Time-temperature Integrators Intended. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 3, 2004.

NOLLET, L. M. L.; TOLDRA, F. **Handbook of seafood and seafood products analysis**. [s.l: s.n.], 930 p., 2009.

OZBAY, G.; SPENCER, K.; GILL, T. A. Investigation of protein denaturation and pigment fading in farmed steelhead (*Onchorhynchus mykiss*) fillets during frozen storage. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 30, n. 2, p. 208–230, 2006.

PANTAZI, D.; PAPAVERGOU, A.; POURNIS, N.; KONTOMINAS, M. G.; SAVVAIDIS, I. N. Shelf-life of chilled fresh Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius*) stored under various packaging conditions: Microbiological, biochemical and sensory attributes. **Food Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 136–143, 2008.

SANT'ANA, L. S.; SOARES, S.; VAZ-PIRES, P. Development of a quality index method (QIM) sensory scheme and study of shelf-life of ice-stored blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2253–2259, 2011.

SKARE, M.; CHAN, S. S.; HANDELAND, S. O.; LØVDAL, T.; LERFALL, J.; ROTH, B. A comparative study on quality, shelf life and sensory attributes of Atlantic salmon slaughtered on board slaughter vessels against traditional land-based facilities. **Aquaculture**, v. 540, p. 1–12, 2021.

SPAGNOL, W. A.; SILVEIRA, V.; PEREIRA, E.; FILHO, N. G. Monitoramento da cadeia do frio: Novas tecnologias e recentes avanços. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, p. 2–8, 2018.

SVEINSDOTTIR, K.; HYLDIG, G.; MARTINSDOTTIR, E.; JØRGENSEN, B.; KRISTBERGSSON, K. Quality Index Method (QIM) scheme developed for farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Food Quality and Preference**, v. 14, n. 3, p. 237–245, 2003.

TAOUKIS, P. S. Modelling the use of time-temperature indicators in distribution and stock rotation. In: **Food Process Modelling**. Woodhead. Cambridge: [s.n.]. p. 402–428.

TAOUKIS, P. S.; LABUZA, T. P. Applicability of Time-Temperature Indicators as Shelf Life Monitors of Food Products. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 4, p. 783–788, 1989.

TAOUKIS, P. S.; KOUTSOUMANIS, K. Use of time – temperature integrators and predictive modelling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, p. 21–31, 1999.

TAOUKIS, P. S.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G. J. E. Use of time-temperature integrators and predictive modelling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 21–31, 1999.

TAOUKIS, P. S.; TSIRONI, T. N. Time–Temperature Integrators (TTI). **Reference Module in Food Science**, p. 1–13, 2018.

TSIRONI, T.; GOGOU, E.; VELLIU, E.; TAOUKIS, P. S. Application and validation of the TTI based chill chain management system SMAS (Safety Monitoring and Assurance System) on shelf life optimization of vacuum packed chilled tuna. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 1, p. 108–115, 2008.

TSIRONI, T.; RONNOW, P.; GIANNOGLOU, M.; TAOUKIS, P. Developing suitable smart TTI labels to match specific monitoring requirements: The case of *Vibrio spp.* growth during transportation of oysters. **Food Control**, v. 73, p. 51–56, 2017.

TSIRONI, T. N.; TAOUKIS, P. S. Current Practice and Innovations in Fish Packaging. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 27, n. 10, p. 1024–1047, 2018.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; GARCÍA, E. E. S.; GALVÃO, J. A.; OETTERER, M. Quality Index Method (QIM) Scheme Developed for Whole Nile Tilapias (*Oreochromis niloticus*) Ice Stored under Refrigeration and Correlation with Physicochemical and Microbiological Quality Parameters. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 29, n. 3, p. 307–319, 2020.

YAN, S.; HUAWEL, C.; LIMIN, Z.; FAZHENG, R.; LUDA, Z.; HENGTAO, Z. Development and characterization of a new amylase type time-temperature indicator. **Food Control**, v. 19, n. 3, p. 315–319, 2008.

ZHANG, Y.; LI, Q.; LI, D.; LIU, X.; LUO, Y. Changes in the microbial communities of air-packaged and vacuum-packaged common carp (*Cyprinus carpio*) stored at 4 °C. **Food Microbiology**, v. 52, p. 197–204, 2015.

**ARTIGO III – AVALIAÇÃO DA VIDA ÚTIL DE CENOURAS MINIMAMENTE
PROCESSADAS APLICANDO O MÉTODO PERFIL FLASH *IN HOME* E
VALIDAÇÃO USO DO ITT ENZIMÁTICO**

ARTIGO III – AVALIAÇÃO DA VIDA ÚTIL DE CENOURAS MINIMAMENTE PROCESSADAS APLICANDO O MÉTODO PERFIL FLASH *IN HOME* E VALIDAÇÃO DO ITT ENZIMÁTICO

RESUMO

O objetivo do estudo foi selecionar o ITT enzimático adequado para o monitoramento da qualidade e vida útil da cenoura minimamente processada armazenada á vácuo e 4 °C. A resposta dos protótipos de ITT descrevem o efeito da concentração enzimática (0,2 a 6%), do tempo de armazenamento e da temperatura (4, 10, 15, 25 e 35 °C), o modelo de Arrhenius permitiu estimar a energia de ativação do ITT (108,98 a 126,46 kJ mol⁻¹ e das cenouras em cubos (45,004 a 112,896 kJ mol⁻¹). Aplicando os modelos desenvolvidos foi determinado o protótipo de ITT contendo 5% de amilase que prevê o tempo de vida útil de 7 dias, semelhante ao tempo quando avaliado os indicadores de qualidade (firmeza, bactérias psicotróficas e BAL) e a análise sensorial de perfil flash *in home*. De acordo com a análise sensorial, os atributos presença de água, ar, cor amarronzada, odores ácido, amoniacal, maciez e textura pastosa foram determinantes para indicar o fim da vida útil deste produto.

Palavras chaves: Cenoura minimamente processada. ITT enzimático. Vida útil. Perfil flash *in home*.

1 INTRODUÇÃO

Cenouras minimamente processadas representam um dos principais produtos vegetais utilizados como alimentos prontos para comer (CONAB, 2020; FAI et al., 2016; MAO et al., 2021). O processamento pode incluir seleção, corte, fatiamento, lavagem, desinfecção, enxágue, centrifugação, embalagem e armazenamento (BRASIL, 2017b). Na lavagem dos produtos frescos, o cloro é o agente mais comum usado na indústria alimentícia para sanitização, mas na presença de matrizes orgânicas são potencialmente perigosos para o meio ambiente e para saúde humana (BOTONDI; BARONE; GRASSO, 2021). Por esta razão, tratamentos alternativos com o uso de ozônio têm sido investigados com o objetivo de testar processos mais eficazes e evitar os riscos associados (BRODOWSKA et al., 2017; PAULIKIENĖ et al., 2020; RENUMARN et al., 2014; SOUZA et al., 2018).

De acordo com Ruiz-Garcia (2010) durante a logística de distribuição de vegetais ocorre a perda de até 35% da carga, sendo a principal causa, condições insuficientes de controle de temperatura. O uso da refrigeração reduz as taxas em que ocorrem alterações em alimentos perecíveis, como crescimento de micro-organismos, taxas de amadurecimento, reações

enzimáticas e perdas de água (CHEN et al., 2021). A não manutenção da temperatura, mesmo que por algumas horas, podem ter impacto significativo na evolução da qualidade do produto (LOISEL et al., 2021). Uma maneira de controlar o histórico de temperatura de um produto, é a implementação de indicadores de tempo e temperatura (ITTs) (ALBRECHT et al., 2020).

Os ITTs são ferramentas de registro de qualidade de alimentos que refletem o histórico de temperatura total ou parcial durante o monitoramento (GIANNOGLOU et al., 2014; TAOUKIS; LABUZA, 1989). Deste modo, os ITTs indicam mudanças na qualidade dos alimentos e informações restantes sobre o prazo de validade (TSIRONI et al., 2017). Com base em modelos cinéticos confiáveis, tanto da deterioração dos alimentos quanto da resposta ITT, o efeito da temperatura pode ser monitorado da produção até o ponto de consumo (TAOUKIS; LABUZA, 1989; TAOUKIS; 2001). Portanto, até o momento, esses modelos cinéticos que podem monitorar a vida útil de cenouras minimamente processadas não estão disponíveis no mercado.

A estimativa da vida útil das cenouras minimamente processadas depende fortemente da qualidade sensorial, assim como da avaliação do crescimento microbológico e das alterações físicas e químicas ocorridas durante a sua decomposição (CONDURSO et al., 2020; LAVELLI et al., 2006). Enquanto o fim da vida útil sensorial depende do escore médio das propriedades individuais que aceitará ou rejeitará a amostra de alimentos para consumo, um limite microbiano máximo permitido define o fim da vida útil microbiana de um produto alimentício (JACXSENS; DEVLIEGHERE; DEBEVERE, 2002).

Neste estudo, devido os critérios de contingenciamento pelo cenário de pandemia do Coronavírus, a avaliação sensorial foi realizada através de uma nova metodologia desenvolvida para minimizar os riscos de contaminação entre os julgadores, o Perfil Flash (PF) *in home*. Este método é flexível e fornece um acesso rápido ao posicionamento sensorial de um conjunto de produtos. Para economizar tempo, as fases de familiarização com o produto, a criação e a classificação dos atributos são integradas em uma única sessão, que permite que cada julgador utilize sua própria lista de atributo (DELARUE; SIEFFERMANN, 2004). As restrições demoradas relacionadas à busca do consenso e do alinhamento conceitual não são utilizadas, tornando o método mais atraente porque não exige etapa de treinamento e pode ser realizado em sessões individuais (DAIROU; SIEFFERMANN, 2002; LIU et al., 2018).

Esta pesquisa teve por objetivo avaliar a melhoria do procedimento de desinfecção das cenouras minimamente processadas através do uso de cloro e ozônio. E partir de então, realizar um teste de vida útil sensorial através do uso da metodologia de Perfil flash *in home*. Por fim, este estudo teve a proposta validar o uso de um ITT enzimático, através do estudo

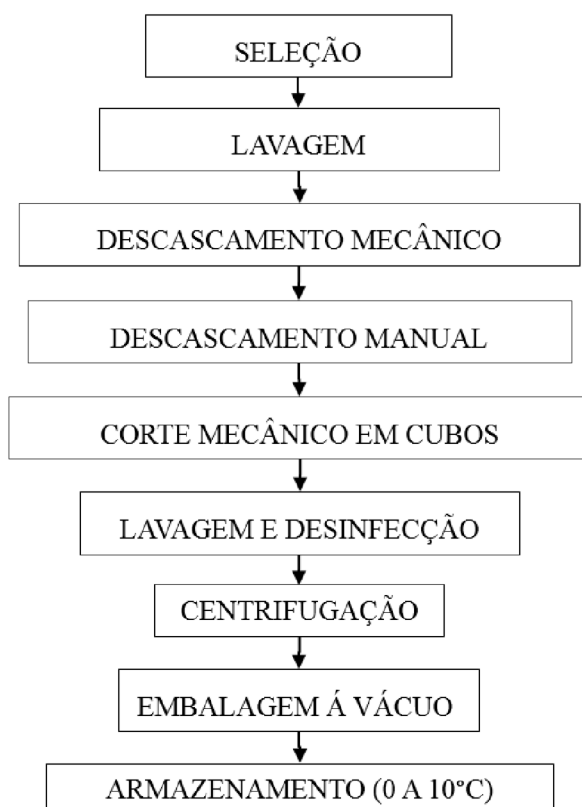
cinético da resposta do ITT e da modelagem de vida de prateleira de cenouras em cubos a partir das análises físico-químicas e microbiológicas, a fim de selecionar os ITTs apropriados para monitorar e gerenciar a distribuição da cadeia de frio.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

As cenouras minimamente processadas cortadas em cubos foram produzidas por uma empresa, localizada na cidade de Rio Grande, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. As cenouras foram produzidas de acordo com as normas de Boas Práticas de Fabricação da Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002 (BRASIL, 2002). As seguintes etapas envolvidas no processo de produção estão descritas no fluxograma da Figura 1.

Figura 1 - Fluxograma de produção de cenoura minimamente processada em cubos



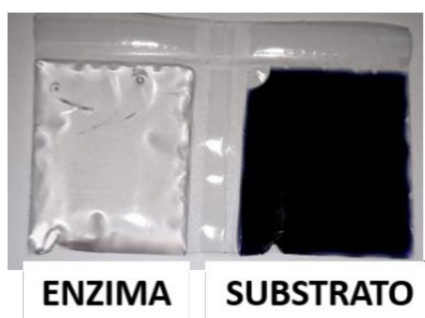
As cenouras (*Daucus carota*) foram armazenadas em caixas vazadas à temperatura ambiente (25°C) após a chegarem na indústria. Após as cenouras passaram por uma seleção manual com o descarte das cenouras rachadas ou com defeitos, seguida de uma pré-lavagem

com água corrente para remover as sujidades da superfície. Então, as cenouras foram descascadas pelo método de abrasão em um descascador (Modelo DL 10, SC, Brasil), e após passaram por um segundo descascamento manual com auxílio de facas. Logo, foi realizado o corte mecânico em cubos (Incalfer, SP, Brasil) e então seguiram para a desinfecção das matérias-primas. As cenouras foram retiradas dos recipientes, o excesso de água foi drenado por centrifugação (Incalfer CE 350, SP, Brasil), posteriormente foram embalados a vácuo (Selovac 300 B, SP, Brasil) em sacos de plástico do tipo BOPP/PEBD (polipropileno biorientado com polietileno de baixa densidade) em pacotes de 200 g de cenouras em cubos. Armazenadas em câmara de refrigeração a 4°C.

2.2 CARACTERIZAÇÃO DO PROTÓTIPO ITT ENZIMÁTICO

O protótipo de ITT foi baseado no método empregado por Brizio; Prentice (2015), com adaptação. O conceito do novo protótipo indicador de tempo e temperatura foi elaborar uma etiqueta compartimentalizada, separando a solução de amido-iodo da solução enzimática, conforme Figura 2. A solução enzimática líquida foi realizada com enzima diluída em tampão TRIS (pH 8,0) em diferentes concentrações (0,2; 0,6; 1; 2; 3; 4; 5; 6 % (v/v)) de enzima e foi adicionado 3 % (p/v) de sorbato de potássio. A solução de amido solúvel foi previamente gelatinizada (80 °C por 5 min) e após arrefecimento foi misturada com a solução de I₂ na proporção de 1:12,5 $V_{\text{iodo}}/V_{\text{amido}}$, na concentração de 0,6 % (p/v), tornando a mistura azul intensa. As soluções foram homogeneizadas e 2 mL de cada solução foi envasada em cada compartimento em embalagem plástica (4x6 cm) de filme coextrusado de poliamida e polipropileno com selagem interna de fácil ruptura. Os protótipos nesta configuração foram armazenados até o momento do uso.

Figura 2 - Protótipo de ITT enzimático líquido compartimentalizado



2.3 DESINFECÇÃO DE CENOURAS EM CUBOS COM CLORO E OZÔNIO

Na desinfecção das cenouras em cubos foram realizados os experimentos para avaliar o potencial do uso de cloro e de ozônio. O cloro foi aplicado nas concentrações de 50, 100 e 200 ppm aplicados por 30 min por imersão. No tratamento com o ozônio, foi utilizado um gerador de ozônio (Ozonar, RS, Brasil). A determinação do tempo e as concentrações de ozônio para os testes foi baseada na metodologia de Patil et al. (2010), variando as concentrações de 0,9, 1,8 e 5,4 mg/mL/min e nos tempos de 5, 10 e 30 min. Também foi realizado o tratamento controle sem uso de cloro ou ozônio.

Para avaliar a eficiência da desinfecção foram realizadas análises microbiológicas de psicotróficas e coliformes totais conforme metodologia descrita pela American Public Health Association (APHA, 2001), avaliando as amostras no 1º e 5º dia de vida útil das cenouras em cubos embaladas a vácuo na temperatura de 4 °C. Todas as análises foram realizadas em duplicata e os resultados foram expressos como unidade formadora de colônias por g (log UFC g⁻¹).

2.4 ESTIMATIVA DA VIDA ÚTIL DE CENOURAS MINIMAMENTE PROCESSADAS EM CUBOS ATRAVÉS DA METODOLOGIA SENSORIAL DE PERFIL FLASH IN HOME

Devido ao cenário mundial atual da pandemia e aos critérios de contingenciamento da FURG – EQA, não foi possível a utilização do laboratório de análise sensorial para realização da pesquisa. A partir disso, optou-se por utilizar uma nova metodologia de análise sensorial que dispõe de medidas de segurança específicas para combate aos riscos de contaminação do coronavírus (COVID-19). A análise sensorial do Perfil Flash (PF) *in home* para avaliar a vida útil de cenouras em cubos foi baseada na metodologia de Dairou e Sieffermann (2002); Delarue e Sieffermann (2004), com adaptações.

Primeiramente, foi realizada entrevista de recrutamento (Apêndice I), sendo selecionados 7 julgadores (GACULA; RUTENBECK, 2006; KING; ARENTS; MOREAU, 1995), com idades entre 18 e 60 anos, de ambos os sexos, com experiência em análise sensorial e habilidade para gerar atributos discriminativos e descritivos.

A análise sensorial foi aplicada em casa (*in home*). Cada avaliador recebeu um kit contendo: as Instruções Gerais (Apêndice II), o Protocolo de Segurança (Apêndice III), os

Protocolos para a Análise Sensorial (Apêndice IV e V), o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Apêndice VI) e as amostras.

A análise sensorial ocorreu em duas sessões, realizadas com data e horário marcado, utilizando vídeo chamada com câmeras abertas para observação e orientação das análises. Ressaltando que, não foi realizada gravação de voz e imagem.

Na sessão 1, os participantes foram orientados a ler com atenção o protocolo para a Análise Sensorial – sessão 1 (Apêndice IV). Os participantes receberam 4 amostras de cenoura em cubos embaladas a vácuo com diferentes dias de vida útil (1, 5, 7 e 9 dias) de um mesmo lote. A partir de então, eles foram solicitados a observar e manipular as amostras por um tempo livre, e após, descrever todas as diferenças que perceberam em relação aos atributos não-hedônicos para aparência, odor e textura. Também, foi entregue aos participantes uma lista pré-existent de atributos, que teve o intuito de auxiliar os julgadores a encontrar palavras que correspondam às suas sensações a partir de cada atributo (ver exemplo na Tabela 1- Apêndice IV).

No final da sessão, os participantes foram solicitados a compartilhar os termos descritivos gerados na avaliação do produto. O pesquisador responsável coletou todos os termos gerados pelos painelistas e os reuniu em uma lista comum. Os termos nessa lista foram organizados de acordo com sua modalidade sensorial correspondente (aparência, odor e textura) e classificados em ordem alfabética. A lista compilada foi então fornecida aos participantes antes da sessão 2, junto com sua própria lista inicial, a fim de ajudá-los a encontrar atributos que possam ter sido negligenciados ou nomeados com dificuldade.

Para início da sessão 2, os participantes foram orientados a ler com atenção os protocolos para a Análise Sensorial - sessão 2 (Apêndice V). Os participantes receberam novamente, 4 amostras de cenoura em cubos embaladas a vácuo com diferentes dias de vida útil (1, 5, 7 e 9 dias) de um mesmo lote. Os julgadores avaliaram as amostras individualmente para todos os atributos descritos na lista, de acordo com sua modalidade sensorial correspondente (aparência, odor e textura), classificando em escala ordinal, da sensação menos intensa à mais intensa. Por exemplo, o produto com menor intensidade recebe uma pontuação de 1, e então a pontuação é aumentada de acordo com a ordem de classificação de cada produto. Para melhor compreensão dos julgadores, foi fornecido um exemplo impresso, junto ao formulário para descrever as classificações de cada descritivo dos respectivos atributos (Figura 2 - Apêndice 4).

A análise de dados foi baseada na metodologia de Delarue (2015). Como a avaliação foi realizada como ordem de classificação, a primeira etapa no tratamento de dados

foi transferir o ranking de posições para as pontuações. Exemplo, o produto com menor intensidade recebeu pontuação 1, e foi é aumentada de acordo com a ordem de classificação de cada produto. Desta forma, os números de classificação irão subindo de acordo com o aumento do sensorial (posição de classificação) para cada atributo. Uma vez que os valores de classificação mais elevados corresponderam às maiores intensidades sensoriais percebidas. Em caso de empate, a classificação média é dada a todas as amostras empatadas. Os dados de classificação foram de interpretação na análise univariada. As pontuações foram então preenchidas em uma tabela com a análise de dados através da ANOVA, com nível de significância de 5 %.

2.5 VALIDAÇÃO O USO DO PROTÓTIPO DE ITT ENZIMÁTICO EM CENOURAS MINIMAMENTE PROCESSADAS EM CUBOS

2.5.1 Estudo cinético da qualidade de cenouras minimamente processadas em cubos

O estudo cinético foi realizado a partir do método de Taoukis e Labuza (1989). Os parâmetros de qualidade microbiológicos investigados foram a contagem de bactérias psicotróficas, bactérias lácticas, coliformes totais e bolores e leveduras, além de análises de pH e firmeza.

As análises microbiológicas foram realizadas conforme metodologia oficial do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2003) e American Public Health Association (APHA, 2001). Todas as análises foram realizadas em duplicata e os resultados foram expressos como unidade formadora de colônias por g ($\log \text{UFC g}^{-1}$).

As determinação dos valores de pH foram realizadas utilizando o pHmetro de bancada (QUIMIS Q400AS, São Paulo, Brasil), segundo a metodologia oficial AOAC (1995). A análise de firmeza foi realizada utilizando analisador de textura TA- XT2 Modelo Plus (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido) e probe HBS-5S em temperatura ambiente. Durante o teste, o probe foi programada para se movimentar em altura de 10 mm e velocidade de 10 mm/s. Todas as análises foram realizadas em quintuplicata e os resultados foram expressos como unidade de pressão kgf/cm^2 . Estes indicadores de qualidade foram modelados conforme Equação 1, sob as temperaturas de armazenamento (4, 10 e 15°C) durante o 1, 3, 5, 7 e 9º dia de vida útil. A análise foi realizada apenas em 3 temperaturas devido ao número de incubadoras disponíveis no laboratório.

$$f(A) = kt = k_{ref} \exp \left[\frac{-E_{A \text{ alimento}}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] t \quad (1)$$

2.5.2 Estudo cinético do Protótipo ITT enzimático

O ITT ativado (mistura dos reagentes, iniciando a reação colorimétrica) foi armazenado em uma incubadora de alta precisão (Marconi, MA 415/S, São Paulo, Brasil). Diariamente a descoloração dos diferentes protótipos de ITT (0,2; 0,6; 1; 2; 3; 4; 5; 6% de amilase) armazenados nas temperaturas de 4 (situação ideal), 10, 15, 25, 35 (situações de abuso) $\pm 0,5$ °C foi avaliada visualmente e mensurada através da utilização de colorímetro (Modelo Chroma Meter CR-400/410, Konica Minolta, Osaka, Japão), mediante o sistema *CIELab* – *Comission Internationale de L'Eclairege* (iluminante D65).

As mudanças de cor dos ITTs (ΔE) são realizadas a partir da leitura dos valores de L (luminosidade), a (verde a vermelho) e b (azul a amarelo) podem ser obtidos, onde L_0 , a_0 e b_0 são os valores iniciais de L, a e b, na fórmula para cálculo de ΔE , descrita na equação 2.

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

As análises foram interrompidas quando nenhuma mudança de cor azul adicional poderia ser medida na etiqueta. O fim da vida-útil dos protótipos foi definido como o tempo que leva a cor azul escura do ITT chegar a uma condição incolor ($\Delta E^* = 58,0$).

As características da resposta do ITT enzimático foram analisadas com base na expressão de Arrhenius. De acordo com método de Taoukis; Labuza (1989), as variáveis de resposta de cor dos ITT foram modeladas através da cinética de ordem zero conforme a Equação 3.

$$F(x) = K \cdot t \quad (3)$$

Onde: F(x) representa a mudança de cor (ΔE), K é a constante cinética de velocidade da reação, e t expressa o tempo de armazenamento (horas).

A Equação 4 determina o valor de Energia de ativação (E_a) através da correlação entre $\ln K$ versus $1/T$, sob diferentes temperaturas de armazenamento.

$$\ln K = \frac{E_a}{R \cdot T} + \ln A \quad (4)$$

Onde: T é a temperatura absoluta (K), E_a é a energia de ativação ($\text{kJ mol}^{-1} \cdot \text{K}$), R é a constante universal de gás ($0,0083 \text{ kJ mol}^{-1} \cdot \text{K}$), e A é fator pré-exponencial (Taoukis & Labuza, 1989).

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise microbiológica utilizou-se amostras em duplicata para cada tratamento. Para as análises de firmeza as amostras foram avaliadas em quintuplicata. Para demais análises foram utilizadas amostras em triplicatas para cada temperatura e em cada tempo de amostragem.

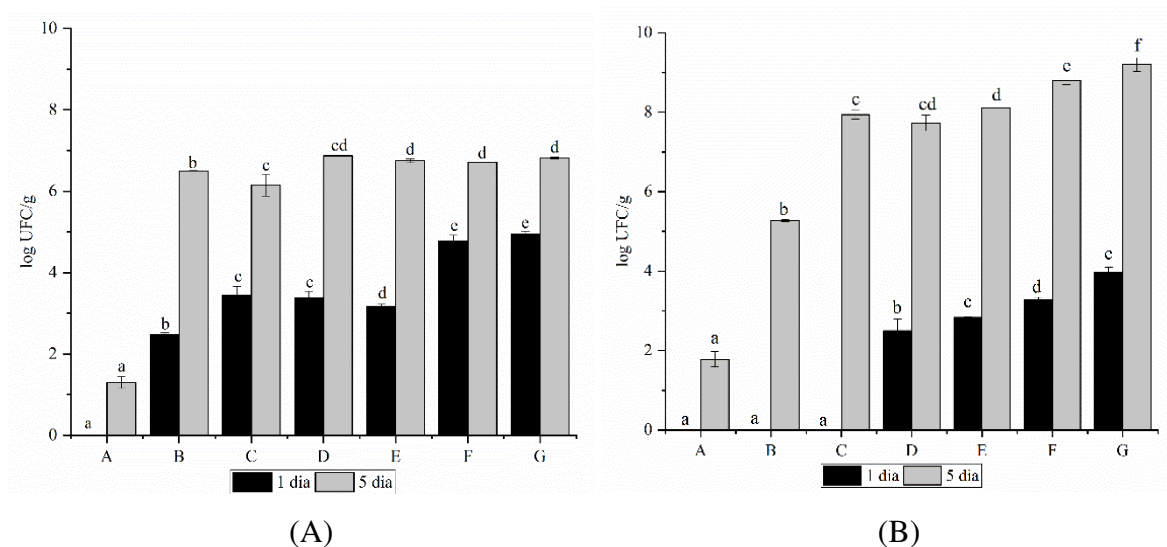
Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey a 5% de significância, utilizando o programa *Statistica 5.0* (Statsoft, USA). Os parâmetros cinéticos de Arrhenius foram avaliados por regressão linear e desvio padrão utilizando o programa Microsoft Excel 2019.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DESINFECÇÃO DE CENOURAS MINIMAMENTE PROCESSADAS EM CUBOS UTILIZANDO CLORO E OZÔNIO

Para avaliar o método mais eficiente de sanitização foram realizadas as análises de bactérias psicotróficas e coliformes no 1º e 5º dia de vida útil nas cenouras em cubos, conforme Figura 3.

Figura 3 - Alterações (log UFC/g) na contagem de psicotróficas (A), coliformes (B) para os tratamentos com cloro e ozônio



A: cloro 200 ppm, B: cloro 100 ppm, C: cloro 50 ppm, D: ozônio (18 ppm) - 30 min, E: ozônio (18 ppm) - 15 min, F: ozônio (18 ppm) - 5 min e G: controle

As amostras sem o tratamento de desinfecção (amostra G) apresentaram o maior crescimento microbiano, tanto para as bactérias psicotróficas ($3,97 \log \text{UFC g}^{-1}$) quanto para coliformes ($4,95 \log \text{UFC g}^{-1}$). À medida em que as cenouras em cubos recebem tratamento com sanitizante, o crescimento microbiano é reduzido, sendo que as amostras tratadas com cloro apresentaram maior eficiência do que com ozônio.

No produto sanitizado com cloro (A, B e C) houve a redução as bactérias psicotróficas com 100% de eficiência no primeiro dia de análise, para todas as concentrações estudadas. No entanto, somente o tratamento com 200 ppm de cloro foi capaz de eliminar 100% de coliformes fecais. Nos demais tratamentos foram encontradas contaminação por coliformes com valores superiores a $2 \log \text{UFC g}^{-1}$, ou seja, acima dos preconizados na legislação brasileira para hortaliças processadas (BRASIL, 2001).

Coliformes podem indicar falhas no processo de higienização, pois estão associados à contaminação fecal e potencial crescimento de patógenos entéricos (AKOACHERE; TATSINKOU; NKENGFAK, 2018; PAULA et al., 2009). A contaminação da matéria prima, assim como ao excesso de manipulação, pode aumentar da possibilidade de contaminação por micro-organismos patogênicos (AGUILA et al., 2006).

Com relação ao tratamento com ozônio, observou-se que quanto maior o tempo de exposição do ozônio nas cenouras (30 min) maior foi a redução da carga microbiana para os dois micro-organismos testados. No 5º dia de avaliação o crescimento de bactérias psicotróficas e coliformes em todos os tratamentos com ozônio foi elevado. Segundo Oliveira et al. (2011) altas contagens de bactérias psicotróficas sugerem curto prazo de validade para o produto e má qualidade higiênica, provavelmente devido ao uso de matéria-prima altamente contaminada, falta de boas práticas higiênicas durante o processamento e temperatura inadequada durante armazenamento.

De acordo com os resultados de Renumarn et al. (2014), a decomposição de ozônio e a inativação de micro-organismos em vegetais frescos ocorre acima de 15 min em concentrações superiores a 1,5 ppm. Segundo Brodowska et al. (2017) a eficácia do tratamento de ozônio na inativação microbiana depende de vários fatores, como tipo de produto e micro-organismo, estado fisiológico de base de células bacterianas e concentrações de ozônio utilizados. Para este estudo, como a carga microbiana inicial foi alta, o tratamento do ozônio não foi o método mais eficaz para descontaminação, provavelmente sendo necessário o uso de maior concentração de ozônio inicial para inativação dos micro-organismos. Desta forma, foi

escolhido como método mais eficiente para descontaminação das cenouras em cubos, o tratamento com cloro 200 ppm.

3.2 ESTIMATIVA DA VIDA ÚTIL DA CENOURA MINIMAMENTE PROCESSADA ATRAVÉS DO USO DA METODOLOGIA SENSORIAL DE PERFIL FLASH IN HOME

Os termos abordados foram resumidos, e na segunda sessão, e a partir dos resultados da ANOVA, ao nível de significância de $p < 0,05$ entre as amostras, foram selecionados 7 atributos sensoriais (Tabela 1).

Tabela 1 - Escore médio para os atributos sensoriais utilizados na avaliação da cenoura minimamente processada em cubos

Atributos sensoriais	1º dia	5º dia	7º dia	9º dia
Presença de água na embalagem	2,22±0,74 ^{aA}	2,56±1,15 ^{aA}	2,86±0,91 ^{aA}	9,00±3,12 ^{bA}
Presença de ar na embalagem	2,08±0,42 ^{aA}	3,86±1,3 ^{aA}	6,46±2,26 ^{aAB}	11,28±2,11 ^{bA}
Cor amarronzada	1,52±1,07 ^{aA}	2,74±0,83 ^{aA}	3,4±0,60 ^{aAB}	8,28±3,38 ^{bA}
Cor esbranquiçada	2,96±1,61 ^{aA}	7,24±4,79 ^{aB}	6,98±4,74 ^{aAB}	6,92±3,62 ^{aB}
Odor ácido	1,40±0,80 ^{aA}	4,98±1,82 ^{aA}	7,54±1,70 ^{abC}	11,76±1,82 ^{bA}
Odor amoniacal	1,42±0,94 ^{aA}	3,46±1,95 ^{aA}	7,20±1,80 ^{abAB}	11,54±2,21 ^{bA}
Maciez	1,92±1,71 ^{aA}	4,32±1,22 ^{aA}	4,42±1,59 ^{aAB}	10,32±2,46 ^{bA}
Textura pastosa	1,26±1,22 ^{aA}	2,96±1,95 ^{aA}	4,62±3,34 ^{aAB}	10,48±1,99 ^{bA}

Letras minúsculas iguais para o mesmo atributo indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$); (Média ± desvio-padrão).

Letras maiúsculas iguais para o mesmo dia indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$); (Média ± desvio-padrão)

A partir da avaliação de cada julgador foi possível verificar um aumento dos escores com o passar dos dias. Na avaliação da aparência das cenouras em cubos os atributos, “presença de água, ar e cor amarronzada” apresentaram diferença significativa do 7º para o 9º dia. Entretanto, o atributo “cor esbranquiçada” foi o único atributo sensorial que não apresentou diferença significativa durante a avaliação da vida útil. Acredita-se que o sistema de vácuo utilizado como forma de acondicionamento das cenouras em cubos mostrou um efeito benéfico neste sentido. Sendo este, o mesmo resultado encontrado por Rocha, Mota e Morais (2007).

Junto com a aparência, a textura é um atributo importante na qualidade de cenouras recém-cortadas para aceitação dos consumidores (MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ; AMODIO; COLELLI, 2016). Na análise sensorial, houve percepção da perda de maciez, textura pastosa,

odor ácido e amoniacal no 9º dia de vida útil. A cenoura embalada a vácuo desenvolve odores característicos e perde sua firmeza devido ao catabolismo anaeróbico, à alta taxa de respiração e a deterioração microbiológica (BARRY-RYAN; PACUSSI; O'BEIRNE, 2000).

A partir da avaliação sensorial realizada, o tempo estimado de vida útil das cenouras minimamente processadas em cubos foi de 7 dias. De acordo com a análise sensorial, os atributos presença de água, ar, cor amarronzada, odores ácido, amoniacal, maciez e textura pastosa foram determinantes para indicar o fim da vida útil das amostras

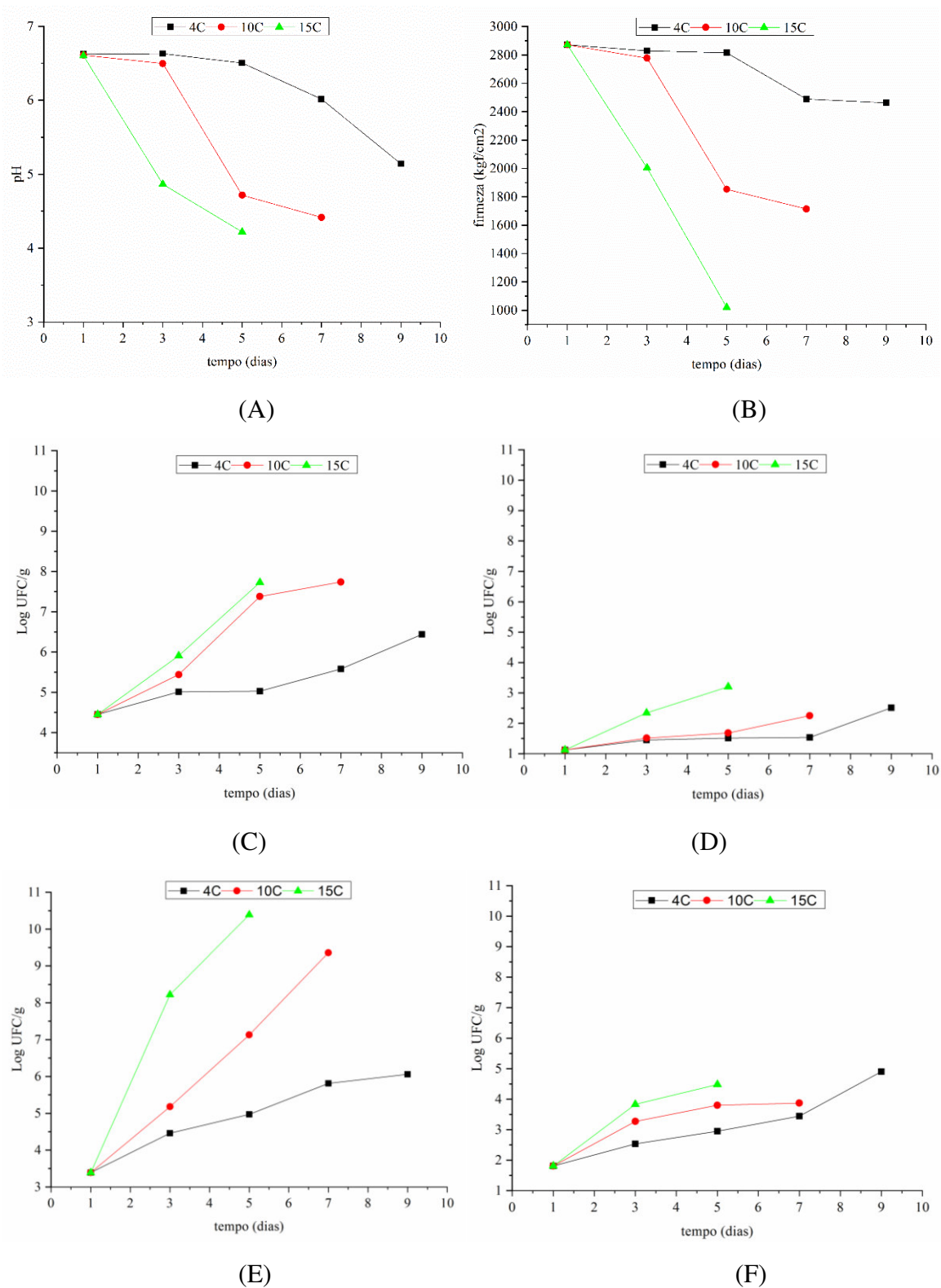
3.3 ESTUDO CINÉTICO DA QUALIDADE DA CENOURA MINIMAMENTE PROCESSADAS EM CUBOS

A avaliação cinética da vida útil da cenoura minimamente processada em cubos foi acompanhada dos indicadores de qualidade: pH, firmeza, psicotróficas, coliformes, bactérias lácticas (BAL) e bolores e leveduras por 9 dias, conforme Figura 4.

Na Figura 4 A, mostra que os valores de pH diminuíram 6,62 para 5,14 com uma queda significativa no 9º dia de armazenamento sob a temperatura de 4°C. Houve queda do pH (abaixo de 5,0) sob as temperaturas de 10 e 15°C, no 5º e 3º dia, respectivamente. De acordo com Barry-Ryan, Pacussi e O'Beirne (2000), ao avaliar cenouras minimamente processadas verificaram que os valores baixos de pH no final da vida útil está relacionado com os menores níveis de O₂ nas embalagens. Além do mais, o baixo valor do pH pode ser proveniente da produção dos ácidos orgânicos produzidos pelas BAL, representando um dos principais mecanismos para a biopreservação dessa bactéria (GÁLVEZ et al., 2010).

E como mostra a Figura 4 E, as BAL foram as espécies bacterianas predominantes na cenoura em cubos embalada a vácuo, a contagem inicial foi de 3,39 para 6,06 log UFC/g no 9º dia de análise a 4 °C, para 9,36 log UFC/g no 7º dia de análise a 10 °C e para 10,39 log UFC/g no 5º dia de análise a 15 °C. A partir dos estudos de Lavelli et al. (2006), ao avaliar cenouras palitos embaladas em filme de PVC armazenadas por 10 dias, as BAL atingiram 6 log UFC/g tanto na temperatura de 4 quanto de 10 °C. Bem como, Barry-Ryan, Pacussi e O'Beirne (2000) ao avaliar cenouras raladas embaladas em baixos níveis de oxigênio, a contagem de BAL aumentaram substancialmente de 3,7 para 9,7 log UFC/g em 10 dias (8 °C). Neste estudo, acredita-se que a embalagem a vácuo contribuiu para o crescimento das BAL.

Figura 4 - Avaliação da vida útil da cenoura minimamente processada em cubos através das mudanças de pH (A), firmeza (B), psicotróficas (C), coliformes (D), BAL (E), bolores e leveduras (F) submetida as temperaturas de 4, 10 e 15°C



Ao longo do período de armazenamento, a firmeza da cenoura minimamente processada em cubos diminuiu de 2.872,19 para 2.327,68 Kgf/cm² (4 °C); para 1.714,32 Kgf/cm² (10 °C) e para 1.019,78 Kgf/cm² (15 °C). Descobertas semelhantes foram relatadas por Rocha, Mota e Moraes (2007) que ao avaliar cenouras armazenadas sob vácuo observaram perdas de 13% de firmeza após 7 dias de armazenamento, assim como Barry-Ryan, Pacussi e O'Beirne (2000) observaram que a firmeza das cenouras raladas diminuía mais rápido conforme o aumento de temperatura. A redução da textura pode ser justificada pelo início as reações enzimáticas, fermentação ácido-lática e alterações fisiológicas como aumento da taxa de respiração e produção de etileno, assim como o crescimento microbiano (CISNEROS-ZEVALLOS; SALTVEIT; KROCHTA, 1995).

A população microbiana das psicotróficas aumentou de 4,45 para 5,91 log UFC/g a 4 °C, para 7,84 log UFC/g a 10 °C e para 8,11 log UFC/g a 15 °C. Rosa (2002) ao analisar as bactérias psicotróficas em cenoura minimamente processada vendida em supermercados, encontrou uma variação de 6 a 9 log UFC/mL. Pilon et al. (2006) relatou que a temperatura de refrigeração abaixo de 7 °C, usada no armazenamento de vegetais minimamente processados, estende à vida útil destes produtos, diminuindo a taxa de crescimento das bactérias psicotróficas.

Os bolores e a leveduras estavam presentes em menor concentração nas cenouras em cubos, apresentando contagem inicial de 1,81 log UFC/g, aumentando para 4,90 log UFC/g no 9º dia (4 °C), 3,87 log UFC/g no 7º dia (10 °C) e 4,48 log UFC/g no 5º dia (15 °C). É possível observar que, a temperatura de refrigeração prolongou a vida útil, diminuindo a velocidade de crescimento da microbiota presente nas cenouras minimamente processadas em cubos.

A avaliação de coliformes fecais foi o indicador de qualidade escolhido para controle higiênico sanitário do processo, apresentando limite máximo de 2 log UFC/g em cenouras processadas (BRASIL, 2001). De acordo com os resultados, as amostras submetidas a 4 °C apresentaram-se dentro do padrão até o 7º dia (1,53 log UFC/g), a 10 °C até o 5º dia (1,68 log UFC/g) e 15 °C somente no 1º dia (1,12 log UFC/g).

O modelo de Arrhenius permitiu estimar a taxa de resposta para cada indicador de qualidade (pH, firmeza, bactérias psicotróficas, coliformes, BAL, bolores e leveduras), a fim de avaliar a vida útil das cenouras em termos de energia de ativação (Ea), conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Efeito dos parâmetros cinéticos de Arrhenius da cenoura minimamente processada

Análises de qualidade	Ea (kJ mol ⁻¹)	R ² *
pH	73,184	0,972
Firmeza (kgf/cm ²)	112,896	0,997
Psicotróficas (log UFC/g)	104,654	0,949
Coliformes (log UFC/g)	75,519	0,828
BAL (log UFC/g)	100,353	0,987
Bolores e leveduras (log UFC/g)	45,004	0,620

*correlação do coeficiente de determinação

De acordo com os resultados, a Ea dos indicadores de qualidade exibiu valores dentro desta faixa (45,004 a 112,896 kJ mol⁻¹) para monitoramento da vida útil das cenouras em cubos. Quando comparado com os valores típicos de Ea para perdas de qualidade alimentar (TAOUKIS; LABUZA, 1989), pode cobrir as perdas ocorridas por oxidação lipídica (41,84 a 104,6 kJ mol⁻¹), perda de nutrientes (83,68 a 125,52 kJ mol⁻¹) e crescimento microbiano (83,68 a 251,04 kJ mol⁻¹).

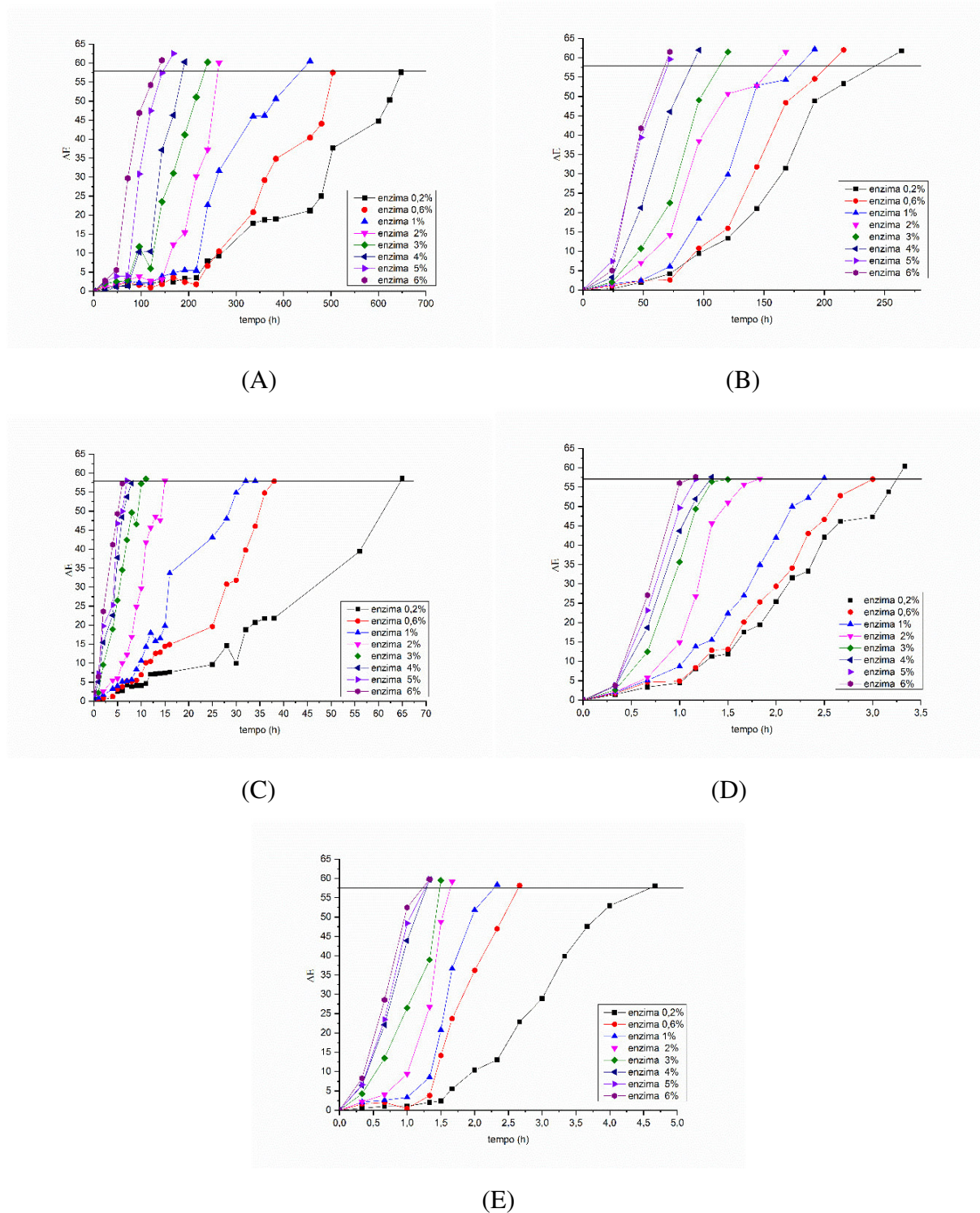
Apesar dos indicadores de qualidade microbiológicos (bactérias psicotróficas, BAL e bolores e leveduras) não apresentarem limite máximo de rejeição definido por lei, observa-se que na temperatura de 4°C, houve aumento significativo no 9º dia de vida útil. Portanto, as análises microbiológicas da cenoura minimamente processada em cubos embalada a vácuo, estimaram tempo de vida útil de 7 dias.

3.4 VALIDAÇÃO DO PROTÓTIPO DE ITT ENZIMÁTICO PARA CENOURAS MINIMAMENTE PROCESSADAS EM CUBOS

A modelagem cinética do protótipo de ITT foi realizado conforme as Equações 2 e 3, baseando-se na medição da mudança de cor (ΔE) dos 8 protótipos de ITT em diferentes concentrações de enzima (0,2 a 6 %) armazenadas em temperaturas de 4 a 35 °C (Figura 5).

Figura 5 - Mudança de cor dos protótipos de ITT submetidas em 4 °C (A), 10 °C (B), 15 °C (C), 25 °C (D), 35 °C (E)

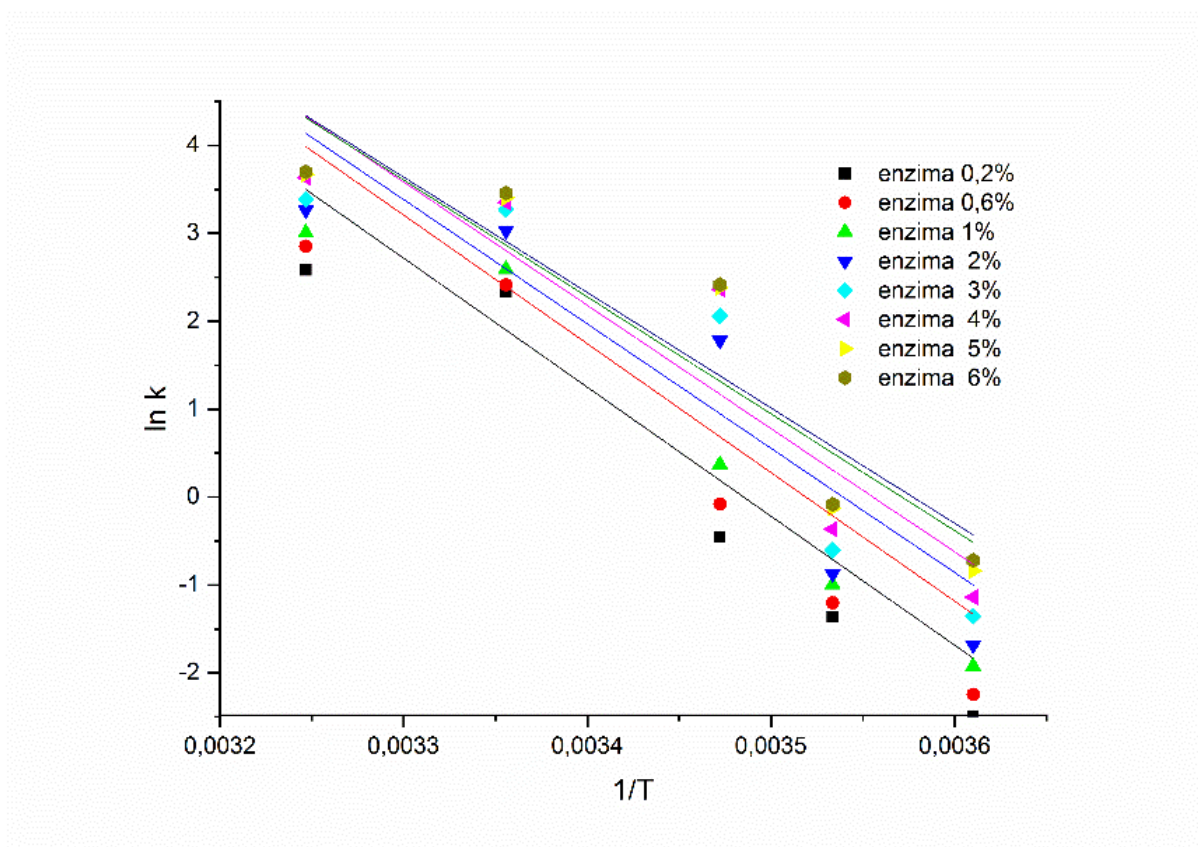
Figura 1



* $\Delta E^* = 58,0$ representa a diferença de cor definida como fim da vida-útil do ITT.

A partir da Equação 4 foi obtido o valor de resposta de cor $F(X)$ para os ITT incubados em diferentes temperaturas (Figura 6). O valor da energia de ativação, os coeficientes de correlação de determinação (R^2) e o tempo de vida útil estão listados na Tabela 4.

Figura 6 - Ln da constante de velocidade de resposta da variação de cor dos ITT com 0,2 a 6% de amilase



As curvas de vida útil do ITT e das amostras de cenoura podem ser combinadas para obter uma correspondência adequada entre a vida útil dos alimentos e o tempo de resposta do rótulo ITT. Isso requer que a cinética de resposta ITT seja semelhante à cinética da perda de qualidade da cenoura em cubos, o que significa valores similares de E_a . O valor E_a para os protótipos de ITTs enzimáticos variou de 108,98 a 126,46 kJ mol^{-1} , apresentando correlações lineares acima de 0,85, indicando precisão no modelo proposto. Todos os protótipos de ITT testados apresentaram maior energia de ativação e o tempo de vida útil quanto menor foi a concentração da enzima utilizada na sua composição.

Tabela 3 - Parâmetros cinéticos dos protótipos de ITT enzimáticos (0,2 a 6%) nas temperaturas 4, 10, 15, 25, 35°C

Protótipos ITTs	Ea (kJ mol ⁻¹)	R ² *	Tempo** (dias)
ITT enzima 0,2%	126,46	0,9461	27
ITT enzima 0,6%	125,61	0,9594	21
ITT enzima 1%	121,83	0,9550	19
ITT enzima 2%	121,54	0,8685	11
ITT enzima 3%	117,38	0,8538	10
ITT enzima 4%	116,40	0,8533	8
ITT enzima 5%	110,39	0,8621	7
ITT enzima 6%	108,98	0,8616	6

*correções de linearidade (correlação do coeficiente de determinação)

** tempo de vida útil a 4°C

Para selecionar a combinação ideal do ITT enzimático, o seu tempo de vida útil deve ser aproximado com o tempo de vida útil do produto. Além do que, a Ea do ITT deve ser aproximadamente igual à Ea do indicador de qualidade responsável pela deterioração cenoura em cubos (MATARAGAS et al., 2018). Se as energias de ativação não forem aproximadamente iguais, a diferença na energia de ativação entre o ITT e o indicador de qualidade deve ser menor ou igual a 10% (TAOUKIS; LABUZA, 1989).

Desta forma, os protótipos de ITT nas concentrações de enzima 4 %, 5 % e 6 % (116,40; 110,39 e 108,98 kJ mol⁻¹) apresentaram menor diferença, quando comparado com a Ea dos indicadores de qualidade: firmeza (112,896 kJ mol⁻¹, R² = 0,997), bactérias psicotróficas (104,654 kJ mol⁻¹, R² = 0,949) e BAL (100,353 kJ mol⁻¹, R² = 0,987). Portanto, este estudo comprova que o protótipo de ITT mais indicado para aplicar nas cenouras minimamente processadas em cubos á vácuo é o que contém 5 % de enzima., tempo de vida útil de 7 dias, semelhante o tempo de vida útil estimados pelo método de análise sensorial de perfil flash.

4 CONCLUSÃO

O método mais eficiente para descontaminação das cenouras minimamente processadas em cubos foi o tratamento com cloro 200 ppm por 30 min, reduzindo as bactérias psicotróficas e coliformes com 100% de eficiência.

O teste de vida útil sensorial Perfil flash *in home* estimou o tempo de vida útil das cenouras em cubos em 7 dias, sendo que os atributos determinantes foram presença de água, ar, cor amarronzada, odores ácido, amoniacal, maciez e textura pastosa.

Os indicadores de qualidade microbiológicos (bactérias psicotróficas, BAL e bolores e leveduras) mostraram que na temperatura de 4°C, as cenouras em cubos embaladas a vácuo, tiveram tempo de vida útil das cenouras em cubos de 7 dias.

O modelo de Arrhenius permitiu estimar a taxa de resposta para cada indicador de qualidade analisado, exibindo valores na faixa de 45,004 a 112,896 kJ mol⁻¹ para monitoramento da vida útil das cenouras em cubos. Sendo que, o protótipo de ITT contendo 5% de amilase foi o melhor para aplicação nas amostras armazenadas a 4°C, apresentando menor diferença na Ea e mesmo tempo de vida útil (7 dias).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILA, J. S. DEL; SASAKI, F. F.; HEIFFIG, L. S.; ONGARELLI, M. DAS G.; GALLO, C. R.; JACOMINO, A. P.; KLUGE, R. A. Determinação da microflora em rabanetes minimamente processados. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 75–78, 2006.
- AKOACHERE, J. F. T. K.; TATSINKOU, B. F.; NKENGFAK, J. M. Bacterial and parasitic contaminants of salad vegetables sold in markets in Fako Division, Cameroon and evaluation of hygiene and handling practices of vendors. **BMC Research Notes**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2018.
- ALBRECHT, A.; IBALD, R.; RAAB, V.; REICHSTEIN, W.; HAARER, D.; KREYENSCHMIDT, J. Implementation of Time Temperature Indicators to Improve Temperature Monitoring and Support Dynamic Shelf Life in Meat Supply Chains. **Journal of Packaging Technology and Research**, v. 4, n. 1, p. 23–32, 2020.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists (ed. 16), **Official Methods of Analysis**. Washington, DC, USA, 1995.
- APHA. **American Public Health Association**. Washington, DC, USA, 2001.
- BARRY-RYAN, C.; PACUSSI, J. M.; O'BEIRNE, D. Quality of shredded carrots as affected by packaging film and storage temperature. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 4, p. 726–730, 2000.
- BOTONDI, R.; BARONE, M.; GRASSO, C. A review into the effectiveness of ozone technology for improving the safety and preserving the quality of fresh-cut fruits and vegetables. **Foods**, v. 10, n. 4, 2021.
- BRASIL. Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para o controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, 2003.
- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, seção I, p. 45-53, 2001.
- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos e a lista de verificação das boas práticas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2002.
- BRASIL. Portaria SES Nº 90/2017. Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação e de Procedimentos Operacionais Padronizados para a industrialização de frutas e vegetais minimamente processados e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de frutas e vegetais minimamente processados, **Secretaria da saúde do governo estado do RS**, p. 10, 2017.
- BRIZIO, A. P. D. R.; PRENTICE, C. Development of an intelligent enzyme indicator for dynamic monitoring of the shelf-life of food products. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 30, p. 208–217, 2015.
- BRODOWSKA, A. J.; NOWAK, A.; KONDRATIUK-JANYSKA, A.; PIATKOWSKI, M.; SMIGIELSKI, K. Modelling the Ozone-Based Treatments for Inactivation of

Microorganisms. **International Journal of Environmental Research and public health**, v. 14, p. 15, 2017.

CHEN, Y.; SONG, Y.; ZHANG, Z.; CHEN, Y.; DENG, Q.; WANG, S. Thiol-Functionalized Covalent Organic Frameworks as Thermal History Indicator for Temperature and Time History Monitoring. **Advanced Functional Materials**, v. 31, n. 41, p. 1–7, 2021.

CISNEROS-ZEVALLOS, L.; SALTVEIT, M. E.; KROCHTA, J. M. Mechanism of Surface White Discoloration of Peeled (Minimally Processed) Carrots During Storage. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 2, p. 320–323, 1995.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Boletim Hortigranjeiro**, v. 6, p. 72, 2020.

CONDURSO, C.; CINCOTTA, F.; TRIPODI, G.; MERLINO, M.; GIARRATANA, F.; VERZERA, A. A new approach for the shelf-life definition of minimally processed carrots. **Postharvest Biology and Technology**, v. 163, p. 1–16, 2020.

DAIROU, V.; SIEFFERMANN, J. M. A comparison of 14 jams characterized by conventional profile and a quick original method, the Flash Profile. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 2, p. 826–834, 2002.

DELARUE, J. Flash Profile, its evolution and uses in sensory and consumer science. In: **Rapid Sensory Profiling Techniques and Related Methods: Applications in New Product Development and Consumer Research**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, p. 121–151, 2015.

DELARUE, J.; SIEFFERMANN, J. M. Sensory mapping using Flash profile. Comparison with a conventional descriptive method for the evaluation of the flavour of fruit dairy products. **Food Quality and Preference**, v. 15, n. 4, p. 383–392, 2004.

FAI, A. E. C.; ALVES DE SOUZA, M. R.; DE BARROS, S. T.; BRUNO, N. V.; FERREIRA, M. S. L.; GONÇALVES, T. C. B. D. A.; BRANCO DE ANDRADE, É. C. Development and evaluation of biodegradable films and coatings obtained from fruit and vegetable residues applied to fresh-cut carrot (*Daucus carota* L.). **Postharvest Biology and Technology**, v. 112, p. 194–204, 2016.

GACULA, M.; RUTENBECK, S. Sample size in consumer test and descriptive analysis. **Journal of Sensory Studies**, v. 21, n. 2, p. 129–145, 2006.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; BENOMAR, N.; LUCAS, R. Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 142–148, 2010.

GIANNOGLOU, M.; TOULI, A.; PLATAKOU, E.; TSIRONI, T.; TAOUKIS, P. S. Predictive modeling and selection of TTI smart labels for monitoring the quality and shelf-life of frozen seafood. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 26, p. 294–301, 2014.

JACXSENS, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. Predictive modelling for packaging design : equilibrium modified atmosphere packages of fresh-cut vegetables subjected to a simulated distribution chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 331–341, 2002.

KING, B. M.; ARENTS, P.; MOREAU, N. Cost/efficiency evaluation of descriptive analysis panels - I. Panel size. **Food Quality and Preference**, v. 6, n. 4, p. 245–261, 1995.

- LAVELLI, V.; PAGLIARINI, E.; AMBROSOLI, R.; MINATI, J. L.; ZANONI, B. Physicochemical, microbial, and sensory parameters as indices to evaluate the quality of minimally-processed carrots. **Postharvest Biology and Technology**, v. 40, n. 1, p. 34–40, 2006.
- LIU, J.; BREDIE, W. L. P.; SHERMAN, E.; HARBERTSON, J. F.; HEYMANN, H. Comparison of rapid descriptive sensory methodologies: Free-Choice Profiling, Flash Profile and modified Flash Profile. **Food Research International**, v. 106, p. 892–900, 2018.
- LOISEL, J.; DURET, S.; CORNU, A.; CAGNON, D.; TARDET, M.; DERENS-BERTHEAU, E.; LAGUERRE, O. Trends in Food Science & Technology Cold chain break detection and analysis: Can machine learning help? **Trends in Food Science & Technology**, v. 112, p. 391–399, 2021.
- MAO, L.; MHASKE, P.; ZING, X.; KASAPIS, S.; MAJZOBI, M.; FARAHNAKY, A. Cold plasma: Microbial inactivation and effects on quality attributes of fresh and minimally processed fruits and Ready-To-Eat vegetables. **Trends in Food Science and Technology**, v. 116, p. 146–175, 2021.
- MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, G. B.; AMODIO, M. L.; COLELLI, G. Potential use of microwave treatment on fresh-cut carrots: Physical, chemical and microbiological aspects. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 6, p. 2063–2072, 2016.
- MATARAGAS, M.; BIKOULI, V. C.; KORRE, M.; STERIOTI, A.; SKANDAMIS, P. N. Development of a microbial Time Temperature Indicator for monitoring the shelf life of meat. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, p. 47, 2018.
- OLIVEIRA, M. A.; SOUZA, V. M.; BERGAMINI, A. M. M.; MARTINIS, E. C. P. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. **Food Control**, v. 22, n. 8, p. 1400–1403, 2011.
- PATIL, S.; VALDRAMIDIS, V. P.; CULLEN, P. J.; FRIAS, J.; BOURKE, P. Inactivation of *Escherichia coli* by ozone treatment of apple juice at different pH levels. **Food Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 835–840, 2010.
- PAULA, N. R. F.; BOAS, E. V.; RODRIGUES, L. J.; CARVALHO, R. A.; PICCOLI, R. H. Qualidade de produtos minimamente processados e comercializados em gôndolas de supermercados nas cidades de Lavras – MG, Brasília – DF e São Paulo – SP. **Ciência agrotécnica de Lavras**, v. 33, n. 1, p. 219–227, 2009.
- PAULIKIENĖ, S.; VENSLAUSKAS, K.; RAILA, A.; ŽVIRDAUSKIENĖ, R.; NAUJOKIENĖ, V. The influence of ozone technology on reduction of carrot loss and environmental IMPACT. **Journal of Cleaner Production**, v. 244, 2020.
- PILON, L.; OETTERER, M.; GALLO, C. R.; SPOTO, M. H. F. Shelf life of minimally processed carrot and green pepper. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 150–158, 2006.
- RENUMARN, P.; SRILAONG, V.; UTHAIRATANAKIJ, A.; KANLAYANARAT, S.; JITAREERAT, P. The effects of immersion methods and concentration of ozonated water on the microbial counts and the quality and sensory attributes of fresh-cut broccoli. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 2, p. 533–539, 2014.

ROCHA, A. M. C. N.; MOTA, C. C. A. R.; MORAIS, A. M. M. B. Physico-chemical qualities of minimally processed carrot stored under vacuum. **Journal of Foodservice**, v. 18, n. 1, p. 23–30, 2007.

ROSA, O. O. **Microbiota associada a produtos hortícolas minimamente processados comercializados em supermercados**. [s.l.] Universidade Federal de Lavras. 120 p., 2002.

SOUZA, L. P.; FARONI, L. R. D. A.; HELENO, F. F.; CECON, P. R.; GONÇALVES, T. D. C.; SILVA, G. J. DA; PRATES, L. H. F. Effects of ozone treatment on postharvest carrot quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 53–60, 2018.

TAOUKIS, P. S. Modelling the use of time-temperature indicators in distribution and stock rotation. In: **Food Process Modelling**. Woodhead P ed. Cambridge: [s.n.]. p. 402–428, 2001.

TAOUKIS, P. S.; LABUZA, T. P. Applicability of Time-Temperature Indicators as Shelf Life Monitors of Food Products. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 4, p. 783–788, 1989.

TSIRONI, T.; RONNOW, P.; GIANNOGLOU, M.; TAOUKIS, P. Developing suitable smart TTI labels to match specific monitoring requirements: The case of *Vibrio* spp. growth during transportation of oysters. **Food Control**, v. 73, p. 51–56, 2017.

APENDICE I - ENTREVISTA PARA RECRUTAMENTO DOS PARTICIPANTES PARA A ANÁLISE SENSORIAL**IDENTIFICAÇÃO**

Nome: _____ Sexo: () M () F
E-mail: _____ Telefone: _____
Data de nascimento: _____

SAÚDE

Doenças cardíacas graves

() SIM () NÃO

Hipertensão arterial

() SIM () NÃO

Tuberculose ativa

() SIM () NÃO

Doenças pulmonares crônicas

() SIM () NÃO

Imunodepressão (primária ou adquirida)

() SIM () NÃO

Doença renal crônica (graus 3, 4 e 5)

() SIM () NÃO

Doença hepática crônica

() SIM () NÃO

Diabetes melito (tipo 1, tipo 2 ou gestacional)

() SIM () NÃO

Gestantes ou lactantes de crianças até 1 (um) ano de idade

() SIM () NÃO

Obesidade grave ($IMC \geq 40$)

() SIM () NÃO

Hemoglobinopatias (Anemia falciforme e talassemia)

() SIM () NÃO

Alergias

() SIM () NÃO

Quais? _____

Você possui alguma doença que comprometa sua percepção visual, olfativa ou tátil?

()SIM ()NÃO

Quais? _____

HÁBITOS

Fumante

()SIM ()NÃO

Consumo de café

() acima de 5 xic. () 3 a 5 xic. () 1 a 3 xic. () esporadicamente () não consumo

EXPERIÊNCIA SENSORIAL

Você tem EXPERIÊNCIA COM análise sensorial?

()SIM ()NÃO

Qual sua experiência com análise sensorial?

PERCEPÇÃO SENSORIAL

Marque o alimento que melhor caracteriza o atributo sensorial:

Alimento doce

() pão de forma () geleia de frutas () limão () agrião

Alimento salgado

() maçã () bacalhau () gelatina () iogurte

Alimento ácido

() laranja () batata () carne bovina () brócolis

Alimento amargo

() salsicha () tomate () sorvete () café

Alimento adstringente

() melancia () banana verde () refrigerante () presunto

AFINIDADE COM O PRODUTO ALVO

Sua dieta alimentar inclui CENOURA CRUA?

() SIM () NÃO

Você prepara CENOURA CRUA?

() SIM () NÃO

Você consome CENOURA CRUA?

() SIM () NÃO

Frequência de consumo de CENOURA CRUA:

() diariamente () 3-4 vez por semana () 1-2 vez por semana () raramente () nunca

Você gostaria de participar de uma equipe de avaliadores CENOURA CRUA?

() SIM () NÃO

DISPONIBILIDADE

TURNOS	SEG	TER	QUA	QUI	SEX	SAB
Manhã						
Tarde						
Noite						

** Colocar horários disponíveis no quadro acima*

Qual plataforma digital que você conhece e já teve acesso?

APÊNDICE II - INSTRUÇÕES GERAIS

- 1) Confira se você recebeu o kit contendo: o protocolo de segurança, o protocolo para a análise sensorial e o termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE e as 4 amostras.
- 2) O material disponibilizado foi higienizado através a aplicação de sanitizante na superfície. Portanto, sugere-se que antes de colocar na geladeira, aplique álcool 70% sobre a superfície da embalagem novamente.
- 3) Ao receber os produtos em sua casa colocá-los e mantê-los à temperatura de geladeira (4°C) até o momento de realizar a análise sensorial.

*Caso tenha observado alguma não conformidade ou dúvidas, favor entrar em contato com Débora Vieira (53 984556178).

APÊNDICE III - PROTOCOLO DE SEGURANÇA

O protocolo de segurança foi elaborado considerando as recomendações do Plano de contingência da Escola de Química e Alimentos para o enfrentamento da pandemia do covid-19. Este protocolo tem como objetivo orientar sobre cuidados necessários para análise sensorial (método Perfil Flash) *in home*.

Serão avaliadas a vida útil de cenouras minimamente processadas, produzidas de acordo com as normas de Boas Práticas de Fabricação segundo a Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002 (BRASIL, 2002), com Licença Sanitária para Indústria de Alimentos emitida pela Secretaria Estadual de Saúde do RS/ Terceira Coordenadoria Regional de Vigilância Sanitária, Pelotas, Brasil, com validade anual. Estes produtos serão armazenados sob refrigeração (4°C) até o momento da entrega. O transporte até a casa dos avaliadores será realizado em caixas isotérmicas higienizadas previamente.

ORIENTAÇÕES PARA ANÁLISE SENSORIAL EM TEMPOS DE COVID-19 NA EQA

- 4) No recebimento do kit da análise sensorial, favor utilizar a máscara de proteção facial.
- 5) Ao receber as amostras em sua casa, aplique álcool 70% sobre a superfície da embalagem novamente.
- 6) Após sanitização, colocar as amostras na geladeira em sua embalagem original até o momento de realizar a análise.
- 7) Antes do início da avaliação sensorial, deve-se realizar a higienização e sanitização de mãos, superfícies e utensílios, com água e sabão ou higienizar com álcool 70% quando não houver sujidade visível.
- 8) Retire as amostras da geladeira, somente no momento da realização da análise.

*Caso tenha observado alguma não conformidade ou dúvidas, favor entrar em contato com Débora Vieira (53 984556178).

APÊNDICE IV - PROTOCOLO PARA ANÁLISE SENSORIAL – SESSÃO 1

- LER ATENTAMENTE TODAS AS INSTRUÇÕES ANTES DE INICIAR A ANÁLISE

Você avaliará somente a APARÊNCIA, ODOR E TEXTURA (amostra não será colocada na boca).

- 1) LER E ASSINAR O TCLE
- 2) AO RECEBER OS PRODUTOS EM SUA CASA COLOCA-LOS E MANTE-LOS À TEMPERATURA DE GELADEIRA (4°C) ATÉ O MOMENTO DE REALIZAR A ANÁLISE SENSORIAL.

SESSÃO 1

3) Escolher um ambiente ISOLADO para a realização das análises sensoriais. Esse local deve ser ISOLADO, COM BOA ILUMINAÇÃO, SILENCIOSO E LONGE DE ODORES (evitar locais próximos a cozinhas, banheiros, hortas, jardins, churrasqueiras,...). A escolha desse ambiente é extremamente importante para a qualidade dos resultados obtidos.

4) CONFIRA SE RECEBEU QUATRO amostras, cada uma dessas amostra está codificada com três dígitos aleatórios.

5) Ao abrir o saco plástico contendo as 4 amostras, coloque cada uma das amostras separadamente em uma superfície horizontal branca (pode ser um prato de vidro branco, prato descartável branco ou uma tábua branca).

6) Avaliar as amostras individualmente.

7) Você deve manipular as amostras com a ajuda de utensílios (talheres ou espátulas).

8) Após familiarizar-se com a amostra, FAÇA UMA LISTA DOS DESCRITORES não hedônicos** para APARÊNCIA, ODOR e TEXTURA, a fim de DISCRIMINAR AS AMOSTRAS. Liste o máximo de atributos que conseguir. O tempo de realização desta atividade é livre.

** Definição de “atributo não hedônico”: É um atributo que usa de termos descritivos para avaliar sensorialmente com poder discriminativo uma amostra (ver exemplos na Tabela 1). Salvo que, não é necessário o uso destes atributos descritos na Tabela 1, poderão ser encontrados demais atributos não-hedônicos que considerem apropriados para descrever as amostras. Ressaltando que, os atributos devem ser utilizados para discriminar e classificar as amostras de diferentes dias úteis.

Tabela 1. Exemplo de atributos hedônicos e não hedônicos

Atributos hedônicos	Atributos não hedônicos
Aparência agradável	Aparência geral
Cor forte	Cor alaranjado
Cor fraca	Cor amarronzado
Mole	Textura na mão
Odor agradável	Odor de cenoura
Odor ruim	Odor terroso

9) Após a realização da lista de descritores, você deverá compartilhar os atributos levantados em uma planilha eletrônica. Essa planilha foi enviada para seu por e-mail, compartilhada no google drive (nome do documento: planilha com os atributos avaliação individual).

10) Os termos gerados pelos painelistas serão reunidos em uma lista comum, a fim de ajudá-los a encontrar atributos que possam ter sido negligenciados ou nomeados com dificuldade. Esta planilha estará disponível pelo google drive em seu endereço de e-mail (nome do documento: planilha com os atributos avaliação coletiva). A lista com todos os termos, será organizada de acordo com classificação sensorial correspondente (aparência odor e textura) e em ordem alfabética.

APÊNDICE V - SESSÃO 2

Os termos gerados foram reunidos em uma lista comum, a fim de ajudá-los a encontrar atributos que possam ter sido negligenciados ou nomeados com dificuldade.

- 1) Você avaliará somente a APARÊNCIA, ODOR E TEXTURA (amostra não será colocada na boca).
- 2) Escolha um ambiente ISOLADO (sem pessoas a volta), COM BOA ILUMINAÇÃO, SILENCIOSO E LONGE DE ODORES (evitar locais próximos a cozinhas, banheiros, hortas, jardins, churrasqueiras,...) para a realização das análises sensoriais.
- 3) Você recebeu 4 amostras em um saco plástico, cada uma dessas amostra está codificada com três dígitos aleatórios.
- 4) Ao abrir o saco plástico contendo as 4 amostras, coloque cada amostra em uma superfície horizontal branca (pode ser um prato de vidro branco, prato descartável branco ou uma tábua branca). Você pode manipular a amostra com auxílio de utensílios.
- 5) Você vai analisar as amostras individualmente.
- 6) Após avaliar as amostras individualmente, classifique fisicamente as amostras e depois descreva os códigos correspondentes na FICHA DE AVALIAÇÃO que se encontra no final deste protocolo.
- 7) Você deverá classificar todas as amostras para cada atributo listado, da sensação menos intensa a mais intensa, com empates permitidos. As amostras deverão ser classificadas em escala ordinal, da sensação menos intensa à mais intensa. Por exemplo, o produto com menor intensidade recebe uma pontuação de 1, e então a pontuação é aumentada de acordo com a ordem de classificação de cada produto. Segue na Figura 1, um exemplo de ficha de classificações por atributo não hedônico.

Figura 1. Exemplo de Formulário para classificação das amostras por atributo

Nome: _____		Data: _____	
Atributo sensorial: <u>Cor laranja intenso</u>			
867	516	459	273
MENOS INTENSO			
_____ →			
		MAIS INTENSO	

FICHA DE AVALIAÇÃO

NOME: _____

AMOSTRAS:

645

329

135

871

ATRIBUTO SENSORIAL: Presença de água na embalagemMENOS
INTENSOMAIS
INTENSOATRIBUTO SENSORIAL: Presença de ar na embalagemMENOS
INTENSOMAIS
INTENSOATRIBUTO SENSORIAL: Cor amarronzadaMENOS
INTENSOMAIS
INTENSOATRIBUTO SENSORIAL: Cor esbranquiçadaMENOS
INTENSOMAIS
INTENSOATRIBUTO SENSORIAL: Odor ácidoMENOS
INTENSOMAIS
INTENSOATRIBUTO SENSORIAL: Odor amoniacalMENOS
INTENSOMAIS
INTENSOATRIBUTO SENSORIAL: Maciez (pressão dos dedos)MENOS
INTENSOMAIS
INTENSOATRIBUTO SENSORIAL: Textura pastosaMENOS
INTENSOMAIS
INTENSO

APÊNDICE VI - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Os consumidores procuram datas de validade nos rótulos dos alimentos motivadas pelo seu interesse por produtos alimentícios frescos, naturais, seguros e de qualidade superior. Além disso, o período de validade pode influenciar a aceitabilidade, a percepção do paladar e a qualidade percebida dos produtos alimentícios. No entanto, mudanças sensoriais são as que limitam o prazo de validade da maioria destes produtos.

Neste momento estamos formando uma equipe de avaliadores, e gostaríamos de convidá-lo (a) para ser um de nossos colaboradores oficiais, com intuito de auxiliar na avaliação sensorial da vida útil da cenoura minimamente processada, através da metodologia do Perfil Flash.

Compreendemos que o nosso cotidiano é corrido, mas sua participação é muito importante para nós. Participar do grupo de avaliadores de vida útil de produtos refrigerados não é uma tarefa difícil e não irá tomar muito seu tempo. Você irá utilizar sentidos do olfato e da visão para descrever suas opiniões.

Serão em torno de 2 encontros de 30 a 60 minutos e os testes serão feitos em etapas específicas, descritas como sessão 1 (levantamento de atributos) e sessão 2 (avaliação da vida útil através da classificação dos atributos).

Sua participação é livre de despesas pessoais e compensação financeira; se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. O pesquisador garante ao pesquisado a assistência integral e gratuita.

Você tem o direito de se manter informado sobre os resultados parciais e finais, os quais serão publicados em eventos e periódicos científicos, mantendo-se o anonimato de sua identidade.

É garantida a liberdade de retirada do consentimento em qualquer etapa da pesquisa, sem nenhum prejuízo para você, para tanto entre em contato comigo, pesquisadora responsável no endereço: Rua Castro Alves, 453, Rio Grande, ou por e-mail: debora.craveiro@yahoo.com.br ou por telefone: (53) 984556178, ou com o CEP-FURG (endereço: segundo andar do prédio das pró-reitorias, Av. Itália, Km 8, bairro Carreiros, Rio Grande, RS, e-mail: cep@furg.br, telefone: 3237.3013). O CEP/FURG é um comitê responsável pela análise e aprovação ética de todas as pesquisas desenvolvidas com seres humanos, assegurando o respeito pela identidade, integridade, dignidade, prática da solidariedade e justiça social.

Você receberá uma via deste termo e a outra ficará com o(a) pesquisador(a).

Você aceita participar? Eu aceito participar desta pesquisa.

Nome Completo: _____

E-mail: _____

Telefone/WhatsApp: _____

Assinatura do(a) participante

Data ____/____/____

Qualquer dúvida, ou se precisar de informações adicionais, entre em contato com os pesquisadores responsáveis:

Discente Débora Craveiro Vieira/ 984556178/ debora.craveiro@yahoo.com.br

Orientador Profa. Dr.^a Vilásia Martins/99983724/vilasiamartins@gmail.com

Docente: Profa. Dra. Márcia de Mello Luvielmo/981116074/mmluvielmo@gmail.com

Assinatura do(a) pesquisadora responsável

Data ____/____/____

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO GERAL

CONCLUSÃO GERAL

A integração de tecnologias na área de embalagem se faz necessário para encontrar resultados mais eficientes para controle de qualidade dos alimentos na cadeia produtiva dos alimentos refrigerados. A interação destas tecnologias, proporcionam aos pesquisadores, uma linha de pesquisa enriquecedora no âmbito global. Desenvolvendo tecnologia com novo conceito de qualidade, ainda não atingida no Brasil. E desta forma, garantir para vida das pessoas maior segurança alimentar e credibilidade dos produtos no mercado. Sendo que, para realização destes projetos são necessárias as parcerias entre as instituições de pesquisa e a indústria.

A invenção proposta nesta tese apresenta uma concepção diferenciada, primeiramente por ser um indicador enzimático líquido de tempo e temperatura, que possibilita o uso de baixas concentrações de solução enzimática e solução de amido e iodo para alcançar o efeito termodinâmico e colorimétrico necessário, de modo que o ITT apresente baixo custo, mecanismo de reação simples, além de possuir versatilidade em sua atuação em função do tipo e quantidade de enzima utilizada. Assim, podem ser utilizados para acompanhamento de cadeia de frio e aplicados a uma ampla gama de produtos refrigerados.

A utilização do novo protótipo de ITT, combinado com sistemas de gestão da produção efetivos pode significar, para o cliente um alimento seguro, com vida-útil nominal assegurada; para o fabricante, a possibilidade de identificar ineficiências, reduzindo índices de reclamação, melhorar a imagem da empresa e, conseqüentemente, aumentar o lucro; ou para os estabelecimentos comerciais, a obrigatoriedade de cumprir com os regimes de temperatura obrigatórios e que constam nos rótulos dos produtos perecíveis.

CAPÍTULO V
RESÍDUOS GERADOS E DESTINO
SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

RESÍDUOS GERADOS E DESTINO

Todos os resíduos de substâncias químicas gerados durante o desenvolvimento da pesquisa foram conduzidos de acordo com o manual de gerenciamento de resíduos da unidade acadêmica Escola de Química e Alimentos – EQA, visando a identificação, estocagem e direcionado para o tratamento adequado.

SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

- Desenvolver e otimizar o ITT enzimático de acordo com os requisitos especificados de produtos característicos da indústria brasileira de carne.
- Verificar a aplicabilidade do protótipo de ITT enzimático, avaliando o desempenho do sob condições reais de produção industrial, transporte, armazenamento comercial e casa do consumidor.
- Promover a implementação do novo protótipo de ITT por meio da investigação das expectativas do consumidor, varejista e indústria.
- Informar consumidores, varejistas e indústria sobre as vantagens do ITT enzimático, realizando parceria para desenvolvimento e aplicação comercial.

CAPÍTULO VI
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIANI, V.; GUPTA, S.; VARIYAR, P. S. A simple time temperature indicator for real time microbial assessment in minimally processed fruits. **Journal of Food Engineering**, v. 311, p. 8, 2021.

AGÜERIA, D.; SANZANO, P.; VAZ-PIRES, P.; RODRÍGUEZ, E.; YEANNES, M. I. Development of Quality Index Method Scheme for Common Carp (*Cyprinus carpio*) Stored in Ice: Shelf-Life Assessment by Physicochemical, Microbiological, and Sensory Quality Indices. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 25, n. 5, p. 708–723, 2016.

AGUILA, J. S. DEL; SASAKI, F. F.; HEIFFIG, L. S.; ONGARELLI, M. DAS G.; GALLO, C. R.; JACOMINO, A. P.; KLUGE, R. A. Determinação da microflora em rabanetes minimamente processados. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 75–78, 2006.

AHVENAINEN, R. **Novel Food Packaging Techniques**, 589 p., 2003.

AKOACHERE, J. F. T. K.; TATSINKOU, B. F.; NKENGFAK, J. M. Bacterial and parasitic contaminants of salad vegetables sold in markets in Fako Division, Cameroon and evaluation of hygiene and handling practices of vendors. **BMC Research Notes**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2018.

ALAM, A. U.; RATHI, P.; BESHAI, H. Fruit Quality Monitoring with Smart Packaging. **Sensors**, v. 21, n. 1509, p. 1–30, 2021.

ALBERT, A.; VARELA, P.; SALVADOR, A.; HOUGH, G.; FISZMAN, S. Overcoming the issues in the sensory description of hot served food with a complex texture. Application of QDA, flash profiling and projective mapping using panels with different degrees of training. **Food Quality and Preference**, v. 22, n. 5, p. 463–473, 2011.

ALBRECHT, A.; IBALD, R.; RAAB, V.; REICHSTEIN, W.; HAARER, D.; KREYENSCHMIDT, J. Implementation of Time Temperature Indicators to Improve Temperature Monitoring and Support Dynamic Shelf Life in Meat Supply Chains. **Journal of Packaging Technology and Research**, v. 4, n. 1, p. 23–32, 2020.

ALCANTARA, M.; MORAIS, I. C. L.; SOUZA, C. M. O. C. C. Principal Microorganisms involved in the decay of sensory characteristics of meat products. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 6, n. 1, p. 1–20, 2012.

ALEGRIA, C.; PINHEIRO, J.; GONÇALVES, E. M.; FERNANDES, I.; MOLDÃO, M.; ABREU, M. Evaluation of a pre-cut heat treatment as an alternative to chlorine in minimally processed shredded carrot. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 155–161, 2010.

AMIRI, R.; PIRI, H.; AKBARI, M.; MORAD, G. The fabrication and kinetic modeling of a new time – temperature label based on paraffin wax and black carrot anthocyanin for monitoring fish. **Royal Society of Chemistry**, p. 1–8, 2020.

ANBUKARASU, P.; SAUVAGEAU, D.; ELIAS, A. L. Time-Temperature Indicator Based on Enzymatic Degradation of Dye-Loaded Polyhydroxybutyrate. **Biotechnology Journal**, v. 12, n. 9, p. 1–9, 2017.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists (ed. 16), **Official Methods of Analysis**. Washington, DC, USA, 1995.

APHA. **American Public Health Association**. Washington, DC, USA, 2001.

ASGHER, M.; NOREEN, S.; BILAL, M. Enhancement of catalytic, reusability, and long-term stability features of *Trametes versicolor* IBL-04 laccase immobilized on different polymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 1-36, 2016.

ASOODEH, A.; EMTENANI, S.; EMTENANI, S.; JALAL, R.; HOUSAINDOKHT, M. R. Molecular cloning and biochemical characterization of a thermoacidophilic, organic-solvent tolerant α -amylase from a *Bacillus* strain in *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 114–120, 2014.

ASTM. American Society for Testing and Materials, **Standard Guide for Selection of Time-Temperature Indicators**, F 1416 – 96, p 1-4, United States, 2003.

AVIYAN, P. A. R.; ANG, J. U. T.; ASCO, B. A. A. R. Thermal Stability of α -Amylase from *Aspergillus oryzae* Entrapped in Polyacrylamide Gel. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 51, p. 5462–5466, 2003.

BARRY-RYAN, C.; PACUSSI, J. M.; O'BEIRNE, D. Quality of shredded carrots as affected by packaging film and storage temperature. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 4, p. 726–730, 2000.

BARSKA, A.; WYRWA, J. Innovations in the food packaging market - Intelligent packaging - A review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 35, n. 1, p. 1–6, 2017.

BAYRAMOĞLU, G.; YILMAZ, M.; ARICA, M. Y. Immobilization of a thermostable α -amylase onto reactive membranes: Kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 84, n. 4, p. 591–599, 2004.

BENDORAITIENE, J.; SARKINAS, A.; DANILOVAS, P. P.; RUTKAITE, R.; KLIMAVICIUTE, R.; ZEMAITAITIS, A. Cationic Starch Iodophores. **Cationic Starch Iodophores**, p. 4346–4354, 2013.

BERNARDI, D. C.; MÁRSICO, E. T.; DE FREITAS, M. Q. Quality index method (QIM) to assess the freshness and shelf life of fish. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 4, p. 587–598, 2013.

BILIADERIS, C. G.; SENEVIRATNE, H. D. On the supermolecular structure and metastability of glycerol monostearate-amylose complex. **Carbohydrate Polymers**, v. 13, n. 2, p. 185–206, 1990.

BLANCHER, G.; CHOLLET, S.; KESTELOOT, R.; HOANG, D. N.; CUVELIER, G. French and Vietnamese : How do they describe texture characteristics of the same food ? A case study with jellies. **Food Quality and Preference**, v. 18, p. 560–575, 2007.

BOBELYN, E.; HERTOOG, M. L. A. T. M.; NICOLAÏ, B. M. Applicability of an enzymatic time temperature integrator as a quality indicator for mushrooms in the distribution chain. **Postharvest Biology and Technology**, v. 42, n. 1, p. 104–114, 2006.

BONILAURI, P.; GRISENTI, M. S.; DAMINELLI, P.; MERIALDI, G.; RAMINI, M.; BARDASI, L.; TADDEI, R.; COSCIANI-CUNICO, E.; DALZINI, E.; FRUSTOLI, M. A.; GIACOMETTI, F.; PIVA, S.; SERRAINO, A. Reduction of *Salmonella spp.* populations in

Italian salami during production process and high pressure processing treatment: Validation of processes to export to the U.S. **Meat Science**, v. 157, p. 1-6, 2019.

BOTONDI, R.; BARONE, M.; GRASSO, C. A review into the effectiveness of ozone technology for improving the safety and preserving the quality of fresh-cut fruits and vegetables. **Foods**, v. 10, n. 4, 2021.

BOZIARIS, I. S. Introduction to Seafood Processing-Assuring Quality and Safety of Seafood. **Seafood Processing: Technology, Quality and Safety**, p. 1–8, 2014.

BRASIL. Instrução Normativa nº60, 23 de dezembro 2019. Lista de padrões microbiológico para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, 2019b.

BRASIL. Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para o controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E A. Instrução Normativa nº20, de 26 de junho de 2018. Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, 2018.

BRASIL. Portaria SES Nº 90/2017. Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação e de Procedimentos Operacionais Padronizados para a industrialização de frutas e vegetais minimamente processados e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de frutas e vegetais minimamente processados, **Secretaria da saúde do governo estado do RS**, p. 10, 2017.

BRASIL. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Decreto Nº 10.468, DE 18 de agosto de 2020, **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. 2020.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, seção I, p. 45-53, 2001.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos e a lista de verificação das boas práticas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2002.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 331, 23 de dezembro de 2019. Padrões Microbiológico de alimentos e sua aplicação. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, 2019 a.

BRIZIO, A. P. D. R.; PRENTICE, C. Development of Aa New Time Temperature Indicator for Enzymatic Validation of Pasteurization of Meat Products. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 6, p. 1271–1276, 2015a.

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

BRIZIO, A. P. D. R.; PRENTICE, C. Use of smart photochromic indicator for dynamic monitoring of the shelf life of chilled chicken based products. **Meat Science**, v. 96, n. 3, p. 1219–1226, 2014.

- BRIZIO, A. P. R.; PRENTICE, C. Validação do tempo de vida útil apresentado por sensor fotocromico de tempo e temperatura. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 32, n. 1, p. 47–54, 2014.
- BRODOWSKA, A. J.; NOWAK, A.; KONDRATIUK-JANYSKA, A.; PIATKOWSKI, M.; SMIGIELSKI, K. Modelling the Ozone-Based Treatments for Inactivation of Microorganisms. **International Journal of Environmental Research and public health**, v. 14, p. 15, 2017.
- BROOKES, Z. L. S.; BESCOS, R.; BELFIELD, L. A.; ALI, K.; ROBERTS, A. Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. **Journal of Dentistry**, v. 103, p.12, 2020.
- CALABRESE, V. T.; KHAN, A. Amylose-iodine complex formation without KI: Evidence for absence of iodide ions within the complex. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 37, n. 15, p. 2711–2717, 1999.
- CAMPUS, M.; BONAGLINI, E.; CAPPUCCINELLI, R.; PORCU, M. C.; TONELLI, R.; ROGGIO, T. Effect of modified atmosphere packaging on quality index method (QIM) scores of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) at low and abused temperatures. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 3, p. 185–191, 2011.
- CARLSEN, M.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Kinetic studies of acid-inactivation of α -amylase from *Aspergillus oryzae*. **Chemical Engineering Science**, v. 51, n. 1, p. 37–43, 1996.
- CARVALHO, R. V.; CÔRREA, T. L. R.; SILVA, J. C. M.; MANSUR, L. R. C. D. O.; MARTINS, M. L. L. Properties of an amylase from thermophilic bacillus sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 102–107, 2008.
- CENCI, S. A. **Processamento mínimo de frutas e hortaliças**. Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, 144 p., 2011
- CHAKRABORTY, S.; KHOPADE, A.; BIAO, R.; JIAN, W.; LIU, X. Y.; MAHADIK, K.; CHOPADE, B.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Characterization and stability studies on surfactant, detergent and oxidant stable α -amylase from marine haloalkaliphilic *Saccharopolyspora* sp. A9. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 1, p. 52–58, 2011.
- CHAN, S. S.; ROTH, B.; JESSEN, F.; LØVDAL, T.; JAKOBSEN, A. N.; LERFALL, J. A comparative study of Atlantic salmon chilled in refrigerated seawater versus on ice: from whole fish to cold-smoked fillets. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.
- CHAOMUANG, N.; SINGPHITHAK, P.; LAGUERRE, O.; SUWAPANICH, R. Temperature control in a horticultural produce supply chain in Thailand and its influence on product quality. **Food Control**, v. 133, n. PA, p. 108585, 2022.
- CHEN, S.; BRAHMA, S.; MACKAY, J.; CAO, C.; ALIAKBARIAN, B. The role of smart packaging system in food supply chain. **Journal of Food Science**, p. 1–9, 2020.
- CHEN, Y.; SONG, Y.; ZHANG, Z.; CHEN, Y.; DENG, Q.; WANG, S. Thiol-Functionalized Covalent Organic Frameworks as Thermal History Indicator for Temperature and Time History Monitoring. **Advanced Functional Materials**, v. 31, n. 41, p. 1–7, 2021.

CHOI, D. Y.; JUNG, S. W.; KIM, T. J.; LEE, S. J. A prototype of time temperature integrator (TTI) with microbeads-entrapped microorganisms maintained at a constant concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 120, n. 1, p. 118–123, 2014.

CHRASTIL, J. Improved colorimetric determination of amylose in starches or flours. **Carbohydrate Research**, v. 159, n. 1, p. 154–158, 1987.

CISNEROS-ZEVALLOS, L.; SALTVEIT, M. E.; KROCHTA, J. M. Mechanism of Surface White Discoloration of Peeled (Minimally Processed) Carrots During Storage. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 2, p. 320–323, 1995.

CLAEYS, W. L.; VAN LOEY, A. M.; HENDRICKX, M. E. Intrinsic time temperature integrators for heat treatment of milk. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, n. 9–10, p. 293–311, 2002.

CONAB. Boletim Hortigranjeiro / Companhia Nacional de Abastecimento. **Companhia Nacional de Abastecimento**, v. 6, p. 72, 2020.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Boletim Hortigranjeiro**, v. 6, p. 72, 2020.

CONDURSO, C.; CINCOTTA, F.; TRIPODI, G.; MERLINO, M.; GIARRATANA, F.; VERZERA, A. A new approach for the shelf-life definition of minimally processed carrots. **Postharvest Biology and Technology**, v. 163, p. 1-16, 2020.

CORRADINI, M. G.; PELEG, M. Shelf-life estimation from accelerated storage data. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 1, p. 37–47, 2007.

CREIGHTON, T. E. An empirical approach to protein conformation stability and flexibility. **Biopolymers**, v. 22, n. 1, p. 49–58, 1983.

DA CRUZ, M. R. G.; LEITE, Y. J. B. DE S.; MARQUES, J. DE L.; PAVELQUESI, S. L. S.; OLIVEIRA, L. R. DE A.; DA SILVA, I. C. R.; ORSI, D. C. Microbiological quality of minimally processed vegetables commercialized in Brasilia, DF, Brazil. **Food Science and Technology**, v. 39, p. 498–503, 2019.

DAIROU, V.; SIEFFERMANN, J. M. A comparison of 14 jams characterized by conventional profile and a quick original method, the Flash Profile. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 2, p. 826–834, 2002.

DELARUE, J. Flash Profile, its evolution and uses in sensory and consumer science. In: **Rapid Sensory Profiling Techniques and Related Methods: Applications in New Product Development and Consumer Research**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, p. 121–151, 2015.

DELARUE, J.; SIEFFERMANN, J. M. Sensory mapping using Flash profile. Comparison with a conventional descriptive method for the evaluation of the flavour of fruit dairy products. **Food Quality and Preference**, v. 15, n. 4, p. 383–392, 2004.

DERMESONLUOGLU, E.; KATSAROS, G.; TSEVDU, M.; GIANNAKOURE, M.; TAOUKIS, P. Kinetic study of quality indices and shelf life modelling of frozen spinach under dynamic conditions of the cold chain. **Journal of Food Engineering**, v. 148, p. 13–23, 2015.

DEY, T. B.; BANERJEE, R. Purification, biochemical characterization and application of α -amylase produced by *Aspergillus oryzae* IFO-30103. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 83-90, 2015.

- DEY, T. B.; KUMAR, A.; BANERJEE, R.; CHANDNA, P.; KUHAD, R. C. Improvement of microbial α -amylase stability: Strategic approaches. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1380–1390, 2016.
- DURET, S.; HOANG, H. M.; DERENS-BERTHEAU, E.; DELAHAYE, A.; LAGUERRE, O.; GUILLIER, L. Combining Quantitative Risk Assessment of Human Health, Food Waste, and Energy Consumption: The Next Step in the Development of the Food Cold Chain? **Risk Analysis**, v. 39, n. 4, p. 906–925, 2019.
- EC. European Commission regulation n° 1169/2011 of the european parliament and of the council. **Official Journal of the European Union**, v. 304, p. 18–63, 2011.
- ERIKSON, U.; MISIMI, E. Atlantic salmon skin and fillet color changes effected by perimortem handling stress, rigor mortis, and ice storage. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 2, 2008.
- ESFAHANI, S. ANEH S.; EMTIAZI, G.; RABBANI, M. Preparation of a Microbial Time-temperature Indicator by Using the Vegetative Form of *Bacillus amyloliquefaciens* for Monitoring the Quality of. **APPLIED FOOD BIOTECHNOLOGY**, v. 4, n. 2, p. 79–84, 2017.
- ESTEVEZ, E.; ANÍBAL, J. Sensory evaluation of seafood freshness using the quality index method: A meta-analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 337, n. September 2020, p. 1-16, 2021.
- FAI, A. E. C.; ALVES DE SOUZA, M. R.; DE BARROS, S. T.; BRUNO, N. V.; FERREIRA, M. S. L.; GONÇALVES, T. C. B. D. A.; BRANCO DE ANDRADE, É. C. Development and evaluation of biodegradable films and coatings obtained from fruit and vegetable residues applied to fresh-cut carrot (*Daucus carota* L.). **Postharvest Biology and Technology**, v. 112, p. 194–204, 2016.
- FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020**. Sustainability in action. p. 224, 2020.
- FATARELLA, E.; SPINELLI, D.; RUZZANTE, M.; POGNI, R. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Nylon 6 film and nanofiber carriers: Preparation and laccase immobilization performance. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 102, p. 41–47, 2014.
- FELLER, B. E.; KELLIS, J. T.; CASCAO-PEREIRA, L. G.; ROBERTSON, C. R.; FRANK, C. W. Interfacial biocatalysis on charged and immobilized substrates: The roles of enzyme and substrate surface charge. **Langmuir**, v. 27, n. 1, p. 250–263, 2011.
- FENGJUAN, X.; LEI, G.; ZHENXING, L.; HONG, L.; XIANGZHAO, M. Development and application of a tyrosinase-based time-temperature indicator (TTI) for determining the quality of turbot sashimi. **Journal of Ocean University of China**, v. 16, n. 5, p. 847–854, 2017.
- FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S. .; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. 4^a ed., Artmed, 2010.
- FITTER, J. Structural and dynamical features contributing to thermostability in α -amylases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 1925–1937, 2005.
- FREITAS, D. D. G. C.; DO AMARAL, G. V. Método do Índice de Qualidade (MIQ) para a Avaliação Sensorial da Qualidade de Pescado. **Embrapa Agroindústria de Alimentos-Documentos**, p. 1–20, 2011.

- FREITAS, J.; VAZ-PIRES, P.; CÂMARA, J. S. Quality Index Method for fish quality control: Understanding the applications, the appointed limits and the upcoming trends. **Trends in Food Science and Technology**, v. 111, p. 333–345, 2021.
- FSAI. **Guidance note n° 18: Determination of food shelf-life**. Dublin: [s.n.]. p.1-41, 2005.
- FU, B.; LABUZA, T. P. Shelf-Life Testing: Procedures and Prediction Methods. **Quality in Frozen Foods**, p. 377–415, 1997.
- GACULA, M.; RUTENBECK, S. Sample size in consumer test and descriptive analysis. **Journal of Sensory Studies**, v. 21, n. 2, p. 129–145, 2006.
- GALAGAN, Y.; SU, W. F. Fadable ink for time-temperature control of food freshness: Novel new time-temperature indicator. **Food Research International**, v. 41, n. 6, p. 653–657, 2008.
- GALLIANI, D.; MASCHERONI, L.; SASSI, M.; TURRISI, R.; LORENZI, R.; SCACCABARROZZI, A.; STINGELIN, N.; BEVERINA, L. Thermochromic Latent-Pigment-Based Time-Temperature Indicators for Perishable Goods. **Advanced Optical Materials**, v. 3, n. 9, p. 1164–1168, 2015.
- GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; BENOMAR, N.; LUCAS, R. Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 142–148, 2010.
- GAO, T.; SUN, D. W.; TIAN, Y.; ZHU, Z. Gold–silver core-shell nanorods based time-temperature indicator for quality monitoring of pasteurized milk in the cold chain. **Journal of Food Engineering**, v. 306, p. 1-9, 2021.
- GAO, T.; TIAN, Y.; ZHU, Z.; SUN, D. Modelling, responses and applications of time-temperature indicators (TTIs) in monitoring fresh food quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 99, p. 311–322, 2020.
- GARCÍA, M. R.; CABO, M. L.; HERRERA, J. R.; RAMILO-FERNÁNDEZ, G.; ALONSO, A. A.; Balsa-Canto, E. Smart sensor to predict retail fresh fish quality under ice storage. **Journal of Food Engineering**, v. 197, p. 87–97, 2017.
- GHANI KUVEI, F.; KHODANAZARY, A.; ZAMANI, I. Quality index method (QIM) sensory scheme for gutted greenback grey mullet *Chelon subviridis* and its shelf life determination. **International Journal of Food Properties**, v. 22, n. 1, p. 618–629, 2019.
- GHORBANI, L.; RABBANI, M. Fabrication of a time-temperature indicator by inkjet printing of a spore-based bio-ink. **Bioprinting**, v. 21, p. 27, 2021.
- GIANNAKOUROU, M. C.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G. J. E.; TAOUKIS, P. S. Field evaluation of the application of time temperature integrators for monitoring fish quality in the chill chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, n. 3, p. 323–336, 2005.
- GIANNOGLOU, M.; EVANGELOPOULOU, A. M.; PERIKLEOUS, N.; BACLORI, C.; TSIRONI, T.; TAOUKIS, P. Time temperature integrators for monitoring the shelf life of ready-to-eat chilled smoked fish products. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 22, p. 100403, 2019.
- GIANNOGLOU, M.; TOULI, A.; PLATAKOU, E.; TSIRONI, T.; TAOUKIS, P. S. Predictive modeling and selection of TTI smart labels for monitoring the quality and shelf-life

of frozen seafood. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 26, p. 294–301, 2014.

GIMÉNEZ, A.; ARES, G. **Sensory shelf life estimation**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

GUIAVARC'H, Y.; VAN LOEY, A.; ZUBER, F.; HENDRICKX, M. Development characterization and use of a high-performance enzymatic time-temperature integrator for the control of sterilization process' impacts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 1, p. 15–25, 2004.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: A biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599–1616, 2003.

GURLER, Z.; PAMUK, S.; YILDIRIM, Y.; ERTAS, N. The microbiological quality of ready-to-eat salads in Turkey: A focus on *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 196, p. 79–83, 2015.

HAENTJENS, T. H.; VAN LOEY, A. M.; HENDRICKX, M. E.; TOBBACK, P. P. The Use of α -Amylase at Reduced Water Content to Develop Time Temperature Integrators for Sterilization Processes. **LWT - Food Science and Technology**, v. 31, n. 5, p. 467–472, 1998.

HALONEN, N.; PÁLVÖLGYI, P. S.; BASSANI, A.; FIORENTINI, C.; NAIR, R.; SPIGNO, G.; KORDAS, K. Bio-Based Smart Materials for Food Packaging and Sensors – A Review. **Bio-Based Smart Material**, v. 7, n. April, p. 1–14, 2020.

HAN, J. Y.; KIM, M. J.; SHIM, S. D.; LEE, S. J. Application of fuzzy reasoning to prediction of beef sirloin quality using time temperature integrators (TTIs). **Food Control**, v. 24, n. 1–2, p. 148–153, 2012.

HATCH, G. L. Effect of Temperature on the Starch-Iodine Spectrophotometric Calibration Line. **Analytical Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 2002–2005, 1982.

HE, T.; TIAN, Y. LE; QI, L.; ZHANG, J.; ZHANG, Z. Q. Improved performance of α -amylase immobilized on poly (glycidyl methacrylate-co-ethylenedimethacrylate) beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, p. 492–499, 2014.

HEISING, J. K.; DEKKER, M.; BARTELS, P. V.; (TINY) VAN BOEKEL, M. A. J. S. Monitoring the Quality of Perishable Foods: Opportunities for Intelligent Packaging. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 5, p. 645–654, 2014.

HERMAN, K. M.; HALL, A. J.; GOULD, L. H. Outbreaks attributed to fresh leafy vegetables, United States, 1973-2012. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n. 14, p. 3011–3021, 2015.

HOLLO, J.; SZEJTLI, J. THE MECHANISM OF STARCH . IODINE REACTION. In: **Rodley JA, editor. Starch and its derivatives, 4th ed. Chapman & Hall**, v. 1, n. 1, p. 1957, 1957.

HSIAO, H. I.; CHANG, J. N. Developing a microbial time–temperature indicator to monitor total volatile basic nitrogen change in chilled vacuum-packed grouper fillets. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 5, p. 1–9, 2017.

HSIAO, H. I.; HUANG, K. L. Time-temperature transparency in the cold chain. **Food Control**, v. 64, p. 181–188, 2016.

ICCAT, Statistics Databases. **MS Excel pivot table to obtain nominal catches of Atlantic tunas and tuna-like fish (including sharks), by gear, region and flag.** Madri: 2019.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specification for Foods Toronto. **Microorganisms in Foods: Their significance and methods for enumeration**, 3^o ed., University of Toronto Press, 1978.

IFST. Institute of Food Science and Technology. **Shelf life of foods : guidelines for its determination and prediction.** London: [s.n.], 1993

IGLESIAS, J.; MEDINA, I.; BIANCHI, F.; CARERI, M.; MANGIA, A.; MUSCI, M. Study of the volatile compounds useful for the characterisation of fresh and frozen-thawed cultured gilthead sea bream fish by solid-phase microextraction gas chromatography – mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1473–1478, 2009.

ILLANES. **Enzyme biocatalysis: Principles and applications.** 1^o ed. Netherlands: Springer, 2008.

IMMEL, S.; LICHTENTHALER, F. W. The Hydrophobic Topographies of Amylose and its Blue Iodine Complex. **Starch - Stärke**, v. 52, n. 1, p. 1–8, 2000.

IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization — Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1019–1032, 2008.

JACXSENS, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. Predictive modelling for packaging design : equilibrium modified atmosphere packages of fresh-cut vegetables subjected to a simulated distribution chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 331–341, 2002.

JADHAV, S. B.; SINGHAL, R. S. Conjugation of α -amylase with dextran for enhanced stability: Process details, kinetics and structural analysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 4, p. 1811–1817, 2012.

JADHAV, S. B.; SINGHAL, R. S. Screening of polysaccharides for preparation of α -amylase conjugate to enhance stability and storage life. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1724–1729, 2013.

JAFRY, A. T.; LIM, H.; SUNG, W.-K.; LEE, J. Flexible time–temperature indicator: a versatile platform for laminated paper-based analytical devices. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 21, n. 3, p. 57, 2017.

JAISWAL, R. K.; MENDIRATTA, S. K.; TALUKDER, S.; SONI, A.; CHAND, S.; SAINI, B. L. Application of lipase based enzymatic time temperature indicator (TTI) as quality marker for frozen chicken meat. **Food Science and Technology Research**, v. 26, n. 1, p. 9–16, 2020.

JAY, M. J. **Microbiologia de Alimentos.** 6. ed. São Paulo: [s.n.].

JEDERMANN, R.; NICOMETO, M.; UYSAL, I.; LANG, W. Reducing food losses by intelligent food logistics. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 372, n. 2017, p. 1–20, 2014.

JHUANG, J. R.; LIN, S. BIN; CHEN, L. C.; LOU, S. N.; CHEN, S. H.; CHEN, H. H. Development of immobilized laccase-based time temperature indicator by electrospinning zein fiber. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 23, n. November 2019, p. 100436, 2020a.

- JHUANG, J. R.; LOU, S. N.; LIN, S. BIN; CHEN, S. H.; CHEN, L. C.; CHEN, H. H. Immobilizing laccase on electrospun chitosan fiber to prepare time-temperature indicator for food quality monitoring. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 63, p. 10, 2020.
- JONSDOTTIR, R.; OLAFSDOTTIR, G.; CHANIE, E.; HAUGEN, J. E. Volatile compounds suitable for rapid detection as quality indicators of cold smoked salmon (*Salmo salar*). **Food Chemistry**, v. 109, p. 184–195, 2008.
- KARLBERG, M.; PICULELL, L.; HUANG, L. Solubility of amylose / ionic surfactant complexes in dilute aqueous solutions: Dependence on surfactant concentration. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, p. 350–354, 2007.
- KHAJEH, K.; NEMAT-GORGANI, M. Comparative studies on a mesophilic and a thermophilic alpha-amylase. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 90, n. 1, p. 47–55, 2001.
- KIM, E.; CHOI, D. Y.; KIM, H. C.; KIM, K.; LEE, S. J. Calibrations between the variables of microbial TTI response and ground pork qualities. **Meat Science**, v. 95, n. 2, p. 362–367, 2013.
- KIM, I. S.; JO, C.; LEE, K. H.; LEE, E. J.; AHN, D. U.; KANG, S. N. Effects of low-level gamma irradiation on the characteristics of fermented pork sausage during storage. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, n. 4, p. 466–472, 2012.
- KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; CHISM, G. W. Use of ozone to inactivate microorganisms on lettuce. **Journal of Food Safety**, v. 19, n. 1, p. 17–34, 1999.
- KIM, K.; KIM, E.; LEE, S. J. New enzymatic time-temperature integrator (TTI) that uses laccase. **Journal of Food Engineering**, v. 113, n. 1, p. 118–123, 2012.
- KIM, M. J.; SHIN, H. W.; LEE, S. J. A novel self-powered time-temperature integrator (TTI) using modified biofuel cell for food quality monitoring. **Food Control**, v. 70, p. 167–173, 2016.
- KINAS, P. **Boletim Estatístico da Pesca Marinha e Estuarina do sul do Rio Grande do Sul**. FURG, Rio Grande, 2013. Disponível em: <http://www.imef.furg.br/images/stories/documentos/boletim_furg_2015.pdf>.
- KING, B. M.; ARENTS, P.; MOREAU, N. Cost/efficiency evaluation of descriptive analysis panels - I. Panel size. **Food Quality and Preference**, v. 6, n. 4, p. 245–261, 1995.
- KLIMAVICIUTE, R.; BENDORAITIENE, J.; RUTKAITE, R.; SIUGZDAITE, J.; ZEMAITAITIS, A. Preparation, stability and antimicrobial activity of cationic cross-linked starch-iodine complexes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 5, p. 800–807, 2012.
- KOÇAK, F.; SOYSAL, Ç. DEVELOPMENT OF NEW TYROSINASE TYPE TIME TEMPERATURE INDICATOR. **Italian Journal Food Science**, v. 26, p. 18–24, 2014.
- KOUTSOUMANIS, K. P.; TAOUKIS, P. S.; DROSINOS, E. H. Applicability of an Arrhenius Model for the Combined Effect of Temperature and CO₂ Packaging on the Spoilage Microflora of Fish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3528–3534, 2000.

- KOUTSOUMANIS, K.; GIANNAKOUROU, M. C.; TAOUKIS, P. S.; NYCHAS, G. J. E. Application of shelf life decision system (SLDS) to marine cultured fish quality. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 375–382, 2002.
- KUGE, T.; ONO, S. Amylose-Iodine Complex. II. Effects of Inorganic Salts. **B. Chem. Soc. Jpn.**, v. 33, n. 9, p. 1269–1272, 1960.
- KUSWANDI, B. **Active and intelligent packaging, safety, and quality controls**. [s.l.] Elsevier Inc., 2020.
- KUSWANDI, B.; JAYUS; RESTYANA, A.; ABDULLAH, A.; HENG, L. Y.; AHMAD, M. A novel colorimetric food package label for fish spoilage based on polyaniline film. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 18–189, 2012a.
- KUSWANDI, B.; NURFAWAIDI, A. On-package dual sensors label based on pH indicators for real-time monitoring of beef freshness. **Food Control**, v. 82, p. 91–100, 2017.
- LABUZA, T. P. **Shelf-life dating of foods**. CT: Food and Nutrition Press, Westport: [s.n.], 1982.
- LABUZA, T. The search for shelf life – An update on continued efforts in understanding practical strategies for determining and testing the shelf life of food products. **Food Testing Analysis**, v. 1, p. 1–21, 2000.
- LASSOUED, N.; DELARUE, J.; LAUNAY, B.; MICHON, C. Baked product texture: Correlations between instrumental and sensory characterization using Flash Profile. **Journal of Cereal Science**, v. 48, n. 1, p. 133–143, 2008.
- LAVELLI, V.; PAGLIARINI, E.; AMBROSOLI, R.; MINATI, J. L.; ZANONI, B. Physicochemical, microbial, and sensory parameters as indices to evaluate the quality of minimally-processed carrots. **Postharvest Biology and Technology**, v. 40, n. 1, p. 34–40, 2006.
- LAWLESS, H. T.; HEYMANN, H. **Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices**. 2nd ed., New York, NY: [s.n.], 2010.
- LEE, J. H.; KOO, Y. K.; CHO, H. W.; CHA, H. J.; SHIN, D. U.; OH, T. G.; LEE, S. J. Cysteine-loaded pH-responsive liposome/gold nanoparticles as a time-temperature indicator with instantaneous color change. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 73, p. 8, 2021.
- LEE, J.; KAWAMURA, S.; KOSEKI, S. Quantitative Evaluation of Changes in Color during Maillard Reaction for Development of Novel Time-Temperature Integrators / Indicators. **Food Science and Technology Research**, v. 24, n. 2, p. 283–287, 2018.
- LEE, S. B.; KIM, D. H.; JUNG, S. W.; LEE, S. J. Air-activation of printed time – temperature integrator: A sandwich package case study. **Food Control**, v. 101, p. 89–96, 2019.
- LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**. 6. ed. São Paulo: [s.n.], p. 262, 1993.
- LITTLE, C. L.; GILLESPIE, I. A. Prepared salads and public health. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 6, p. 1729–1743, 2008.
- LIU, B.; XU, H.; ZHAO, H.; LIU, W.; ZHAO, L.; LI, Y. Preparation and characterization of intelligent starch/PVA films for simultaneous colorimetric indication and antimicrobial activity for food packaging applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 842–849, 2017.

- LIU, J.; BREDIE, W. L. P.; SHERMAN, E.; HARBERTSON, J. F.; HEYMANN, H. Comparison of rapid descriptive sensory methodologies: Free-Choice Profiling, Flash Profile and modified Flash Profile. **Food Research International**, v. 106, p. 892–900, 2018.
- LOISEL, J.; DURET, S.; CORNU, A.; CAGNON, D.; TARDET, M.; DERENS-BERTHEAU, E.; LAGUERRE, O. Trends in Food Science & Technology Cold chain break detection and analysis: Can machine learning help? **Trends in Food Science & Technology**, v. 112, p. 391–399, 2021.
- LU, L.; ZHENG, W.; LV, Z.; TANG, Y. Development and Application of Time–temperature Indicators Used on Food during the Cold Chain Logistics. **Packaging and Technology and Science**, v. 26, p. 80–90, 2013.
- MACIEL, V. B. V.; YOSHIDA, C. M. P.; FRANCO, T. T. Development of a prototype of a colourimetric temperature indicator for monitoring food quality. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 1, p. 21–27, 2012.
- MAGRO, M. **Aspectos da Pesca e Dinâmica de Populações do espada, *Trichiurus lepturus* (Trichiuridae, Teleostei), da costa Sudeste-Sul do Brasil**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2006.
- MAMEDE, M. E. O.; BENASSI, M. D. T. Efficiency assessment of Flash Profiling and Ranking Descriptive Analysis: a comparative study with star fruit-powdered flavored drink. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 2, p. 195–203, 2016.
- MAO, L.; MHASKE, P.; ZING, X.; KASAPIS, S.; MAJZOBI, M.; FARAHNAKY, A. Cold plasma: Microbial inactivation and effects on quality attributes of fresh and minimally processed fruits and Ready-To-Eat vegetables. **Trends in Food Science and Technology**, v. 116, p. 146–175, 2021.
- MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, G. B.; AMODIO, M. L.; COLELLI, G. Potential use of microwave treatment on fresh-cut carrots: Physical, chemical and microbiological aspects. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 6, p. 2063–2072, 2016.
- MATARAGAS, M.; BIKOULI, V. C.; KORRE, M.; STERIOTI, A.; SKANDAMIS, P. N. Development of a microbial Time Temperature Indicator for monitoring the shelf life of meat. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, p. 47, 2018.
- MCGRANCE, S. J.; CORNELL, H. J.; RIX, C. J. A Simple and Rapid Colorimetric Method for the Determination of Amylose in Starch Products. **Starch - Stärke**, v. 50, n. 4, p. 158–163, 1998.
- MENDOZA, T. F.; WELT, B. A.; OTWELL, S.; TEIXEIRA, A. A.; KRISTONSSON, H.; BALABAN, M. O. Kinetic Parameter Estimation of Time-temperature Integrators Intended. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 3, 2004.
- MENG, J.; QIAN, J.; TANG, Y. A solid-state time-temperature indicator used in chilled fresh pork monitoring. **Packaging Technology and Science**, v. 31, n. 5, p. 353–360, 2018.
- MERCIER, S.; VILLENEUVE, S.; MONDOR, M.; UYSAL, I. Time – Temperature Management Along the Food Cold Chain: A Review of Recent Developments. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, p. 1–21, 2017.
- MILLS, A.; HAWTHORNE, D. Novel pH-based photocatalyst activity indicator hydrogel film (Hpaii). **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 346, p. 390–395, 2017.

- MINICK, M.; FOTTA, K.; KHAN, A. Polyiodine units in starch-iodine complex: INDO CI study of spectra and comparison with experiments. **Biopolymers**, v. 31, n. 1, p. 57–63, 1991.
- MOHAMMADIAN, E.; ALIZADEH-SANI, M.; JAFARIA, S. M. Smart monitoring of gas / temperature changes within food packaging based on natural colorants. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety Rev Food Sci Food Saf**, p. 1–47, 2020.
- MÜLLER, P.; SCHMID, M. Intelligent Packaging in the Food Sector: A Brief Overview. **Foods**, v. 8, n. 16, p. 1–12, 2019.
- MURDOCH, K. A. The amylose-iodine complex. **Carbohydrate Research**, v. 233, p. 161–174, 1992.
- NADAR, S. S.; MULEY, A. B.; LADOLE, M. R.; JOSHI, P. U. Macromolecular cross-linked enzyme aggregates (M-CLEAs) of α -amylase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 84, p. 69–78, 2016.
- NDRAHA, N.; HSIAO, H. I.; VLAJIC, J.; YANG, M. F.; LIN, H. T. V. Time-temperature abuse in the food cold chain: Review of issues, challenges, and recommendations. **Food Control**, v. 89, p. 12–21, 2018.
- NEWSOME, R.; BALESTRINI, C. G.; BAUM, M. D.; CORBY, J.; FISHER, W.; GOODBURN, K.; LABUZA, T. P.; PRINCE, G.; THESMAR, H. S.; YIANNAS, F. Applications and perceptions of date labeling of food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 745–769, 2014.
- NOLLET, L. M. L.; TOLDRÁ, F. **Handbook of seafood and seafood products analysis**. [s.l: s.n.], 930 p., 2009.
- O'BEIRNE, D.; GLEESON, E.; AUTY, M.; JORDAN, K. Effects of processing and storage variables on penetration and survival of *Escherichia coli* O157: H7 in fresh-cut packaged carrots. **Food Control**, v. 40, n. 1, p. 71–77, 2014.
- OH, T. G.; JO, J. A.; LEE, S. J. Evaluation of time–temperature integrator for indicating the ripeness of kiwifruit in plastic container at home. **Journal of Food Science**, v. 86, n. 7, p. 2872–2885, 2021.
- OLIVEIRA, M. A.; SOUZA, V. M.; BERGAMINI, A. M. M.; MARTINIS, E. C. P. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. **Food Control**, v. 22, n. 8, p. 1400–1403, 2011.
- ONO, S.; TSUCHIHASHI, S.; KUGE, T. On the Starch-Iodine Complex. **Journal of the American Chemical Society**, v. 75, n. 14, p. 3601–3602, 1953.
- OVCA, A.; ŠKUFGA, T.; JEVŠNIK, M. Temperatures and storage conditions in domestic refrigerators - Slovenian scenario. **Food Control**, v. 123, 2021.
- OZBAY, G.; SPENCER, K.; GILL, T. A. Investigation of protein denaturation and pigment fading in farmed steelhead (*Onchorhynchus mykiss*) fillets during frozen storage. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 30, n. 2, p. 208–230, 2006.
- PANDIAN, A. T.; CHATURVEDI, S.; CHAKRABORTY, S. Applications of enzymatic time–temperature indicator (TTI) devices in quality monitoring and shelf-life estimation of food products during storage. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 15, n. 2, p. 1523–1540, 2021.

- PANTAZI, D.; PAPAVERGOU, A.; POURNIS, N.; KONTOMINAS, M. G.; SAVVAIDIS, I. N. Shelf-life of chilled fresh Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius*) stored under various packaging conditions: Microbiological, biochemical and sensory attributes. **Food Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 136–143, 2008.
- PARK, H. R.; KIM, K.; LEE, S. J. Adjustment of Arrhenius activation energy of laccase-based time-temperature integrator (TTI) using sodium azide. **Food Control**, v. 32, n. 2, p. 615–620, 2013.
- PARK, H. R.; KIM, Y. A.; JUNG, S. W.; KIM, H. C.; LEE, S. J. Response of microbial time temperature indicator to quality indices of chicken breast meat during storage. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 1145–1152, 2013.
- PATIL, S.; VALDRAMIDIS, V. P.; CULLEN, P. J.; FRIAS, J.; BOURKE, P. Inactivation of *Escherichia coli* by ozone treatment of apple juice at different pH levels. **Food Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 835–840, 2010.
- PAULA, N. R. F.; BOAS, E. V. DE B. V.; RODRIGUES, L. J.; CARVALHO, R. A.; PICCOLI, R. H. Qualidade de produtos minimamente processados e comercializados em gôndolas de supermercados nas cidades de Lavras – MG, Brasília – DF e São Paulo – SP. **Ciência agrotécnica de Lavras**, v. 33, n. 1, p. 219–227, 2009.
- PAULIKIENĖ, S.; VENSŁAUSKAS, K.; RAILA, A.; ŽVIRDAUSKIENĖ, R.; NAUJOKIENĖ, V. The influence of ozone technology on reduction of carrot loss and environmental IMPACT. **Journal of Cleaner Production**, v. 244, 2020.
- PAVELKOVÁ, A. Time temperature indicators as devices intelligent packaging. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, v. 61, n. 1, p. 245–251, 2013.
- PERRIN, L.; SYMONEAUX, R.; MAITRE, I.; ASSELIN, C.; JOURJON, F.; PAGES, J. Comparison of three sensory methods for use with the Napping 0 procedure : Case of ten wines from Loire valley. **Food Quality and Preference**, v. 19, p. 1–11, 2008.
- PILON, L.; OETTERER, M.; GALLO, C. R.; SPOTO, M. H. F. Shelf life of minimally processed carrot and green pepper. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 150–158, 2006.
- POYATOS-RACIONERO, E.; ROS-LIS, J. V. Recent advances on intelligent packaging as tools to reduce foodwaste. **Journal of Cleaner Production journal**, v. 172, p. 3398–3409, 2018.
- PRABHAKAR, P. K.; VATSA, S.; SRIVASTAV, P. P.; PATHAK, S. S. A comprehensive review on freshness of fish and assessment: Analytical methods and recent innovations. **Food Research International**, v. 133, n. March, p. 109157, 2020.
- RAHMAN, A. T. M. M.; KIM, D. H.; JANG, H. D.; YANG, J. H.; LEE, S. J. Preliminary study on biosensor-type time-temperature integrator for intelligent food packaging. **Sensors (Switzerland)**, v. 18, n. 6, 2018.
- RAMÍREZ-RIVERA, E. J.; RAMÓN-CANUL, L. G.; DÍAZ-RIVERA, P.; JUÁREZ-BARRIENTOS, J. M.; HERMAN-LARA, E. PRINYAWIWATKUL, W.; HERRERA-CORREDOR, J. A. Original article Sensory profiles of artisan goat cheeses as influenced by the cultural context and the type of panel. **International Journal of Food Science and Technology**, p. 1–12, 2017.

- RENDLEMAN, J. A. The reaction of starch with iodine vapor. Determination of iodide-ion content of starch-iodine complexes. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, n. 2, p. 191–202, 2003.
- RENUMARN, P.; SRILAONG, V.; UTHAIRATANAKIJ, A.; KANLAYANARAT, S.; JITAREERAT, P. The effects of immersion methods and concentration of ozonated water on the microbial counts and the quality and sensory attributes of fresh-cut broccoli. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 2, p. 533–539, 2014.
- RÍO-CARBAJO, L.; VIDAL-CORTÉS, P; Tipos de antisépticos, presentaciones y normas de uso. **Medicina intensiva**, p.6, 2018.
- ROCHA, A. M. C. N.; MOTA, C. C. A. R.; MORAIS, A. M. M. B. Physico-chemical qualities of minimally processed carrot stored under vacuum. **Journal of Foodservice**, v. 18, n. 1, p. 23–30, 2007.
- ROKUGAWA, H.; FUJIKAWA, H. Evaluation of a new Maillard reaction type time-temperature integrator at various temperatures. **Food Control**, v. 57, p. 355–361, 2015.
- ROSA, O. O. **Microbiota associada a produtos hortícolas minimamente processados comercializados em supermercados**. [s.l.] Universidade Federal de Lavras. 120 p., 2002.
- ROY, J. K.; RAI, S. K.; MUKHERJEE, A. K. Characterization and application of a detergent-stable alkaline α -amylase from *Bacillus subtilis* strain AS-S01a. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 219–229, 2012.
- RUNDLE, R. E.; FOSTER, J. F.; BALDWIN, R. R. On the Nature of the Starch-Iodine Complex. **Journal of the American Chemical Society**, v. 66, n. 12, p. 2116–2120, 1944.
- RUSSELL, A. D. Chlorhexidine : Antibacterial Action and Bacterial Resistance. **Infection**, v. 14, n. 5, p. 212–215, 1986.
- SAMBORSKA, K.; GUIAVARC, Y. H.; LOEY, A. V. A. N.; HENDRICKX, M. ALPHA-AMYLASE IN PRESENCE OF SUGARS AND POLYOLS. **Journal of Food Process Engineering**, v. 29, n. 32, p. 287–303, 2006.
- SANT'ANA, L. S.; SOARES, S.; VAZ-PIRES, P. Development of a quality index method (QIM) sensory scheme and study of shelf-life of ice-stored blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2253–2259, 2011.
- SCALIA, G. L. A.; NASCA, A.; CORONA, O.; SETTANNI, L.; MICALE, R. An innovative shelf life model based on smart logistic unit for an efficient management of the perishable food supply chain. **Journal of Food Process Engineering**, p. 1–13, 2015.
- SCHMIDT, A.; MAYER, H. K. Milk process authentication by vitamin B 6 as a novel time temperature integrator. **Food Control**, v. 91, p. 123–127, 2018.
- SCHUH, V.; SCHUH, J.; FRONZA, N.; FORALOSSO, F. B.; VERRUCK, S.; VARGAS JUNIOR, A.; DA SILVEIRA, S. M. Evaluation of the microbiological quality of minimally processed vegetables. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 290–295, 2020.
- SHOJI, K.; SCHUDEL, S.; ONWUDE, D.; SHRIVASTAVA, C.; DEFRAEYE, T. Mapping the postharvest life of imported fruits from packhouse to retail stores using physics-based digital twins. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 176, p. 1–13, 2022.
- SIROLI, L.; PATRIGNANI, F.; SERRAZANETTI, D. I.; GARDINI, F.; LANCIOTTI, R. Innovative strategies based on the use of bio-control agents to improve the safety, shelf-life

and quality of minimally processed fruits and vegetables. **Trends in Food Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 302–310, 2015.

SKARE, M.; CHAN, S. S.; HANDELAND, S. O.; LØVDAL, T.; LERFALL, J.; ROTH, B. A comparative study on quality, shelf life and sensory attributes of Atlantic salmon slaughtered on board slaughter vessels against traditional land-based facilities. **Aquaculture**, v. 540, p. 1–12, 2021.

SOHAIL, M.; SUN, D. W.; ZHU, Z. Recent developments in intelligent packaging for enhancing food quality and safety. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 15, p. 2650–2662, 2018.

SOON, J. M.; SAGUY, I. S. Crowdsourcing: A new conceptual view for food safety and quality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 66, p. 63–72, 2017.

SOUZA, L. P.; FARONI, L. R. D. A.; HELENO, F. F.; CECON, P. R.; GONÇALVES, T. D. C.; SILVA, G. J. DA; PRATES, L. H. F. Effects of ozone treatment on postharvest carrot quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 53–60, 2018.

SPAGNOL, W. A.; SILVEIRA, V.; PEREIRA, E.; FILHO, N. G. Monitoramento da cadeia do frio: Novas tecnologias e recentes avanços. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, p. 2–8, 2018.

STEIN, R. S.; RUNDLE, R. E. On the nature of the interaction between starch and iodine. **The Journal of Chemical Physics**, v. 16, n. 3, p. 195–207, 1948.

SUPPAKUL, P.; KIM, D. Y.; YANG, J. H.; LEE, S. B.; LEE, S. J. Practical design of a diffusion-type time-temperature indicator with intrinsic low temperature dependency. **Journal of Food Engineering**, v. 223, p. 22–31, 2018.

SVEINSDOTTIR, K.; HYLDIG, G.; MARTINSDOTTIR, E.; JØRGENSEN, B.; KRISTBERGSSON, K. Quality Index Method (QIM) scheme developed for farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Food Quality and Preference**, v. 14, n. 3, p. 237–245, 2003.

TAOUKIS, P. S. **Commercialization of time-temperature integrators for foods**. Case studies in novel food processing technologies. Woodhead Publishing Limited, p. 351–366, 2010.

TAOUKIS, P. S. Modelling the use of time-temperature indicators in distribution and stock rotation. In: **Food Process Modelling**. Woodhead P ed. Cambridge: [s.n.]. p. 402–428, 2001.

TAOUKIS, P. S.; GOGOU, E.; TSIRONI, T.; GIANNOGLOU, M.; DERMESONLOUOGLOU, E.; KATSAROS, G. **Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food**. Switzerland: SpringerInternational Publishing, 2016.

TAOUKIS, P. S.; KOUTSOUMANIS, K. Use of time – temperature integrators and predictive modelling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, p. 21–31, 1999.

TAOUKIS, P. S.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G. J. E. Use of time-temperature integrators and predictive modelling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 21–31, 1999.

TAOUKIS, P. S.; LABUZA, T. P. Applicability of Time-Temperature Indicators Monitors of Food Products as Shelf Life. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 4, p. 783–788, 1989.

- TAOUKIS, P. S.; LABUZA, T. P. Time-temperature indicators (TTIs). **Novel food packaging techniques**. Cambridge: Woodhead: [s.n.]. p. 589, 2003.
- TAOUKIS, P. S.; TSIRONI, T. N. Time–Temperature Integrators (TTI). **Reference Module in Food Science**, p. 1–13, 2018.
- TAREA, S.; CUVELIER, G.; SIEFFERMANN, J. M. Sensory evaluation of the texture of 49 commercial apple and pear purees. **Journal of Food Quality** **30**, v. 30, p. 1121–1131, 2007.
- THOMA, J. A.; FRENCH, D. The starch-iodine-iodide interaction. part II. Potentiometric investigations. **Potentiometric investigation of starch-iodine-iodide interact**, v. 65, p. 1825–1828, 1961.
- TSIRONI, T. N.; TAOUKIS, P. S. Current Practice and Innovations in Fish Packaging. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 27, n. 10, p. 1024–1047, 2018.
- TSIRONI, T.; GOGOU, E.; VELLIU, E.; TAOUKIS, P. S. Application and validation of the TTI based chill chain management system SMAS (Safety Monitoring and Assurance System) on shelf life optimization of vacuum packed chilled tuna. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 1, p. 108–115, 2008.
- TSIRONI, T.; RONNOW, P.; GIANNOGLOU, M.; TAOUKIS, P. Developing suitable smart TTI labels to match specific monitoring requirements: The case of *Vibrio spp.* growth during transportation of oysters. **Food Control**, v. 73, p. 51–56, 2017.
- TSIRONI, T.; STAMATIOU, A.; GIANNOGLOU, M.; VELLIU, E.; TAOUKIS, P. S. Predictive modelling and selection of Time Temperature Integrators for monitoring the shelf life of modified atmosphere packed gilthead seabream fillets. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 1156–1163, 2011.
- UDDIN, Z.; BOONSUPTHIP, W. Development and characterization of a new nonenzymatic colored time–temperature indicator. **Journal of Food Process Engineering**, v. 42, n. 4, p. 1–9, 2019.
- VANDERROOST, M.; RAGAERT, P.; DEVLIEGHERE, F.; DE MEULENAER, B. Intelligent food packaging: The next generation. **Trends in Food Science and Technology**, v. 39, n. 1, p. 47–62, 2014.
- VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; GARCÍA, E. E. S.; GALVÃO, J. A.; OETTERER, M. Quality Index Method (QIM) Scheme Developed for Whole Nile Tilapias (*Oreochromis niloticus*) Ice Stored under Refrigeration and Correlation with Physicochemical and Microbiological Quality Parameters. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 29, n. 3, p. 307–319, 2020.
- VERVOORT, L.; DER PLANCKEN, I. VAN; GRAUWET, T.; VERJANS, P.; COURTIN, C. M.; HENDRICKX, M. E.; VAN LOEY, A. Xylanase B from the hyperthermophile *Thermotoga maritima* as an indicator for temperature gradients in high pressure high temperature processing. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, n. 2, p. 187–196, 2011.
- VIEIRA, D. C.; BALBINOT-ALFARO, E.; MARTINS, V. G. **Sistemas inteligentes para o monitoramento da qualidade de pescado**. Rio Grande: FURG, 2021.
- WAN, X.; KNOLL, M. A new type of TTI based on an electrochemical pseudo transistor. **Journal of Food Engineering**, v. 168, p. 79–83, 2016.

- WANIHSUKSOMBAT, C.; HONGTRAKUL, V.; SUPPAKUL, P. Development and characterization of a prototype of a lactic acid-based time-temperature indicator for monitoring food product quality. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 3, p. 427–434, 2010.
- WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. G. J.; WONG, D. W. S. **Handbook of food enzymology**. New York, p. 1052, 2003.
- WU, D.; HOU, S.; CHEN, J.; SUN, Y.; YE, X.; LIU, D.; MENG, R.; WANG, Y. Development and characterization of an enzymatic time-temperature indicator (TTI) based on *Aspergillus niger* lipase. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 1100–1104, 2015.
- WU, D.; WANG, Y.; CHEN, J.; YE, X.; WU, Q.; LIU, D.; DING, T. Preliminary study on time-temperature indicator (TTI) system based on urease. **Food Control**, v. 34, n. 1, p. 230–234, 2013.
- WYRWA, J.; BARSKA, A. Packaging as a Source of Information about Food Products. **Procedia Engineering**, v. 182, p. 770–779, 2017.
- XU, R.; ZHOU, Q.; LI, F.; ZHANG, B. Laccase immobilization on chitosan / poly (vinyl alcohol) composite nanofibrous membranes for 2 , 4-dichlorophenol removal. **Chemical Engineering Journal**, v. 222, p. 321–329, 2013.
- YAN, S.; HUAWEI, C.; LIMIN, Z.; FAZHENG, R.; LUDA, Z.; HENGTAO, Z. Development and characterization of a new amylase type time-temperature indicator. **Food Control**, v. 19, n. 3, p. 315–319, 2008.
- YANG, H. J.; SONG, K. B. Application of Lemongrass Oil-Containing Polylactic Acid Films to the Packaging of Pork Sausages. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 36, n. 3, p. 421–426, 2016.
- YANG, J. H.; KIM, D. H.; LEE, S. J. Heat-activated time-temperature integrator indicating instant cup noodle doneness. **Journal of Food Engineering**, v. 256, p. 37–45, 2019.
- YANG, L.; LEI, M.; ZHAO, M.; YANG, H.; ZHANG, H.; LI, Y.; ZHANG, K.; LEI, Z. Synthesis of the light/pH responsive polymer for immobilization of α -amylase. **Materials Science and Engineering C**, v. 71, p. 75–83, 2017.
- YE, B.; CHEN, J.; YE, H.; ZHANG, Y.; YANG, Q.; YU, H.; FU, L.; WANG, Y. Development of a time-temperature indicator based on Maillard reaction for visually monitoring the freshness of mackerel. **Food Chemistry**, v. 373, n. PB, p. 1-14, 2022.
- YOON, S. H.; ROBYT, J. F. Activation and stabilization of 10 starch-degrading enzymes by Triton X-100, polyethylene glycols, and polyvinyl alcohols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 5, p. 556–562, 2005.
- ZABALA, S.; CASTAÑON, J.; MARTÍNEZ, C. Development of a time-temperature indicator (TTI) label by rotary printing technologies. **Food Control**, v. 50, p. 57–64, 2015.
- ZHANG, Y.; LI, Q.; LI, D.; LIU, X.; LUO, Y. Changes in the microbial communities of air-packaged and vacuum-packaged common carp (*Cyprinus carpio*) stored at 4 °C. **Food Microbiology**, v. 52, p. 197–204, 2015.