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

DESENVOLVIMENTO DE INDICADORES ENZIMÁTICOS INTELIGENTES PARA MONITORAMENTO DA QUALIDADE DE ALIMENTOS

Ana Paula Dutra Resem Brizio

Orientador: Dr. Carlos Prentice-Hernández

Rio Grande/RS

2015

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

DESENVOLVIMENTO DE INDICADORES ENZIMÁTICOS INTELIGENTES PARA MONITORAMENTO DA QUALIDADE DE ALIMENTOS

ANA PAULA DUTRA RESEM BRIZIO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Orientador: Dr. Carlos Prentice-Hernández

Rio Grande/RS

2015

APROVAÇÃO

Tese defendida por Ana Paula Dutra Rezem Brizio e aprovada em 21 de setembro de 2015, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández – FURG

Profa. Dra. Simone Hickmann Flores – UFRGS

Profa Dra. Myriam Salas Meilaço - FURG

Profa. Dra. Vilásia Guimarães Martins – FURG

Profa. Dra. Jaqueline Garda Buffon - FURG

B862d Brizio, Ana Paula Dutra Resem.
Desenvolvimento de indicadores enzimáticos inteligentes para monitoramento da qualidade de alimentos / Ana Paula Dutra Resem Brizio. - 2015.
122 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2015.
Orientador: Dr. Carlos Prentice-Hernández.

1. Alimentos perecíveis 2. Cadeia de frio 3. Tratamento técnico 4. Embalagem inteligente 5. Segurança alimentar I. Prentice-Hernández, Carlos II. Título.

CDU 664.8

Catalogação na Fonte: Bibliotecário Me. João Paulo Borges da Silveira CRB 10/2130

Ao Rafael

Pela cumplicidade e amor incondicional.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor Dr. Carlos Prentice, pelo apoio e pelos conhecimentos transmitidos ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À empresa Novozymes S/A, pelo apoio técnico e fornecimento das enzimas utilizadas.

Aos estabelecimentos industriais que tornaram viável uma etapa importante do trabalho.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, pelo apoio prestado ao longo do desenvolvimento desta Tese.

A todos os colegas e amigos que me acompanharam e auxiliaram na execução deste trabalho, em especial a Inajara Piotrowicz minha parceira para "assuntos aleatórios".

Aos meus pais e minha irmã, expresso a minha gratidão pelo imenso amor ao longo de toda minha caminhada.

Ao meu marido Rafael, pelo amor, paciência e companheirismo incondicional. Sua cumplicidade e carinho foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

A dificuldade em conhecer o histórico de temperatura de um alimento, desde sua produção até o consumo, torna difícil prever sua verdadeira vida-útil. O uso de indicadores de tempo e temperatura (ITT) pode ser uma alternativa inovadora empregada para garantir a validade de produtos de forma dinâmica. Assim, este trabalho visa desenvolver novos indicadores enzimáticos de tempo e temperatura para monitorar a qualidade de alimentos perecíveis durante o seu processamento e armazenamento, baseados na reação de complexação entre o amido e o iodo (azul), e na posterior atuação de uma enzima amilase sobre esse complexo, para causar uma redução da intensidade da cor azul a uma taxa dependente do tempo e da temperatura de armazenagem. Os sistemas inteligentes propostos possuem versatilidade de atuação em função do tipo e quantidade de amilase empregada. Desta forma, foi utilizada uma amilase termoestável para a formulação de um indicador inteligente de processamento, utilizado para o controle de tratamentos térmicos industriais (pasteurização);e uma amilase termosensível na formulação de um indicador de armazenamento, empregada para o controle das condições de temperatura durante a cadeia de frio de produtos perecíveis. Na elaboração dos ITT de processamento foram realizadas simulações em laboratório e testes em planta fabril, os quais avaliaram diferentes concentrações de amilase termoestável nos protótipos de ITT quando submetidos as condições de tempo e temperatura de pasteurização. Os resultados evidenciaram que a resposta de cor dos indicadores foi visualmente interpretada, como adaptável à medição usando equipamentos, apresentando boa reprodutibilidade em todas as condições estudadas. O ITT contendo 6,5 % de amilase termoestável (p_{enzima}/p_{amido}) foi aquele cujo resultado melhor se adequou à utilização na validação de cozimento de presunto. Nesta condição, o protótipo anexado à embalagem primária do produto indicou o processo de pasteurização de forma fácil, precisa e não destrutiva. Já durante o desenvolvimento do ITT de armazenamento foram realizadas simulações em laboratório, testes em planta fabril e ponto de venda, os quais avaliaram o uso de diferentes concentrações de amilase termosensível nos protótipos de ITT quando submetidos a diversas condições de cadeia de frio. Os resultados evidenciaram que devido à possibilidade de definir a vida-útil destes protótipos variando as concentrações de enzima termosensível, os indicadores podem ser facilmente adaptados para controlar as condições de temperatura durante a cadeia de diversos alimentos perecíveis. O protótipo contendo 60 % de amilase termosensível (p_{enzima}/p_{amido}) foi aquele cujo resultado melhor se adequou à utilização no controle da cadeia avícola. Assim, o ITT indicou visualmente o histórico de tempo e temperatura de produtos à base de frango de forma fácil e precisa. Os resultados obtidos na avaliação das percepções dos consumidores frente ao emprego de indicadores inteligentes em embalagens alimentícias mostraram que o uso de ITT é uma inovação receptiva, com consequente aceitação e intenção de compra elevada pela população brasileira. Assim, com este trabalho espera-se contribuir efetivamente para que o conceito de embalagens inteligentes possa ser aceito comercialmente e que sejam estabelecidas no Brasil normas que regulamentem seu uso, conferindo benefícios à conservação de grande variedade de alimentos.

Palavras-chaves: alimentos perecíveis**,** cadeia de frio, tratamento térmico, embalagem inteligente, segurança alimentar.

ABSTRACT

Development of intelligent enzymatic indicators for monitoring the quality of food

The difficulty in knowing food temperature history, from production to consumption, makes it difficult to predict their true shelf-life. The use of time-temperature indicators (TTI) could be an innovative alternative employed to guarantee the validity of products dynamically. This work aims to develop new enzyme time and temperature indicators to monitor the quality of perishable foods during processing and storage, based on the complexation reaction between starch and iodine (blue), and the subsequent performance of an amylase enzyme on this complex, to cause a reduction in the intensity of blue color at a rate dependent of storage time and temperature. The intelligent systems proposed have the acting versatility of the type and amount of amylase employed. Thus, a thermostable amylase was used in the development of an intelligent processing indicator, used to control industrial heat treatment (pasteurization), and a thermosensitive amylase was used in the development of a storage indicator, used to control the temperature conditions during the cold chain of perishable products. In the preparation of the processing TTI, laboratory simulations and tests in a manufacturing plant were performed. These tests evaluated different concentrations of amylase in the TTI prototypes when subjected to pasteurization time and temperature conditions. The results showed that the color response of the indicators was visually interpreted as adaptable to measuring using equipments, with good reproducibility in all studied conditions. The TTI containing 6.5 % of thermostable amylase (p_{enzyme}/p_{starch}) was the one whose result was suited for use in validating the cooking of hams. In this condition, the prototype attached to the primary packaging of the product indicated the pasteurization process in an easy, accurate and non-destructive way. During the development of the storage TTI, laboratory simulations, tests at the test plant and at the point of sales were performed. These tests evaluated the use of different concentrations of thermosensitive amylases at the TTI prototypes when subjected to several cold chain conditions. The results showed that due to the possibility of defining the shelf-life of these prototypes varying concentrations of thermosensitive enzyme, the indicators can be easily adapted to control the temperature conditions during the chain of many perishable foods. The prototype containing 60 % of thermosensitive amylase (p_{enzyme}/p_{starch}) was the one whose result was suited for use in controlling the poultry chain. Thus, the TTI indicated visually the time and temperature history of chicken based products in a easy and accurate way. The results of the assessment of consumers perceptions facing the use of smart indicators in food packaging showed that the use of TTI is a receptive innovation with consequent acceptance and high purchase intent by the Brazilian population. So with this work we expect to contribute effectively for the concept of smart packaging can be accepted commercially and that rules to govern its use can be established in Brazil, providing benefits to the conservation of great variety of foods.

Keywords: perishable food, cold chain, heat treatment, smart packaging, food safety.

LISTA DE TABELAS

CAPITULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO I – DESENVOLVIMENTO DE NOVO INDICADOR DE TEMPO E TEMPERATURA ENZIMÁTICO PARA VALIDAÇÃO DE PASTEURIZAÇÃO DE PRODUTOS CÁRNEOS

Tabela 1 - Composição e caracteríticas da enzima BAN® 480 L (*Novozymes* A/S).....42

Tabela 2 - Condições de cozimento (tempo/temperatura) definidas para este estudo.....43

ARTIGO II - DESENVOLVIMENTO DE INDICADOR INTELIGENTE ENZIMÁTICO PARA ACOMPANHAMENTO DINÂMICO DA VIDA-ÚTIL DE PRODUTOS ALIMENTÍCIOS

Tabela 1 - Composição e características da enzima Fungamyl® 800L (*Novozymes* A/S).....59

Tabela 2 - Parâmetros cinéticos dos ITT e das análises tradicionais do músculo de frango.....75

Tabela 3 - Imagem dos ITT (60 % de amilase) e valores de *chroma L*, a*, b** mensurados nos indicadores anexados aos produtos, antes e depois do transporte. Com posterior cálculo da diferença de cor (*ΔE**).....77

ARTIGO III - ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA DE EMBALAGENS INTELIGENTES: UM ESTUDO BRASILEIRO

Tabela 1 - Resultados da avaliação da clareza de conteúdo do questionário proposto na Figura 1.....91

Tabela 2 - Frequência das respostas dos consumidores de alimentos amostrada frente às perguntas fechadas dicotômicas presentes na pesquisa (n = 1806).....95

Tabela 3 - Características socioeconômicas dos consumidores pesquisados divididos em dois grupos de análise, dos observam os rótulos e dos que não observam os rótulos dos alimentos.100

Tabela 4 - Frequência das respostas dos consumidores pesquisados divididos em dois grupos de análise, dos observam os rótulos e dos que não observam os rótulos dos alimentos.....101

Tabela 5 - Frequência das categorias de atributos de importância do uso de ITT mencionados pelos dois grupos de análise.....102

Tabela 6 - Relação entre as categorias de importância do uso de ITT em alimentos e suas respectivas intenções de compra de produtos com ITT, para cada grupo de análise.....104

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO II – REVISAO DA LITERATURA

Figura 1 - Distribuição de frequência de temperatura no interior de refrigeradores domésticos.24

Figura 2 - Ilustração do funcionamento de ITT de histórico parcial e de histórico total.....26

Figura 3 - Ciclo de reação do sistema fotocrômico da etiqueta *OnVu*®. A exposição à luz ultravioleta induz a coloração, enquanto o calor promove a reação inversa.....27

Figura 4 - Modelo da etiqueta inteligente *OnVu*® 28

Figura 5 - Principio de funcionamento do ITT elaborado pela *VITSAB*.....28

Figura 6 - (A) Modelo do rótulo *Fresh-Check*® ; (B) Escala de cores apresentada pelo indicador *Fresh-Check*® 29

Figura 7 - Imagem da etiqueta inteligente *eO*® 30

Figura 8 - Principio de reação do sistema de ITT proposto. A mistura do iodo com o amido induz a coloração azul escura, enquanto a atuação da enzima amilase promove a descoloração do sistema a uma taxa dependente do tempo e da temperatura de armazenamento 33

Figura 9 - Representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas.....34

Figura 10 - Esquema reacional da hidrólise enzimática de amido utilizando iodo como indicador.....35

CAPITULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO I – DESENVOLVIMENTO DE NOVO INDICADOR DE TEMPO E TEMPERATURA ENZIMÁTICO PARA VALIDAÇÃO DE PASTEURIZAÇÃO DE PRODUTOS CÁRNEOS

Figura 1 - Procedimento de obtenção do protótipo do indicador de tempo e temperatura proposto 44

Figura 2 - (A) Coloração do protótipo antes do tratamento térmico (*chroma* b*= -1,95); (B) Aparência do ITT quando nenhuma alteração adicional na cor azul poderia ser medida no rótulo (*chroma* b*= 9,0).....45

Figura 3 - Ilustração do preparo de amostras contendo o controlador de temperatura *data logger* no interior do produto (“ponto frio”) e o ITT aderido* na embalagem primária.....46

Figura 4 - Questionário utilizado na avaliação da interpretação da resposta de cor apresentada pelo indicador inteligente.....47

Figura 5 - Descoloração dos protótipos de ITT: (A) 5,0, 5,5 e 6,0 % de amilase e, (B) 6,5; 7,0 e 7,5% de amilase; durante aquecimento em banho de água.....49
Figura 6 - Cores apresentadas pelo protótipo de ITT com 6,5 % de amilase durante aquecimento em banho de água..... 51
Figura 7 - (A) Temperaturas (ambiente e produto) mensuradas no cozimento industrial; (B) Descoloração dos ITT (6,5 % de amilase) durante cozimento industrial.....51
Figura 8 - Esquema apresentando os resultados da aplicação de questionário (Figura 4) a funcionários de empresas frigoríficas.....53
Figura 9 - Descoloração apresentada pelos ITT (6,5 % de amilase) durante aquecimento em banho de água realizado após: (A) a primeira até a sexta semana de armazenamento a temperatura ambiente; (B, C) uma e dezeseis semanas de armazenamento sob (B) refrigeração e (C) congelamento.....54
ARTIGO II - DESENVOLVIMENTO DE INDICADOR INTELIGENTE ENZIMÁTICO PARA ACOMPANHAMENTO DINÂMICO DA VIDA-ÚTIL DE PRODUTOS ALIMENTÍCIOS
Figura 1 - Procedimento de obtenção dos protótipos de ITT.....60
Figura 2 - (A) Tonalidade de azul escuro apresentada pela etiqueta imediatamente confeccionada; (B) cor definida como fim da vida-útil do indicador inteligente, quando ΔE^*= 47,0.....62
Figura 3 - Ilustração do preparo de amostras. (A) Colocação do controlador de temperatura *data logger* no interior da bandejo de produto; (B) Colocação* do ITT.....64
Figura 4 - Descoloração apresentada pelos protótipos de ITT durante armazenamento: (A) 4; (B) 7; (C) 10; (D) 15; (E) 20; (F) 25°C.....68
Figura 5: Descoloração apresentada pelos protótipos de ITT durante armazenamento: (A) 4 ºC; (B) 25 ºC.....71
Figura 6 - Superfície de resposta que relaciona a vida-útil dos indicadores inteligentes, com a sua respectiva concentração de amilase a uma dada temperatura de referência.....73
Figura 7 - Ln da constante de velocidade de resposta: (A) análise microbiológica do músculo; (B) descoloração dos ITT com 30 – 80 % de amilase; plotados *versus* 1/T (Kelvin).....74
Figura 8 - Valores de temperatura mensurados por *data loggers* durante transporte logístico terrestre: (A) condição ambiente do caminhão; (B) condição interna dos produtos.....76
Figura 9 - Temperaturas médias monitoradas nas amostras durante dez dias de estoque em balcão frigorífico de estabelecimento comercial.....78

Figura 10 - Resultados das análises microbiológicas das amostras cárneas mantidas a: (A) 4 °C; (B) situação real de armazenamento (Figura 9).....79
Figura 11 - Resposta de cor apresentada pelos ITT (60 % de amilase) mantidos a 4 °C (controle) e situação real de armazenamento (Figura 9).....81
Figura 12 - Descoloração diária observada visualmente nos ITT (60 % de amilase) mantidos sob temperatura ideal (4 °C) e real (Figura 9).....81
Figura 13 - Desempenho apresentado pelo ITT contendo 60 % de amilase durante armazenamento a 4 ºC depois de diferentes períodos de estoque sob condições de congelamento.....83
ARTIGO III - ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA DE EMBALAGENS INTELIGENTES: UM ESTUDO BRASILEIRO
Figura 1 - Questionário inicial de avaliação de consumidor.....88
Figura 2 - Questionário de avaliação de clareza.....89
Figura 3 - (A) Ilustração esquemática do funcionamento de um ITT contido no questionário inicial (Figura 1); (B) ilustração esquemática do funcionamento de um ITT após adequação (Figura 4).....92
Figura 4 - Questionário final após adequações de clareza de linguagem.....93
Figura 5 - Características socioeconômicas dos consumidores de alimentos pesquisados (n = 1806).....94

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL, OBJETIVOS.....16
1. INTRODUÇÃO GERAL 17
2. OBJETIVOS.....19
2.1 Objetivo geral 19
2.2 Objetivos específicos 19
CAPÍTULO II - REVISÃO DA LITERATURA.....20
1. VIDA-ÚTIL DOS ALIMENTOS.....21
2. CONSERVAÇÃO DOS ALIMENTOS 21
2.1 Conservação pelo calor.....22
2.2 Conservação pelo frio 23
3. EMBALAGENS INTELIGENTES CONTENDO INDICADORES DE TEMPO E TEMPERATURA (ITT).....25
3.1 Protótipos de Indicador de tempo e temperatura enzimáticos 31
3.2 O novo protótipo de Indicador de tempo e temperatura enzimático.....32
3.2.1 Amido.....33
3.2.2 α-Amilase 35
3.2.2.1 α-Amilase termoestável.....36
3.2.2.2 α-Amilase termosensível.....36
4. CONSUMIDORES DE ALIMENTOS X TECNOLOGIAS INOVADORAS EM EMBALAGENS ALIMENTÍCIAS 36
CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....39
ARTIGO I - DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO INDICADOR DE TEMPO E TEMPERATURA ENZIMÁTICO PARA VALIDAÇÃO DA PASTEURIZAÇÃO DE PRODUTOS CÁRNEOS 40
1. INTRODUÇÃO 41
2. MATERIAL E MÉTODOS.....41
2.1 Caracterização da enzima 41
2.2 Estimativa de custo das matérias-primas utilizadas na elaboração dos protótipos de ITT 42
2.3 Caracterização do tratamento térmico 42
2.4 Preparação dos protótipos de ITT.....43

2.5 Desempenho dos protótipos durante simulação de processamento térmico 44
2.6 Aplicabilidade industrial do novo ITT 45
2.6.1 Interpretação da cor apresentado pelo indicador inteligente 46
2.7 Desempenho do ITT após estoque sob diferentes condições de temperatura 47
2.8 Análises dos dados 48
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 48
4. CONCLUSÃO 56
ARTIGO II - DESENVOLVIMENTO DE INDICADOR ENZIMÁTICO INTELIGENTE PARA ACOMPANHAMENTO DINÂMICO DA VIDA-ÚTIL DE PRODUTOS ALIMENTÍCIOS 57
1. INTRODUÇÃO 58
2. MATERIAL E MÉTODOS 58
2.1 Caracterização da enzima 58
2.2 Preparação dos protótipos de ITT 59
2.3 Estimativa de custo das matérias-primas utilizadas na elaboração dos protótipos de ITT 60
2.4 Comportamento e estimativa de vida-útil dos protótipos de ITT durante simulação de cadeia de abastecimento 60
2.5 Avaliação cinética dos novos ITT 62
2.5.1 Descoloração dos novos ITT 63
2.5.2 Avaliação da perda de qualidade de amostras cárneas 63
2.6 Aplicabilidade do novo ITT 63
2.6.1 Preparo das amostras 64
2.6.2 Acompanhamento da cadeia logística terrestre de produtos frescos 64
2.6.3 Monitoramento de armazenamento comercial 65
2.7 Desempenho do novo ITT após estoque sob congelamento 66
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 66
3.1 Analise de custos 66
3.2 Comportamento e estimativa de vida-útil dos protótipos de ITT durante simulação de cadeia de abastecimento 67
3.3 Avaliação cinética dos novos ITT 73
3.4 Aplicabilidade do novo ITT 76
3.4.1 Acompanhamento da cadeia logística terrestre de produtos frescos 76

3.4.2 Monitoramento de armazenamento comercial 77
3.5 Desempenho do ITT após estoque sob congelamento 82
4. CONCLUSÕES 83
ARTIGO III - ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA DE EMBALAGENS INTELIGENTES: UM ESTUDO BRASILEIRO 85
1. INTRODUÇÃO 86
2. MATERIAL E MÉTODOS 87
2.1 Construção do questionário 87
2.2 Validação da clareza do questionário 87
2.3 Participantes do estudo e a apresentação do questionário 90
2.4 Análises dos Dados 90
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 91
3.1 Validação da clareza do questionário 91
3.2 Avaliação dos resultados de toda a população amostral (n = 1806) 94
3.2 Avaliação dos resultados da população amostral que observa os rótulos X população amostral que não observa os rótulos das embalagens alimentícias 99
4. CONCLUSÃO 105
CAPÍTULO IV – CONCLUSÃO GERAL 106
CAPÍTULO V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS 110
ANEXO I 122
ANEXO II 123
ANEXO III 125

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO GERAL

A busca crescente dos consumidores por alimentos de qualidade condiz com o aumento da expectativa de que esta qualidade será mantida entre a produção e o consumo (BRIZIO, 2014; ROBERTSON, 2013). Nesse contexto, as embalagens alimentícias ganharam novas funções perante os consumidores. Se tradicionalmente eram utilizadas com o objetivo de conter e proteger passivamente o alimento, hoje assumem o papel de comunicação, marketing, conveniência e, mais recentemente, de indicação de qualidade, contribuindo ativamente para a venda de um produto (AZEREDO, 2012; GALIĆ et al., 2011).

Em função da temperatura ser considerada o principal fator que afeta a qualidade e segurança de produtos alimentícios perecíveis (AUNG; CHANG, 2014; KREYENSCHMIDT et al., 2010; JEDERMANN et al., 2009; SMOLANDER et al., 2004), novos sistemas de embalagens, denominados indicadores de tempo e temperatura (ITT), estão sendo propostos para atuar como “mensageiros inteligentes” proporcionando maiores informações aos consumidores, e assim, assegurando a qualidade do produto durante toda sua vida-útil (ROBERTSON, 2013; PAVELKOVÁ, 2012).

O princípio de funcionamento de um ITT baseia-se em uma mudança irreversível que pode ser mecânica, química, eletroquímica, enzimática ou microbiológica, normalmente expressa como uma resposta visível (MAI et al., 2011). A taxa desta mudança é dependente do tempo e da temperatura, deste modo, a resposta dá uma indicação cumulativa das condições de armazenamento às quais o rótulo foi exposto (KREYENSCHMIDT et al., 2010).

Apesar do grande potencial de contribuição, poucos sistemas de ITT até o momento têm sido capazes de conseguir aplicação industrial (ROBERTSON, 2013; MAI et al., 2011). As principais razões para a relutância dos produtores em adotar o seu uso são: custo, confiabilidade, aplicabilidade e obrigatoriedade (CHOI et al., 2014; PAVELKOVÁ, 2013). Por isso, mais estudos devem serem realizados, tanto na pesquisa de novos compostos, quanto na elucidação dos mecanismos que possam ser empregados, com objetivo de identificar uma combinação favorável de eficiência, confiabilidade e viabilidade.

Nesta perspectiva, enquadra-se este trabalho que visa desenvolver novos indicadores de tempo e temperatura cujo princípio de funcionamento está baseado na reação de complexação entre o amido e o iodo (azul escuro), e na posterior atuação da enzima amilase sobre esse complexo, causando a redução da intensidade da cor azul a uma taxa dependente do tempo e da temperatura de armazenagem.

Os indicadores inteligentes propostos constituem-se de materiais de baixo custo facilmente disponíveis. Possuem ainda, versatilidade de atuação em função do tipo e quantidade de amilase empregada. Desta forma, utilizando uma amilase termoestável na formulação do indicador este pode ser utilizado para controlar os tratamentos térmicos industriais, enquanto usando uma amilase termosensível, o indicador mostra as condições de temperatura durante a cadeia de frio de produtos perecíveis. Assim, com o desenvolvimento destes indicadores inteligentes espera-se contribuir efetivamente com a produção, distribuição e venda de produtos alimentícios seguros.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Elaborar, caracterizar e validar indicadores de tempo e temperatura (ITT) enzimáticos para monitorar a qualidade de alimentos perecíveis durante seu processamento e armazenamento.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o tratamento térmico de presunto cozido;
- Avaliar a cadeia de abastecimento de produtos avícolas frescos;
- Caracterizar a deterioração microbiana de produtos avícolas;
- Elaborar protótipos de ITT contendo amilase termosensível e amilase termoestável;
- Caracterizar a resposta de cor dos protótipos de ITT mediante simulações em laboratório;
- Modelar cineticamente a descoloração dos protótipos de ITT;
- Validar a aplicabilidade dos protótipos mediante uso industrial;
- Realizar análise de custo das matérias-primas utilizadas nos indicadores inteligentes desenvolvidos;
- Avaliar a aceitação e intenção de compra de indicadores inteligentes pelos consumidores brasileiros.

CAPÍTULO II

REVISÃO DA LITERATURA

1. VIDA-ÚTIL DOS ALIMENTOS

De acordo com o *Institute of Food Science and Technology* (2009), a vida-útil de um alimento é “o tempo durante o qual um alimento é seguro, mantém as características sensoriais, químicas, físicas e microbiológicas e cumpre com qualquer alegação nutricional, que figure na respectiva rotulagem, quando armazenado nas condições recomendadas”. Já o *Codex Alimentarius* (1999), define a vida-útil de um alimento como “o período durante o qual um alimento conserva a sua segurança microbiológica, a uma dada temperatura de armazenamento”.

O termo vida-útil é sempre utilizado para descrever a durabilidade de um produto. Em geral, é o tempo requerido para que o produto estocado sob condições específicas alcance seu ponto final, determinado através de critérios estabelecidos por testes sensoriais, físico-químicos e, principalmente, microbiológicos (CORRADINI et al., 2007).

A vida-útil de um produto está exclusivamente relacionada a uma determinada situação ambiental. Não tem sentido falar em vida-útil sem especificar em que circunstâncias ela foi avaliada ou medida, em quais condições de armazenamento, de transporte e de distribuição, qual clima, temperatura e umidade, entre outras (HUI, 2006). Assim, a validade de um produto é estabelecida, essencialmente, tendo em conta as condições de conservação adequadas. Se estas não forem cumpridas na prática, o alimento perde qualidade e tempo de vida-útil (AZEREDO, 2012).

2. CONSERVAÇÃO DOS ALIMENTOS

A conservação dos alimentos é conseguida através da aplicação de condições desfavoráveis ao crescimento de micro-organismos e/ou do desenvolvimento de reações químicas/enzimáticas, procurando atrasar ou eliminar as alterações responsáveis pela sua deterioração (AYMERICH et al., 2008).

Os métodos de conservação dos alimentos têm o objetivo de aumentar sua vida-útil através de técnicas que evitem alterações microbianas, enzimáticas, químicas e físicas. As técnicas mais importantes baseiam-se na redução das taxas de alteração microbiológica, intimamente associadas com a segurança alimentar. Alguns métodos de conservação, como o uso de calor, são baseados na inativação de micro-organismos, enquanto outros têm como

princípio o controle de seu crescimento, como é o caso dos métodos baseados na redução da temperatura (AZEREDO, 2012).

2.1 Conservação pelo calor

As tecnologias térmicas são o foco central da conservação de alimentos processados. A aplicação de calor para conservação dos alimentos, tem por objetivo inativar os micro-organismos patogênicos, reduzir a carga microbiana deteriorante e desnaturar enzimas. Além dos efeitos do calor sobre a conservação, um atributo importante da aplicação de calor aos alimentos são as modificações sensoriais, frequentemente indispensáveis à sua aceitação (FAI et. al., 2011).

Geralmente, o tratamento térmico utilizando temperaturas elevadas tem efeitos adversos sobre as propriedades sensoriais e nutricionais do alimento. Em decorrência disso, deve-se selecionar o tratamento mais brando, capaz de garantir ausência de patógenos e assegurar a vida-útil desejada (TUCKER, 2008). Projetar processos térmicos requer uma compreensão profunda do processo de aquecimento do produto, do impacto sobre o micro-organismo alvo e sobre os fatores de qualidade (SILVA; GIBBS, 2012). Por isso, as condições de tempo e temperatura utilizadas durante o tratamento irão depender das características térmicas e físicas, da forma e do tamanho do alimento e do recipiente; do tipo e da resistência térmica dos micro-organismos e da cinética de degradação da qualidade (ARIAS-MENDEZ et al., 2014).

Por sua importância tecnológica e sanitária, as empresas são confrontadas com o desafio de provar que seus produtos foram tratados termicamente de forma adequada (TUCKER et al., 2002). Normalmente, para isto, utilizam: durante o tratamento - sondas de temperatura, que mostram a evolução da temperatura ambiente ao longo do processo e; após o tratamento – medições aleatórias da temperatura e análises microbiológicas, físico-químicas e sensoriais nos produtos (TUCKER, 2008).

Segundo Arias-Mendez et al. (2014), Tucker (2008) Mehauden et al. (2007), e Marra e Romano (2003), a validação dos processos térmicos pode ser ineficaz quando se utilizam métodos convencionais de medida da temperatura. As sondas de temperatura medem a condição ambiental, mas não individual do produto. Esta última é verificada apenas através de testes após o tratamento térmico, onde a temperatura é mensurada em amostragens aleatórias de produtos de forma destrutiva, ou seja, rompe-se a integridade da embalagem do produto para verificar sua temperatura interna, e desta forma, os produtos amostrados não seguem fluxo normal de produção.

Uma alternativa inovadora utilizada para medir a temperatura dos produtos durante o tratamento térmico de forma individual, fácil, confiável e não destrutível, poderia ser o uso de indicadores de tempo e temperatura (ITT) anexados à embalagem dos produtos. De acordo com Taoukis e Labuza (1989), ITT são dispositivos que contêm uma substância termicamente lábil como mecanismo de funcionamento e, desta forma, mostram a história de tempo-temperatura cumulativa de um alimento.

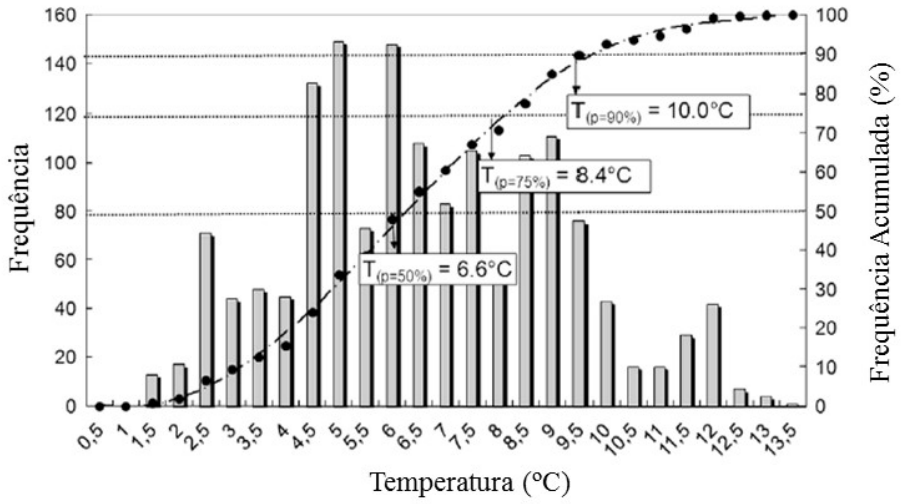
2.2 Conservação pelo frio

A temperatura é considerada o principal fator que afeta a qualidade e segurança de produtos alimentícios perecíveis (AUNG; CHANG, 2014; KARADAG; PUHAKKA, 2010; JEDERMANN et al., 2009; SMOLANDER et al., 2004). Quanto menor a temperatura, menores as taxas de alteração. Enquanto a aplicação de calor baseia-se na inativação de micro-organismos, o uso de baixas temperaturas tem por objetivo retardar o crescimento microbiano, assim como, as reações químicas e enzimáticas (AZEREDO, 2012).

A conservação de alimentos sob condições de refrigeração (normalmente entre 0-4 ºC) obriga à existência de uma cadeia de frio que acompanha o produto desde a sua origem até o consumidor final (HUI, 2006; LIKAR; JEVSNIK, 2006; JAMES, 1996). O regime de temperatura deve ser definido em função da natureza dos produtos e do tempo de armazenamento pretendido, devendo permanecer o mais constante possível (HUI, 2006). No entanto, o controle da temperatura durante o armazenamento, transporte e distribuição de produtos muitas vezes é falho, apresentando condições diferentes das recomendadas pelo fabricante (NYCHAS et al., 2008). Além disso, a temperatura dos refrigeradores domésticos e lojas de varejo, considerados os pontos críticos da cadeia de abastecimento, frequentemente apresentam valores que podem chegar até 25 °C (ZHANG et al., 2012; LIMBO et. al., 2010; CÁRDENAS et al., 2008; NYCHAS et al., 2008; JAMES, 1996).

Estudo realizado na Itália por Limbo et al. (2010) mostrou que a temperatura média durante o armazenamento doméstico é de 6,6 ºC, porém três (03) de cada quatro (04) refrigeradores da pesquisa apresentavam temperatura em torno de 8,4 ºC. A Figura 1 mostra a distribuição de frequencia das temperaturas mensuradas nesse estudo.

Figura 1 - Distribuição de frequência de temperatura no interior de refrigeradores domésticos



Fonte: LIMBO et al. (2010)

Abusos ou flutuações de temperatura influenciam na cinética de deterioração física e química e aceleram o crescimento de micro-organismos deteriorantes e patogênicos, o que causa problemas de qualidade e segurança, assim como perdas econômicas (FRANCIOSI et al., 2011; REDIERS et al., 2009). Portanto, monitorar e controlar a cadeia de frio desde a produção até o consumidor final é o ponto chave para a produção de alimentos seguros e com vida-útil nominal assegurada (KREYENSCHMIDT et al., 2010).

Nas indústrias, o monitoramento da temperatura é frequentemente realizado por meio de medições aleatórias do núcleo do produto. Durante a distribuição, esta é principalmente controlada por registradores de dados, que geralmente medem a temperatura ambiente. Apesar de apresentarem vantagens, esses sistemas de monitoramento somente são aplicáveis desde a produção até o fim do transporte (KREYENSCHMIDT et al., 2010; RAAB et al., 2008). As interrupções da cadeia de frio, que frequentemente aparecem nas últimas etapas, como no ponto de venda, no caminho do varejista para o consumidor e durante armazenamento doméstico, ainda não estão integradas neste conceito de monitoramento (LIMBO et al., 2010).

Uma alternativa para solucionar o problema seria o uso de embalagens inteligentes para alimentos contendo indicadores de tempo e temperatura, dispositivos que mostram uma mudança facilmente mensurável, dependente do tempo e temperatura, e que refletem o histórico de tempo e temperatura do produto alimentar ao qual estão anexados (GIANNAKOUROU et al., 2005; TAOUKIS; LABUZA, 1989).

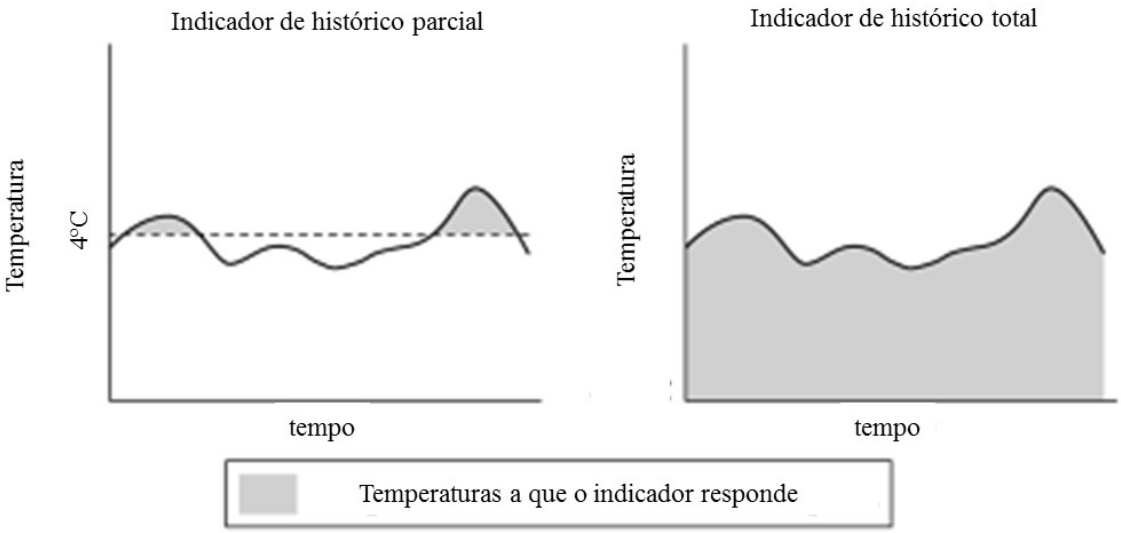
3. EMBALAGENS INTELIGENTES CONTENDO INDICADORES DE TEMPO E TEMPERATURA (ITT)

As embalagens inteligentes são definidas como um sistema que monitora a condição do alimento, fornecendo informações sobre a qualidade do produto embalado (AZEREDO, 2012; KERRY et al., 2006), que responde a mudanças específicas do alimento ou do ambiente que o cerca (YAM et al., 2005). Seus componentes "ativos" são os indicadores que sinalizam o resultado dessa medição (KERRY et al., 2006) e, sua classificação varia de acordo com o parâmetro monitorado, sendo encontrados, principalmente, os indicadores de tempo e temperatura (ITT), de frescor, de gases, biossensores, sensores de radiofrequência e associação de um ou mais parâmetros (BRIZIO, 2014; SOARES et al., 2009). Eles podem ser aplicados tanto para monitorar as condições de processamento, como de armazenamento (TAOUKIS, 2008).

Os Indicadores de empo e temperatura vêm sendo utilizados como uma ferramenta para monitorar o efeito da temperatura na qualidade de alimentos perecíveis (GIANNAKOROU et al., 2005). Esses indicadores fornecem um histórico do produto, mostrando as condições de temperatura ao qual o alimento foi exposto (LABUZA, 1996). O princípio de funcionamento destes indicadores baseia-se em uma mudança irreversível que pode ser mecânica, química, eletroquímica, enzimática ou microbiológica, normalmente expressa como uma resposta visível, sob a forma de deformação mecânica, desenvolvimento de cor ou movimento de cor. A taxa desta mudança é dependente da temperatura, deste modo, a resposta visível dá uma indicação cumulativa das condições de armazenamento do rótulo (MAI et al., 2011; KREYENSCHMIDT et al., 2010).

Indicadores de tempo e temperatura podem ser divididos em duas categorias: indicadores de histórico parcial, que não respondem a menos que algum limiar de temperatura pré-determinada seja excedida; e indicadores de histórico completo, que respondem continuamente a todas as temperaturas. Indicadores de histórico parcial são usadas para identificar as condições de temperatura abusivas e, portanto, não existe uma correlação direta entre a mudança da qualidade dos alimentos e a resposta desta classe de indicadores (ROBERTSON, 2013). A Figura 2 ilustra o princípio de funcionamento dos ITT supracitados.

Figura 2 - Ilustração do funcionamento de ITT de histórico parcial e de histórico total



Fonte: Adaptado de ROBERTSON (2013)

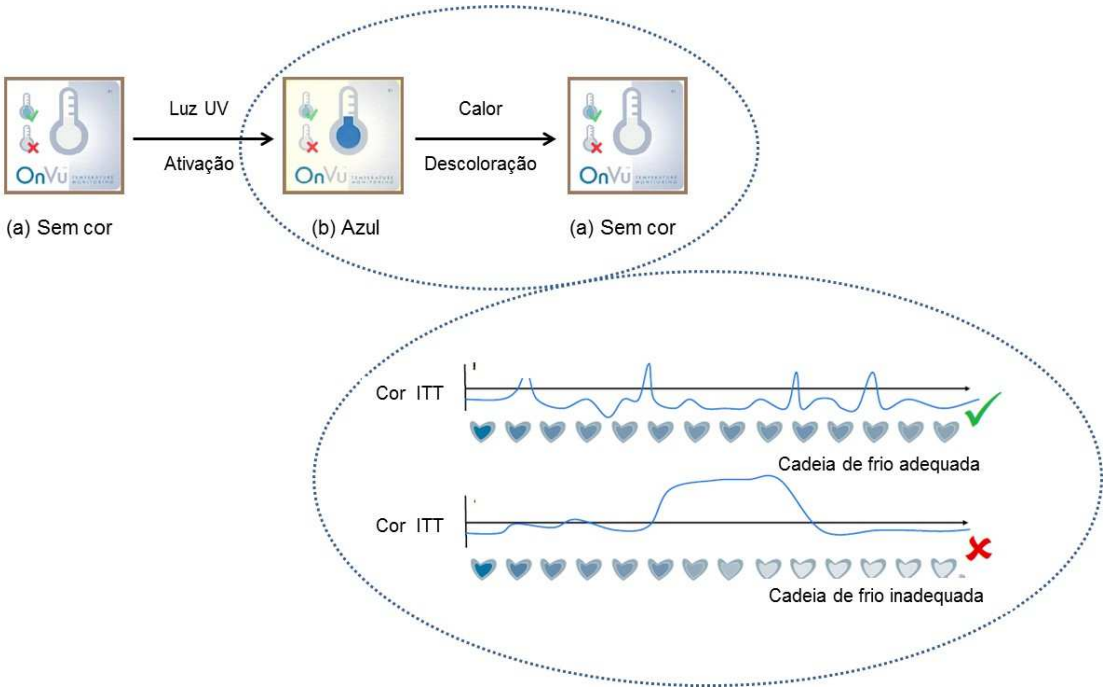
O principal requisito de um ITT de histórico completo constitui-se na apresentação de uma mudança clara e contínua, cuja taxa aumente com a temperatura e que não inverta quando a temperatura é diminuída. Além disto, há uma série de outros atributos desejáveis para se obter um indicador de sucesso. Assim, um ITT ideal deve apresentar as seguintes propriedades (CHOI et al., 2014; TAOUKIS; LABUZA, 2003; TAOUKIS, 2001): mudança contínua dependente do tempo-temperatura; resposta facilmente mensurável e irreversível; mudança correlacionável com a extensão de deterioração da qualidade e do prazo de validade residual do alimento; confiabilidade, dando respostas coerentes quando exposto às mesmas condições de temperatura que o alimento; baixo custo; flexibilidade de atuação, de modo que diferentes configurações podem ser adotadas para várias condições de temperatura, com períodos de resposta úteis de alguns dias como de vários meses; tamanho adequado, deve ser pequeno, facilmente integrado como parte da embalagem do alimento e compatível com um processo de embalagem a alta velocidade; período de vida longo antes do uso; estabilidade frente a demais alterações ambientais, que não a mudança de temperatura; resistência a abusos mecânicos normais; simplicidade e clareza na transmissão da mensagem pretendida ao público alvo, seja aos manipuladores de distribuição ou inspetores, ao pessoal da loja de venda ou aos consumidores; resposta tanto visualmente compreensível como adaptável à medição usando equipamentos eletrônicos adequados, de maneira a obter-se uma informação fácil e rápida, para o armazenamento e subsequente uso.

Na última década, numerosos sistemas de ITT têm sido propostos, dos quais apenas alguns tornaram-se protótipo e menos ainda chegaram ao mercado (ROBERTSON, 2013). Atualmente, os indicadores de tempo e temperatura de histórico total disponíveis comercialmente são (BRIZIO, 2014; ROBERTSON, 2013; ITENE, 2011; MAI, 2010):

a) OnVu® TTI da BIZERBA North America (www.bizerba.com) – consiste em uma etiqueta adesiva contendo uma tinta fotocrômica sensível à temperatura. Baseado em uma reação fotocrômica em estado sólido, sua tinta inteligente muda de cor, de incolor para azul, após irradiação com luz ultravioleta (para ativação). Depois de ativada a tinta reverte para o estado incolor a uma taxa que é dependente do tempo e da temperatura de armazenamento.

A Figura 3 elucida o princípio de funcionamento da *OnVu*® TTI, enquanto a Figura 4 mostra o *design* da etiqueta inteligente desenvolvida pela BIZERBA.

Figura 3 - Ciclo de reação do sistema fotocrômico da etiqueta *OnVu*®. A exposição à luz ultravioleta induz a coloração, enquanto o calor promove a reação inversa



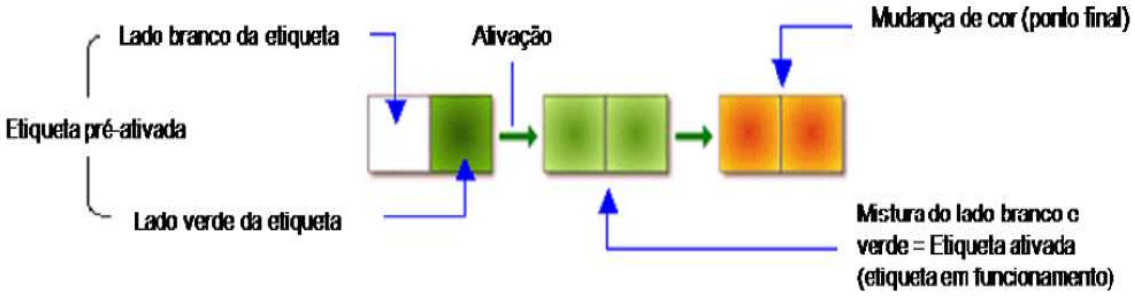
Fonte: Adaptado de BASF – *OnVu*® (2012)

Figura 4 - Modelo da etiqueta inteligente *OnVu*®

Fonte: BASF – *OnVu*® (2012)

b) Checkpoint® Indicator da VITSAB (Visual Indicator Tag Systems AB) (www.vitsab.com) - etiqueta adesiva que contém um dispositivo do tipo "bolha" com dois compartimentos: uma para a solução de enzima lipase e um indicador de pH (corante), e o outro para o substrato, consistindo principalmente de triglicerídeos. O indicador é ativado no início do período de monitorização por aplicação de pressão sobre a bolha de plástico, o que causa a quebra do selo entre os compartimentos. Os ingredientes são misturados e a reação prossegue com uma mudança de pH resultante em uma mudança de cor. O ponto, inicialmente de cor verde, torna-se progressivamente amarelo alaranjado quando o produto se aproxima do final do período de vida-útil programado. A reação é irreversível e irá prosseguir mais rapidamente à medida que a temperatura seja aumentada, e mais lenta quando a temperatura for reduzida (Figura 5).

Figura 5 - Principio de funcionamento do ITT elaborado pela *VITSAB*



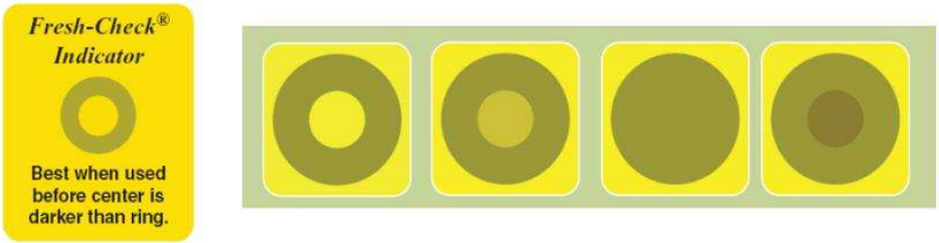
Fonte: BRIZIO (2014)

c) Fresh-Check® Indicator da TEMPTIME Corporation (www.fresh-check.com) – fundamentado em uma reação de polimerização em estado sólido, cuja resposta é uma mudança de cor mensurável. O indicador é composto por um pequeno círculo de um polímero cercado por um anel de referência impresso. O interior do círculo do polímero escurece se a embalagem

sofreu exposição a temperaturas desfavoráveis, e a intensidade da cor é medida e comparada com a escala de cores de referência no rótulo. Quanto mais rapidamente a temperatura aumenta, mais rapidamente as mudanças de cor ocorrem no polímero (Figura 6).

Figura 6 - (A) Modelo do rótulo *Fresh-Check*®; (B) Escala de cores apresentada pelo indicador *Fresh-Check*®

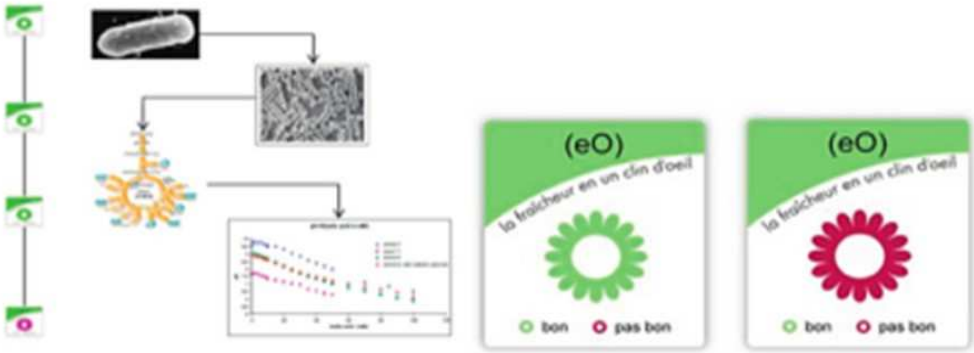
A B



Fonte: Adaptado de *Fresh-check* (2013)

d) eO® TTI da CRYOLOG (www.cryolog.com) - indicador colorimétrico adesivo que consiste em um meio nutritivo em forma de pétala de uma flor e um indicador de pH, o qual é responsável pela sua cor verde inicial. A etiqueta contém em seu interior bactérias do tipo ácido lácticas inoculadas de acordo com as especificações do produto alimentar ao qual será anexado. A etiqueta é então congelada até à sua ativação por descongelação. Durante o uso nos produtos alimentícios, dependendo do perfil de tempo / temperatura a que o produto for submetido, as bactérias situadas no interior do rótulo irão crescer utilizando a fonte de carbono do meio (contido no interior da etiqueta), com consequente liberação de ácido láctico. Como resultado, o pH do meio será reduzido a uma taxa proporcional ao crescimento bacteriano e a cor do indicador de pH se alterará para rosa (Figura 7).

Figura 7 - Imagem da etiqueta inteligente *eO*®



Fonte: Adaptado de BRIZIO (2014)

A aplicação de indicadores comerciais de tempo e temperatura para o controle de qualidade de produtos alimentícios tem sido estudada por alguns grupos de pesquisa, como por exemplo: Vainionpää et al. (2004) estudaram a aplicação de ITT de três marcas comerciais (*VITSAB, Fresh-Check e 3M TTI*) para o controle da qualidade de carne de frango embalada sob atmosfera modificada. Enquanto Ellouze et al. (2008), desenvolveram um modelo matemático para validar a resposta do eO® TTI da CRYOLOG. Mai *et al*. (2011) e Mai (2010) observaram a aplicação de ITT fotocrômicos para avaliar a temperatura na cadeia logística de bacalhau na Europa. Enquanto Brizio e Prentice (2014) validaram a aplicação dos indicadores inteligentes da marca *OnVu*® para monitorar a cadeia de abastecimento de produtos à base de frango, e Brizio et al. (2015) estudaram a aplicação do mesmo ITT para monitorar a cadeia logística de bijupirá no Brasil.

Segundo dados do *Instituto Tecnológico del Embalaje, Transporte y Logística* (ITENE, 2011) a empresa *Nestlé*, na Europa, utiliza os indicadores de tempo e temperatura em alguns de seus produtos alimentícios, como por exemplo, em molhos prontos para o consumo *Maggi*®. Enquanto, o indicador marca *Fresh-Check*® *Indicator* é utilizando para controlar a cadeia de frio de produtos da marca *Gourmet* na França e dos alimentos servidos a bordo dos aviões da companhia aérea *British Airways*, na Inglaterra

No entanto, apesar do grande potencial de contribuição para melhorar a gestão da vida-útil de alimentos, poucos sistemas de embalagens inteligentes ITT até o momento têm sido capazes de conseguir aplicação industrial (BRIZIO, 2014; ROBERTSON, 2013; MAI et al., 2011). As principais razões para a relutância dos produtores em adotar o seu uso são: custo, confiabilidade, aplicabilidade e obrigatoriedade (CHOI et al., 2014; PAVELKOVÁ, 2013).

3.1 Protótipos de Indicador de tempo e temperatura enzimáticos

Diversos mecanismos de funcionamento de ITT vem sendo estudados por pesquisadores com intuito de identificar combinações mais adequadas entre alimento e indicador. Dentre eles, podemos destacar os protótipos enzimáticos, ou seja, os que utilizam reações enzimáticas como princípio de funcionamento. Geralmente estes protótipos apresentam custos reduzidos quando comparados a ITT microbianos.

Pesquisa realizada por Wanihsuksombat et al. (2010) propôs a elaboração de um protótipo de ITT baseado na difusão do ácido láctico sob diferentes concentrações de substrato, na presença de um indicador de pH (passando irreversivelmente de verde para vermelho com a redução do pH do meio). As alterações de cor dos protótipos, associados com a difusão do ácido láctico, foram monitoradas em diferentes temperaturas de armamento (de 4 - 45 °C) e sua cinética foi calculada. No entanto, em temperaturas inferiores a 20ºC não foi observada alteração de cor nos ITT. Através da avaliação da cinética, os pesquisadores apontaram a possível aplicação destes protótipos em produtos como frutas e legumes.

Wu et al. (2013) desenvolveram um sistema em ITT baseado na reação química entre a enzima urease e a carbamida, na presença de fenolftaleína como indicador. As alterações de cor dos protótipos foram monitoradas em diferentes temperaturas e sua cinética foi calculada. Os resultados da pesquisa mostraram que a mudança de cor dos protótipos, de amarelo à vermelho, foi muito lenta a temperaturas inferiores a 20ºC. Segundo os autores, os protótipos desenvolvidos poderiam ser aplicados para o controle de algumas frutas.

Wu et al. (2015) elaboraram um protótipo de ITT baseado na reação entre a enzima lipase e o glicerol tributirato, na presença de azul de bromotimol como indicador de pH. Quatro diferentes concentrações de enzima foram testadas nos protótipos, e as suas mudanças de cor, de azul para verde, foram monitoradas sob diferentes condições de temperatura (6; 11; 16; 21 e 26 ºC). Modelos matemáticos para cada protótipo de ITT foram obtidos, expressando a relação entre as alterações de cor do ITT com tempo e temperatura de armazenamento. Avaliação da cinética de alteração de cor dos diferentes protótipos foram realizadas, cujos resultados apontam para a possível utilização dos protótipos em produtos alimentícios onde a perda de qualidade seja causada por oxidação lipídica e reações enzimáticas, como por exemplo, algumas frutas e legumes, e alguns pescados e mariscos.

3.2 O novo protótipo de Indicador de tempo e temperatura enzimático

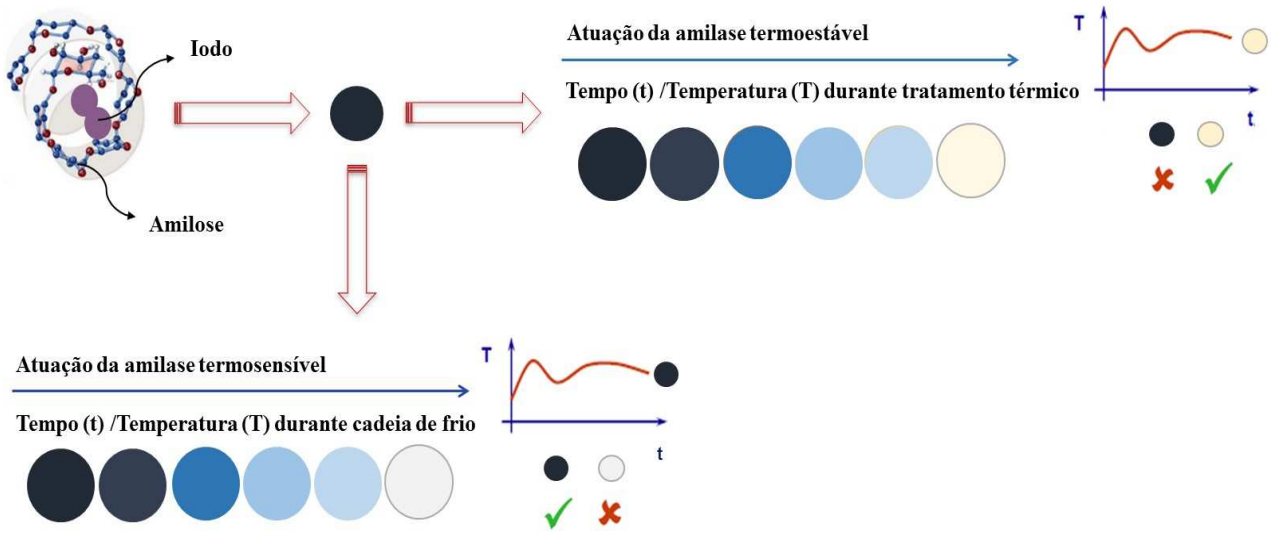
Buscando identificar uma combinação favorável de eficiência, viabilidade e confiabilidade, surge à ideia de desenvolver novos indicadores inteligentes baseados em uma reação entre a enzima α-amilase e o amido, que utiliza como principio de funcionamento a reação de complexação entre as moléculas de alta massa molecular que constituem o amido (amilose) e o iodo, com consequente formação de um composto de cor azul escuro, onde a atuação da enzima α-amilase sobre esse complexo amido-iodo causaria a redução da intensidade da cor azul, sendo que esta reação é dependente do tempo e da temperatura de armazenamento.

O complexo de inclusão formado entre a amilose e o iodo, causa uma coloração azul na mistura. O grau de adsorção do I_2, a partir de uma solução diluída de I_2 – KI, pela amilose nativa é de 19-20 %. Para que a cor azul apareça é necessário que a amilose tenha no mínimo 40 unidades de glicose. O mecanismo de reação envolve a inclusão de um arranjo linear de poli I_2-I^- na hélice da amilose. O I_2 parece interagir através de valências secundárias e sabe-se que os íons I^- são necessários, mas se desconhece a exata natureza do arranjo poli I_2- I^- (LEHNIMGER, 2008). A atuação de uma α-amilase sobre o complexo amido-iodo causa a redução da intensidade da cor azul em função do grau de hidrolise da estrutura do amido, pois ocorre a desestabilização da inclusão do I_2 na estrutura da amilose. O fim da reação de hidrólise do amido é evidenciada pelo desaparecimento da cor azul.

Os indicadores propostos constituem-se de materiais de baixo custo facilmente disponíveis, além de possuírem versatilidade de atuação em função do tipo e quantidade de amilase utilizada. Assim, podem ser utilizados para controle de tratamento térmico industrial (altas temperaturas), como para acompanhamento de cadeia de frio (baixas temperaturas). A Figura 8 ilustra o principio de funcionamento deste indicador inteligente enzimático.

De acordo com a Figura 8, os indicadores contendo amilase termoestável podem acompanhar tratamentos térmicos, onde a cor azul indica “sem tratamento térmico” ou “tratamento térmico insuficiente”, e a cor branca aponta para “tratamento térmico ok”. Já os ITT contendo amilase termosensível podem acompanhar a cadeia de frio de produtos frescos, onde a cor azul indica “cadeia de frio ok”, a cor branca evidencia “cadeia de frio em desacordo”.

Figura 8 - Principio de reação do sistema de ITT proposto. A mistura do iodo com o amido induz a coloração azul escura, enquanto a atuação da enzima amilase promove a descoloração do sistema a uma taxa dependente do tempo e da temperatura de armazenamento



Fonte: Esquema – autor; Estrutura da amilose - SPIER (2005)

3.2.1 Amido

O amido é o maior polissacarídeo de reserva das plantas e o segundo mais abundante depois da celulose. O material puro pode ser obtido por processos simples a partir de partes de plantas, como sementes, caules e raízes (SHANNON; GARWOOD, 1984). Nos alimentos, o amido é o principal constituinte de uma grande variedade de produtos, sendo responsável por sua estrutura, textura e/ou consistência. O amido encontra-se nos vegetais em pequenos grânulos, de características peculiares a cada espécie, contendo as duas frações que o constituem: amilose (de 15 a 30 %) e amilopectina (de 70 a 85 %) (TAPARELLI, 2005).

A amilose é um polímero de cadeia linear que contém ligações glicosídicas tipo α (1-4), em número que varia de 200 a 10.000 e apresenta um massa molecular de 1,5 x 10^5 a 10^6 g/mol. As ligações glicosídicas na configuração α conferem à amilose uma estrutura helicoidal dentro da qual podem se acomodar moléculas de iodo, formando um composto de inclusão de cor azul intensa. Esta reação é usada na determinação quantitativa de amilose e como indicador da presença de amido (WHITAKER et al., 2003).

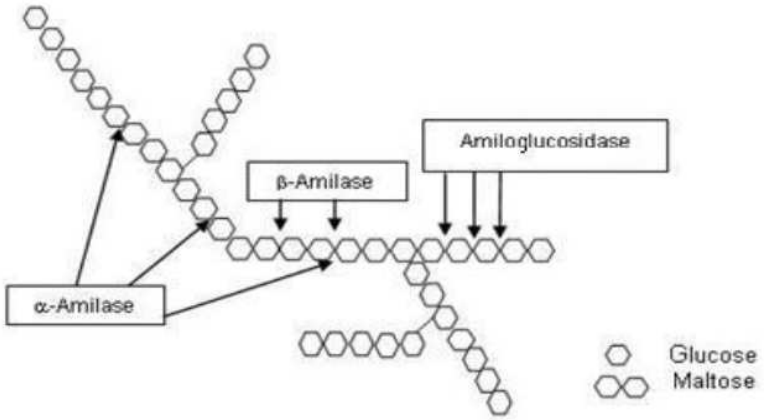
A amilopectina apresenta cadeia ramificada onde cadeias de 1-4 α-D-glucana possuem conexões axiais tipo 1-6 α-D-glucana a cada 20-25 unidades de glicose da cadeia linear e massa molecular da ordem de 5 x 10^6 a 10^8 g/mol (BANK; GREENWOOD, 1975).

Os polissacarídeos amilose e amilopectina estão presentes em diferentes proporções nos grânulos de amido e, em função de suas estruturas moleculares, conferem características de viscosidade, solubilidade, poder de gelificação ou de adesão, e outras mais, diretamente relacionadas à sua origem botânica (MUA; JACKSON, 1997).

Os grânulos de amido são insolúveis em água fria. A água, quando penetra nas áreas amorfas do grânulo, forma ligações de hidrogênio com os grupos hidrófilos livres da molécula de amido. Estas ligações mostram uma força fraca, mas o número de ligações no grânulo é tão alto que impede sua dissolução (SWINKELS, 1985). Portanto, os grânulos de amido incham levemente na água fria (10 a 15 % do diâmetro), mas o inchamento é reversível por secagem. Quando a temperatura da suspensão é maior que a força de ligação de hidrogênio, o grânulo de amido começa a inchar irreversivelmente e ocorre a gelificação. Durante a gelatinização ocorre formação de ligações entre moléculas de água e grupos hidroxilas, liberados pela entrada de água (HUI, 2006). A gelatinizaçaõ de um amido é o primeiro passo para o processo de hidrólise, pois as enzimas atacam muito lentamente o amido granular.

O processo biológico de hidrólise do amido se dá através da atuação das enzimas amilases ou amilotíticas. As amilases podem ser divididas em três grupos: as α-amilases, as quais rompem as ligações no interior do substrato (endoamilases); as β-amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilases); e as glucoamilases (amiloglucosidases), que liberam unidades de glicose do terminal não redutor das moléculas do substrato (GUPTA et al, 2003; SARIKAYA et al., 2000), conforme ilustra a Figura 9.

Figura 9 - Representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas



Fonte: SAJEDI et al. (2005)

O processo de degradação do amido pode ser acompanhado pelas reações com o iodo (iodo/iodeto de potássio) como mostra a Figura 10.

Figura 10 - Esquema reacional da hidrólise enzimática de amido utilizando iodo com indicador

$(C_6H_{10}O_5)_n$ Amido (Azul)	+ H_2O ——>	$C_{12}H_{22}O_{11}$ Maltose (incolor)	+	$(C_6H_{10}O_5)_{n-2}$ Amilo-Dextrina (violeta)
$(C_6H_{10}O_5)_{n-2}$ Amilo-dextrina (violeta)	+ H_2O ——>	$C_{12}H_{22}O_{11}$ Maltose (incolor)	+	$(C_6H_{10}O_5)_{n-4}$ Eritro-dextrina (vermelho)
$(C_6H_{10}O_5)$ Eritro-dextrina (vermelho)	+ H_2O ——>	$C_{12}H_{22}O_{11}$ Maltose (incolor)	+	$(C_6H_{10}O_5)_{n-6}$ Acro-dextrina (incolor)
$(C_6H_{10}O_5)_{n-6}$ Acro-dextrina (incolor)	+ H_2O ——>	$C_{12}H_{22}O_{11}$ Maltose (incolor)	+	$(C_6H_{10}O_5)_{n-8}$ Dextrina-limite (incolor)
$C_{12}H_{22}O_{11}$ Maltose (incolor)	+ H_2O ——>	2 $C_6H_{12}O_6$ Glicose (incolor)		

Fonte: WHITAKER et al. (2003)

3.2.2 α-Amilase

Dentre as enzimas amilolíticas, a mais importante é a α-amilase, pois desempenha um papel fundamental na conversão do amido em produtos de baixa massa molecular, que podem ser utilizados por outras enzimas do mesmo grupo (CARVALHO et al., 2008).

Pandey et al. (2005) definem a α-amilase como sendo uma enzima que hidrolisa as ligações α-1,4 dos polissacarídeos que possuem três ou mais unidades de D-glicose em união α-1,4. O ataque ocorre de forma não seletiva (tipo endoenzima) sobre vários pontos da cadeia simultaneamente, sendo que os primeiros produtos da hidrólise são sempre oligossacarídeos de 5 a 7 unidades de glicose. Após a ação, liberam unidades de glicose, oligossacarídeos de diferentes pesos moleculares e dextrinas. Também chamadas de enzimas dextrinizantes, estas enzimas são divididas em duas categorias, de acordo com o grau de hidrólise do substrato: α-amilases sacarificantes, que hidrolisam 50 a 60 % do amido produzindo glicose e maltose, e as liquidificantes, que quebram cerca de 30 a 40 % do substrato produzindo, predominantemente, maltoligossacarídeos, sendo responsáveis pela rápida redução da viscosidade do amido em comparação com as primeiras (DECLERCK et al., 2000).

De acordo com Whitaker et al. (2003), as α-amilases podem ser encontradas em mamíferos, vegetais superiores, fungos, bactérias e crustáceos. A α-amilase cristalina pode ser preparada a partir de sangue e pâncreas humanos, pâncreas do rato, cevada malteada, algumas espécies do gênero *Aspergillus, Pseudomonas e Bacillus*, enquanto que as enzimas purificadas são obtidas de sorgo malteado, soja, trigo maltado e pâncreas de alguns pássaros e crustáceos.

3.2.2.1 α-Amilases termoestáveis

As amilases produzidas por micro-organismos termofílicos têm recebido considerável atenção da indústria por serem termoresistentes e por possuírem características importantes, como estabilidade ao calor e pH. Entre as α-amilases bacterianas mais importantes industrialmente, estão as secretadas pelo gênero *Bacillus*. Dentro deste gênero, as espécies *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* e *B. licheniformis* são capazes de secretar enzimas ativas em altas temperaturas (superiores à 80 ºC) (SAJEDI et al., 2005).

3.2.2.2 α-Amilases termosensíveis

As espécies do gênero *Aspergillus* formam o grupo mais importante de micro-organismos utilizados para produção de α-enzimas empregadas na indústria alimentícia. Trata-se do gênero mais comum dos fungos filamentosos, além de ser um dos mais estudados (CARVALHO et al., 2008). De acordo com Wainwright (1995), existem cerca de 200 espécies de *Aspergillus*, comumente isolados do solo, de plantas em decomposição e do ar. As espécies de *Aspergillus* produzem um grande número de enzimas extracelulares, muitas das quais são aplicadas em biotecnologia. Dentre as espécies mais conhecidas encontram-se o *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e o *A. versicolor*. As enzimas produzidas por estes micro-organismos são denominadas termosensíveis, devido à baixa estabilidade apresentada a temperaturas acima de 60 ºC.

4. CONSUMIDORES DE ALIMENTOS X TECNOLOGIAS INOVADORAS EM EMBALAGENS ALIMENTÍCIAS

A busca crescente dos consumidores por alimentos de qualidade condiz com o aumento da expectativa de que esta qualidade será mantida entre a produção e o consumo (BRIZIO, 2014; ROBERTSON, 2013). Nesse contexto, as embalagens alimentícias ganharam novas

funções perante os consumidores. Se tradicionalmente eram utilizadas com o objetivo de conter e proteger passivamente o alimento, hoje assumem o papel fundamental para a comunicação, marketing, conveniência e, mais recentemente, indicação de qualidade (AZEREDO, 2012; GALIĆ et al., 2011).

Não há dúvida de que a relação entre o consumidor, a compra e a aceitação de um alimento é um fenômeno complexo. A atitude frente a um produto é influenciada por fatores relacionados com a psicologia do consumidor, bem como ao aspecto sensorial e de marketing. (JAEGER, 2006; ENNEKING et al., 2006).

O consumidor quer algo fácil de ser visualizado, atraente e que o convença de que será útil em casa. Nesse sentido, não se pode imaginar a embalagem separada do produto. Uma embalagem de qualidade chega a ser tão importante quanto o que está dentro dela. Portanto, se embalar de forma correta os produtos é função essencial da empresa, possibilitar o bom desembalar também deve ser considerado, juntamente com o *design*, rotulagem, material, confecção final e disposição do produto no ponto de venda (WADHERA; CAPALDI-PHILLIPS, 2014).

A embalagem apresenta-se como elemento no processo de decisão compra, sendo a principal mídia do produto. Seu *design* precisa interagir diretamente nesse processo, proporcionando impacto visual, emocional (criar vínculos), racional (motivar estímulos para fazer o consumidor migrar da observação à ação de compra) e de fidelização (manter a marca sempre atraente para conquistar o consumidor) (BUELOW et al., 2010).

O efeito da informação veiculada nas embalagens de alimentos tem sido amplamente estudado, mostrando sua importância na expectativa do indivíduo, assim como na avaliação do produto (WADHERA; CAPALDI-PHILLIPS, 2014; KOUTSIMANIS et al., 2012; CALEGUER et al., 2007). O consumidor pode usar a aparência, como um parâmetro de qualidade (JAEGER, 2006). Neste contexto, a embalagem exercerá papel fundamental na intenção de compra pois funciona como um meio para chamar a atenção e fornecer informação, afetando assim a percepção da qualidade (SLOAN, 2003).

Na busca da satisfação dos consumidores mais exigentes, as empresas, juntamente aos centros de pesquisa e universidades, têm investido no estudo de novas tecnologias, como no desenvolvimento de embalagens inteligentes capazes de fornecer informações aos consumidores sobre possíveis problemas de qualidade do produto embalado (BRIZIO, 2014). No entanto, pouco se sabe até onde a tecnologia utilizada para produzir esta inovação pode influenciar a aceitação dos produtos. Por isso, torna-se imprescindível o entendimento do

comportamento do consumidor, definido, segundo Sheth et al. (2001), como “as atividades físicas e mentais realizadas por clientes que resultam em decisões e ações, como comprar e utilizar produtos, bem como pagar por eles”. Assim, investigar o comportamento do consumidor antes de uma inovação em embalagem estar totalmente desenvolvida seria o ponto-chave para o seu sucesso.

CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO I

DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO INDICADOR DE TEMPO E TEMPERATURA ENZIMÁTICO PARA VALIDAÇÃO DA PASTEURIZAÇÃO DE PRODUTOS CÁRNEOS

BRIZIO, A.P.D.R; PRENTICE, C. 2015. Development of a new time temperature indicator for enzymatic validation of pasteurization of meat products. *Journal of Food Science,* 80(6), p.M1271-M1276 (Anexo I).

1. INTRODUÇÃO

O tratamento térmico denominado de pasteurização consiste em um dos métodos de conservação mais utilizados em alimentos (ARIAS-MENDEZ et al., 2014; SILVA; GIBBS, 2012). Por sua importância tecnológica e sanitária, as empresas são confrontadas com o desafio de provar que os seus produtos foram pasteurizados adequadamente (TUCKER et al., 2002).

No entanto, a validação deste tratamento pode ser ineficaz quando utilizam-se métodos convencionais de medida da temperatura (MEHAUDEN et al., 2007; MARRA; ROMANO, 2003). Assim, o uso de um indicador inteligente de tempo e temperatura (ITT) poderia ser uma alternativa complementar aos instrumentos de avaliação tradicionais, auxiliando na medição da temperatura individual de cada produto, de forma fácil, confiável e não destrutível.

Segundo Taoukis e Labuza (1989), ITT são dispositivos que contêm uma substância termicamente lábil como mecanismo de funcionamento. Estes podem ser anexados a superfície de uma embalagem, demonstrando o histórico de tempo-temperatura cumulativa de um alimento. Embora amplamente difundidos em produtos alimentícios frescos (BRIZIO; PRENTICE, 2014; MAI et al., 2011; ELLOUZE; AUGUSTIN, 2010; VAIKOUSI et al., 2009; TSIRONI et al., 2009; NUIN et al., 2008), ITT para acompanhamento visual, em tempo real, de processos térmicos industriais ainda são limitados.

Nesse contexto, enquadra-se o desenvolvimento deste trabalho que apresenta um novo indicador inteligente de pasteurização. O princípio de funcionamento do ITT proposto está baseado na reação de complexação entre o amido e o iodo (azul escuro), e na posterior atuação de uma enzima amilase sobre esse complexo, causando a redução da intensidade da cor azul até branca perolada. Esta reação de descoloração é dependente do tempo e da temperatura de pasteurização ao qual o protótipo é exposto. Assim, propõe-se elaborar, caracterizar e validar um novo indicador inteligente de tempo e temperatura enzimático para acompanhar de forma precisa e em tempo real a pasteurização de produtos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização da enzima

A enzima utilizada foi uma α-amilase comercialmente denominada de BAN® 480L (*Novozymes* S/A, Bagsvaerd, Dinamarca). A BAN® 480 L contém uma endoamilase bacteriana

termoestável produzida por fermentação submersa de uma cepa selecionada de *Bacillus amyloliquefaciens*. A Tabela 1 mostra a composição e as principais caracteríticas da BAN® 480L.

Tabela 1 - Composição e caracteríticas da enzima BAN® 480 L (*Novozymes* A/S)

Ingredientes	% p/p
Água, CAS* nº7732-18-5	44
Glicerol, CAS nº56-81-5	40
Cloreto de sódio, CAS nº7647-14-5	11
α - amilase, CAS nº9000-90-2	5
Características	**Valor/Unidade**
Densidade	1,25 g/mL
pH a 25ºC ótimo	5,0
Temperatura ótima	80ºC
Atividade Enzimática**	60,31 kU

*Chemical Abstracts Service.

**A atividade enzimática da BAN® 480 L é fornecida pela endoamilase CAS nº9000-90-2 que hidrolisa ligações (1,4)-alfa-D-glicosídeo em polissacarídeos amídicos. Esta atividade foi calculada segundo metodologia recomendada por *Novozymes* (2012), onde uma unidade de atividade da enzima (U) corresponde a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 mg de maltose a partir do amido em cinco minutos de reação em pH 5,0 a 50 °C.

Fonte: Ficha de Informação do Produto – *Novozymes* (2012)

2.2 Estimativa de custo das matérias-primas utilizadas na elaboração dos protótipos de ITT

Foi realizada uma estimativa dos custos das matérias-primas utilizadas na obtenção dos protótipos, obtendo o preço/unidade para cada ITT.

2.3 Caracterização do tratamento térmico

O tratamento térmico foco deste estudo foi a pasteurização de presunto de 3,5 kg com formato oval. Para caracterizar o tratamento térmico industrial deste produto foram consultadas nove empresas distribuídas em diferentes regiões do Brasil, todas com Serviço de Inspeção

Federal (SIF), que responderam questões sobre particularidades dos seus processos térmicos (dados não mostrados).

Seguindo orientações das empresas consultadas, foi realizado um estudo de penetração de calor[1], onde o processamento térmico industrial foi avaliado quanto sua: 1) Conformidade no alcance da temperatura de 70-72 ºC no interior ("ponto frio") de todas as peças de presunto pós pasteurização (USDA, 2012; BRASIL, 2000); 2) Conformidade nas análises sensoriais, físico-químicas e microbiológicas recomendadas pelas legislações (BRASIL, 2009; BRASIL, 2001) para produtos pós pasteurização (dados não mostrados). Através dos resultados foi possível definir as condições de pasteurização deste estudo, que são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições de pasteurização (tempo/temperatura) definidas para este estudo*

Tempo (min)	Temperatura (ºC)
0 – 60	60
61 – 150	75
151 – 180	85

*****Após aquecimento as peças de presunto foram resfriadas e matidas a temperatura ≤ 7 ºC.

Fonte: autor

2.4 Preparação dos protótipos de ITT

O iodo (I_2) utilizado foi solubilizado em Iodeto de Potássio (KI) (LABYNTH Produtos para Laboratório Ltda., São Paulo, Brasil). Uma solução contendo 0,1g I_2 /1,0g KI em 100 ml de água destilada foi preparada. Concentração final de I_2 na solução de 0,004 mol/L.

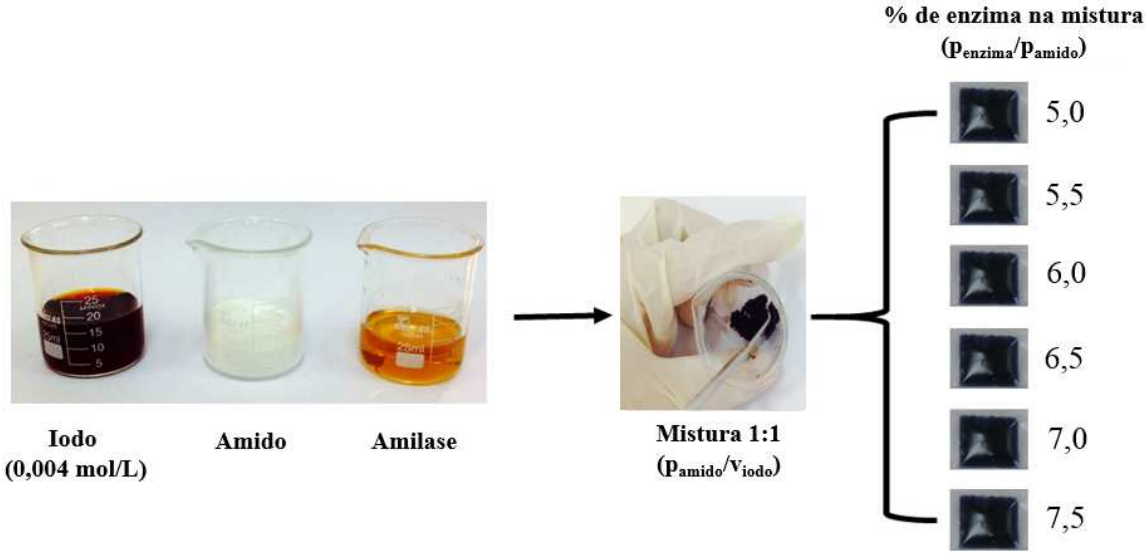
Para a elaboração dos protótipos de ITT, amido solúvel de batata (LABYNTH Produtos para Laboratório Ltda., São Paulo, Brasil) foi misturado à solução de I_2 (0,004 mol/L) na proporção de 1:1 p/v, tornando a mistura azul intensa. Depois disso, foi adicionado α – amilase BAN® 480 L em diferentes quantidade para obter 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 % de enzima na mistura (p_{enzima}/p_{amido}), elaborando seis diferentes protótipos de ITT.

Cada protótipo foi homogeneizado e 1,5 g da mistura colocada em uma pequena embalagem plástica (3x3 cm) de filme coextrusado de poliamida e polipropileno (Modelo *ULTRA THERM*, Maquiplast Plásticos Especiais Ldta., São Paulo, Brasil), e finalmente fechado

[1] Teste de validação destrutivo, onde todas as peças de presunto cozidas continham um controlador de temperatura no seu interior, inviabilizando a utilização deste teste industrialmente para confirmação cotidiana de pasteurização.

com auxílio de máquina seladora (Modelo Selamult, R. BAIÃO Indústria e Comércio Ltda., Minas Gerais, Brasil), conforme mostra a Figura 1.

Figura 1 - Procedimento de obtenção do protótipo de Indicador de tempo e temperatura



Fonte: autor

2.5 Desempenho dos protótipos durante simulação de processamento térmico

Foram investigadas diferentes concentrações de amilase nos ITT com objetivo de analisar a influência da quantidade de enzima sobre o processo de descoloração dos protótipos submetidos a condições de pasteurização, e posteriormente, encontrar a concentração adequada para sua utilização durante tratamento térmico de presuntos.

Seguindo as condições de tempo/temperatura caracterizadas na Tabela 2 foram realizadas simulações de tratamento térmico industrial utilizando banho de água (Modelo Q – 215-1/2, QUMIS Aparelhos Científicos Ltda., São Paulo, Brasil), cuja temperatura foi monitorada a cada 2 min por coletores de dados (Data Logger DHT5012, Perceptec, São Paulo, Brasil).

Os protótipos foram elaborados, anexados em placas plásticas e colocados em banho de água (Tabela 2). A descoloração das etiquetas foi avaliada a cada 15 min de forma visual e também mensurada através da utilização de colorímetro (Modelo Chroma Meter CR-400/410, Konica Minolta, Osaka, Japão) mediante o sistema *CIELab* (iluminante D_{65}), obtendo a dimensão do *chroma* b*, coordenada que quantifica a variação de cor de amarelo (b* +) à azul (b* -). O procedimento foi repetido dez vezes, sempre em triplicata.

Com os resultados foi realizada uma comparação entre a descoloração dos protótipos e as condições durante o tratamento térmico, buscando encontrar o protótipo cuja resposta de cor final, definida neste estudo como *chroma* b* = 9,0 (Figura 2), coincidisse de forma precisa com o fim do processo de pasteurização. Assim, foi escolhido um protótipo como o novo ITT. Somente a concentração de amilase deste protótipo foi utilizada nas análises subsequentes.

Figura 2 - (A) Coloração do protótipo antes do tratamento térmico (*chroma* b*= -1,95); (B) Aparência do ITT quando nenhuma alteração adicional na cor azul poderia ser medida no rótulo (*chroma* b*= 9,0)

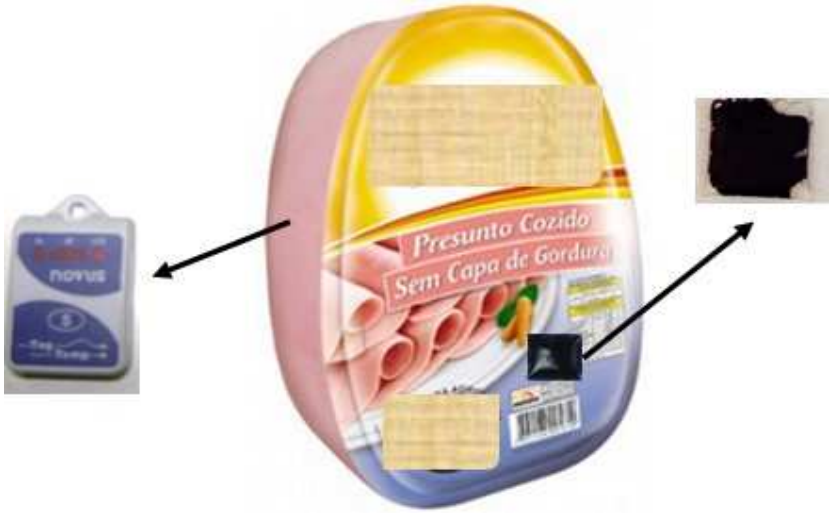
A B

Fonte: autor

2.6 Aplicabilidade industrial do novo ITT

Buscando avaliar a aplicação industrial do novo ITT foi realizado, em uma planta fabril, um estudo do seu comportamento durante pasteurização de presuntos. Para a realização dos testes, todas as peças de presunto de 3,5 kg ingressaram na estufa de cozimento a vapor (Modelo Brusinox Indústria e Comércio de Máquinas e Equipamentos Ltda., São Paulo, Brasil) contendo um coletor de dados no seu interior (“ponto frio”) e um ITT colado na superfície da sua embalagem primária (Figura 3). A temperatura ambiente da estufa também foi mensurada através do uso de dez sensores PT100 (Série TRS, Alutal® Controle Industriais, São Paulo, Brasil) localizados em diferentes lugares do equipamento.

Figura 3 - Ilustração do preparo de amostras contendo o controlador de temperatura *data logger* no interior do produto ("ponto frio") e o ITT aderido* na embalagem primária



*ITT aderido a embalagem do produto com Fita 369 Tartan (3M do Brasil, São Paulo, Brasil).

Fonte: autor

Durante o cozimento, programado para seguir as condições de tempo/temperatura da Tabela 2, a temperatura ambiente da estufa e a temperatura interna das peças de presunto foi continuamente monitorada com auxílio dos instrumentos de medição supracitados. A cor dos ITT foi avaliada a cada 15 min de forma visual e com uso de colorímetro, através da retirada de amostras aleatórias de peças de presunto do interior da estufa. Ao final do tratamento térmico todos os ITT foram avaliados.

Os dados mensurados foram confrontados com os resultados de cor dos ITT, correlacionando a descoloração do indicador com a temperatura interna nas peças de presunto.

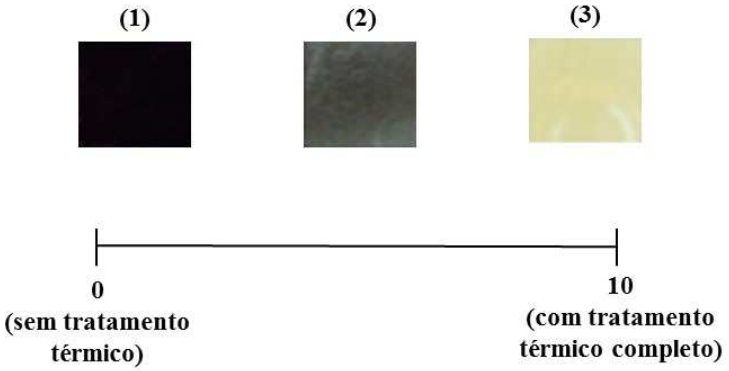
2.6.1 Interpretação da cor apresentado pelo indicador inteligente

Buscando avaliar a interpretação da resposta de cor do indicador inteligente, 80 funcionários de empresas frigoríficas responderam ao questionário apresentado na Figura 4, relacionando em uma escala não estruturada sua percepção em relação a cor do indicador e o andamento do tratamento térmico.

Figura 4 - Questionário utilizado na avaliação da interpretação da resposta de cor apresentada pelo indicador inteligente

Estamos desenvolvendo uma etiqueta para utilização durante a pasteurização dos produtos cárneos elaborados pela sua empresa. Quando a cor desta etiqueta for azul marinho escuro mostra que o produto não passou por nenhum tratamento térmico (sem pasteurização) e quando a cor for branca perolada evidencia que o produto já foi pasteurizado (com tratamento térmico completo).

Observe as cores apresentadas pelas etiquetas numeradas abaixo, após marque na escala onde cada uma das etiquetas mostra sua percepção de andamento do tratamento térmico, onde 0 corresponde a "sem tratamento térmico" e 10 "com tratamento térmico completo".



Fonte: autor

2.7 Desempenho do ITT após estoque sob diferentes condições de temperatura

Para operacionalizar a utilização industrial do novo ITT enzimático torna-se importante validar as suas condições de estoque antes do uso. Por isso, um estudo para avaliar seu desempenho após períodos sob diferentes condições de armazenamento foi realizado. Para isto, ITTs foram elaborados e imediatamente estocados sob condições de temperatura ambiante (até 25ºC) em bancada de laboratório, resfriamento (0-4 ºC) em incubadora de alta precisão (Modelo MA 415/S, Marconi, São Paulo, Brasil) e congelamento (-12 ºC ±1 ºC) em freezer (Modelo Intelligent Freezer 32, Robert Bosch Ltda., São Paulo, Brasil).

No decorrer de quatro meses os ITTs estocados foram avaliados. Amostras foram retiradas semanalmente das condições de estoque e expostas a temperatura ambiente durante 30 min, após foram anexadas em placas plásticas e colocadas em banho de água por 60 min a 65 ºC, 90 min a 75 ºC, e 30 min a 85 ºC (simulação de cozimento industrial – Tabela 2). Durante o aquecimento, a descoloração das etiquetas foi avaliada visualmente e mensurada através de colorímetro a cada 15 min. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Ao final de cada simulação foi realizada a comparação entre a resposta de cor do ITT e as condições durante o tratamento térmico.

O fim da vida-útil do ITT foi definido, para cada condição de armazenamento, como o tempo transcorrido entre o primeiro dia de estoque até a primeira avaliação de simulação de cozimento não conforme, ou seja, quando a cor do ITT não evidenciou o fim do cozimento (*chroma b** = 9,0) após 3h de tratamento.

2.8 Análises dos dados

O Microsoft Excel 2012 (Microsoft, Redmont, WA, EUA) foi utilizado para calcular médias, desvios padrão e construir gráficos.

Os resultados mensurados de *chroma* b* foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) e posterior Teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p<0,05$), através do programa Statistica 5.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 1 são apresentados os valores de cada matéria-prima utilizada na elaboração dos protótipos de ITT e, posteriormente, o custo em reais por ITT.

Quadro 1 - Valores das matérias-primas que compõe os protótipos de ITT e o custo por unidade

Materiais	Preço	Custo (R$)/ITT					
		5,0 %*	5,5%	6,0%	6,5%	7,0%	7,5%
Amido Solúvel	27,80 R$/500 g	0,088					
Amilase BAN 480L	42,5 R$/1000 g	0,00000074	0,00000094	0,0000011	0,0000013	0,0000015	0,0000017
Iodeto de Potássio	68,20 R$/100 g	0,081					
Iodo	74,90 R$/100 g	0,022					
Embalagem plástica	15,20 R$/1000 un.	0,060					
Custo/unidade		**0,25/ITT**					

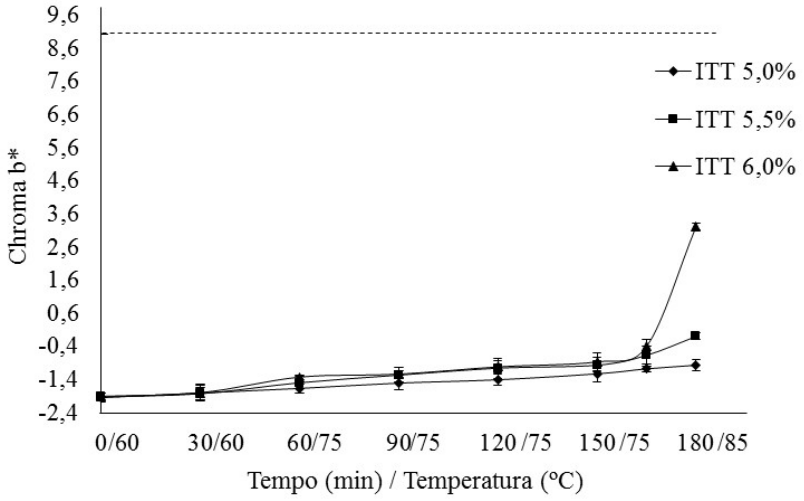
*Concentração de amilase no ITT.

O preço é um dos principais fatores da relutância industrial em adotar o uso de ITT em alimentos (CHOI et al., 2014). Por isso, a obtenção de sistemas de indicadores economicamente viáveis é o ponto chave para estimular sua utilização. Neste trabalho, o custo por unidade de ITT obteve um baixo valor, de aproximadamente vinte e cinco centavos.

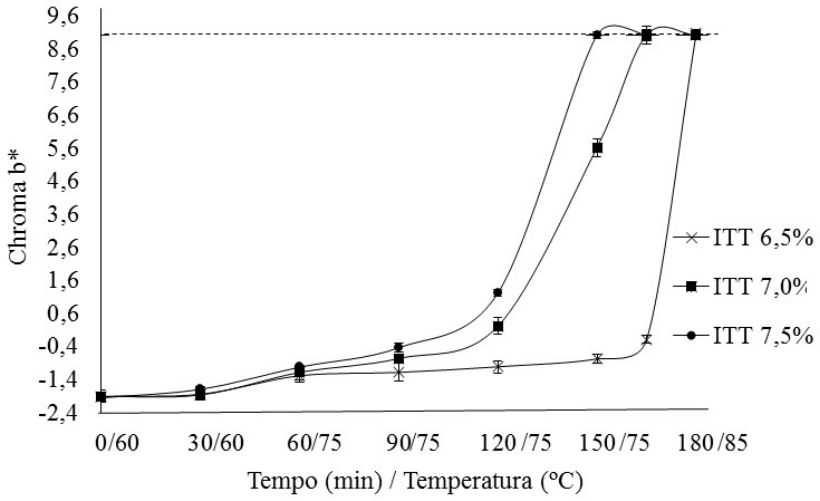
A Figura 5 mostra os resultados de cor dos protótipos de ITT mensurados durante simulação de processo térmico industrial utilizando banho de água.

Figura 5 - Descoloração dos protótipos de ITT: (A) 5,0, 5,5 e 6,0% de amilase e, (B) 6,5, 7,0 e 7,5% de amilase; durante aquecimento em banho de água

(A)



(B)



Onde *chroma* b*= 9,0 representa a cor dos protótipos que indica “fim de pasteurização”.

As barras de erro representam o desvio padrão entre as medições.

A resposta de cor dos protótipos obteve boa reprodutibilidade durante o aquecimento, apresentando baixos desvios (de 0,1 a 0,27, observados na Figura 5) entre os valores das triplicatas mensuradas em cada ITT. Segundo Mai et al. (2011) Mehauden et al. (2007) e

Shimoni et al. (2001), a precisão de um sistema de indicador inteligente é uma característica imprescindível para a sua adequada implementação.

A descoloração dos protótipos mostrou uma dependência proporcional a quantidade de enzima e a temperatura do meio. No entanto, mesmo sob altas temperaturas (de 150 a 180 min – 85 ºC) os protótipos contendo concentrações menores de amilase (5,0 e 5,5 %) não sofreram mudanças significativas de cor, enquanto os ITT com quantidades superiores de enzima tiveram sua taxa de resposta acelerada quando expostos as mesmas condições de tempo/temperatura.

Apenas os protótipos com 6,5; 7,0 e 7,5 % de amilase alcançaram o valor de *chroma* b* = 9,0 durante as simulações (Figura 5B), ou seja, após aproximados 150, 165 e 180 min de aquecimento, respectivamente, não foi possível verificar nenhuma resposta de cor adicional nestes ITT. Assim, considerando *chroma* b* = 9,0 como a cor que indica "fim de pasteurização", o protótipo de ITT contendo 6,5 % de amilase obteve uma descoloração final coincidente com o término da simulação de pasteurização estudada.

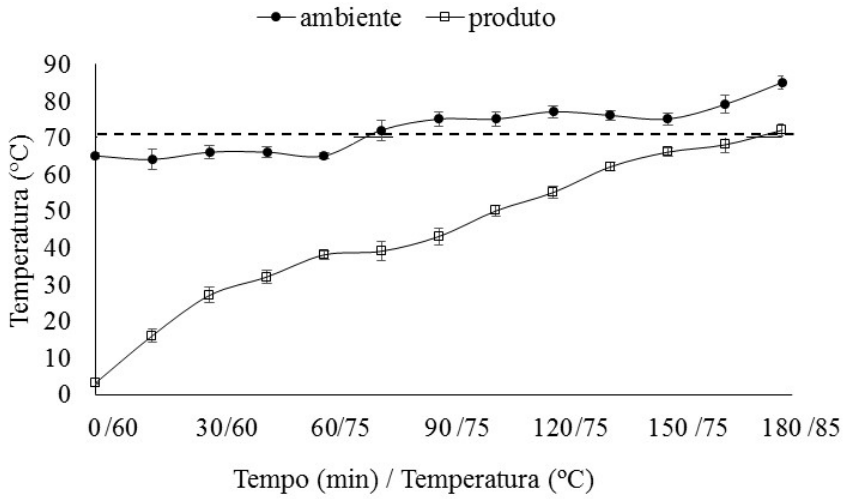
Segundo Whitaker et al. (2003), durante o aquecimento de uma mistura de amido e iodo ocorre a descoloração do azul escuro em cores sequencias que evidenciam a degradação do amido à maltose, onde a cor roxa corresponde a presença de amilodextrina + iodo; cor morrom-avermelhada representa eritrodextrina + iodo; a cor amarela escura sinaliza acrodextrina + iodo; e, por fim, a cor branca-amarelada mostra a presença de maltose + iodo. Durante o aquecimento do protótipo com 6,5 % de amilase as mudanças visualmente perceptíveis da cor roxa até a cor branca-amarelada ocorreram somente durante o último estágio do aquecimento, quando a temperatura permaneceu a 85 ºC por 30 min causando a gelatinização do amido contido no ITT, e assim, propiciando uma condição ideal de atuação da amilase sobre a estrutura do amido (situação ilustrada na Figura 6). Esta característica parece favorecer o uso industrial deste ITT na validação da pasteurização de produtos, pois evitaria erros de sinalização inadequada antes do término efetivo do processo.

Figura 6 - Cores apresentadas pelo protótipo de ITT com 6,5 % de amilase durante aquecimento em banho de água

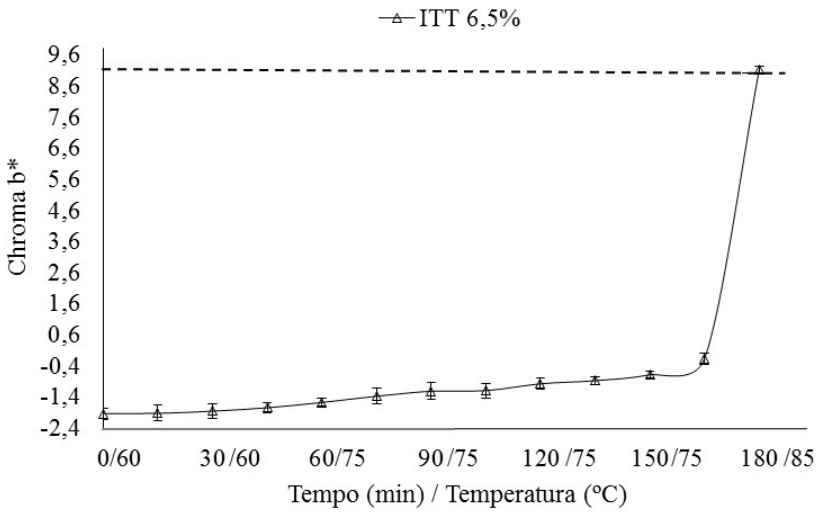
Para conhecer o verdadeiro potencial de utilização do protótipo de ITT contendo 6,5 % de enzima foi necessário avaliar o comportamento deste indicador em condições reais de pasteurização industrial. Assim, a Figura 7 mostra os resultados obtidos durante a aplicação do novo ITT no cozimento de presuntos em planta fabril.

Figura 7 - (A) Temperaturas (ambiente e produto) mensuradas no cozimento industrial; (B) Descoloração dos ITT (6,5 % de amilase) durante cozimento industrial

(A)



(B)



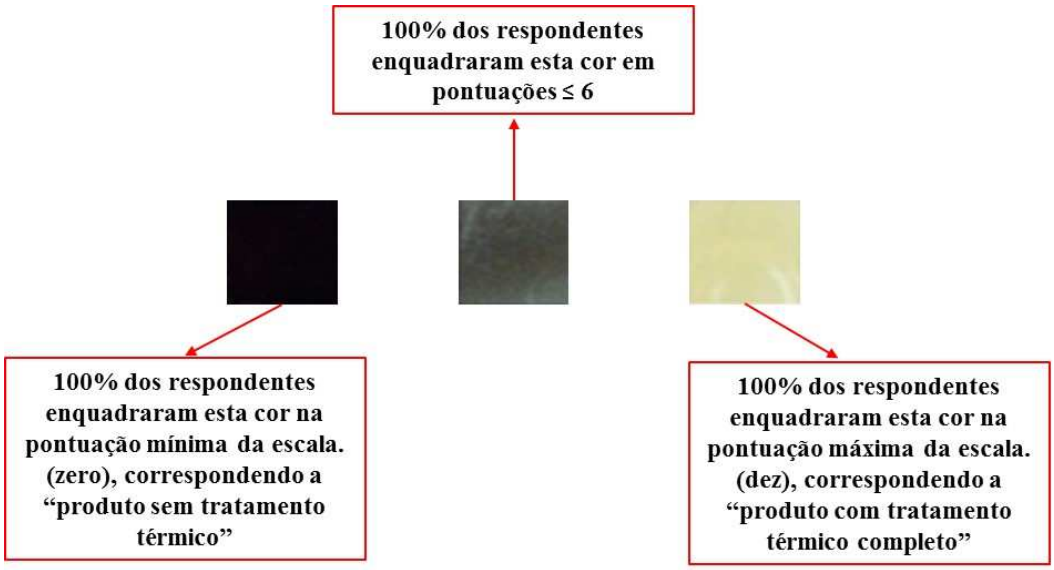
Onde (A) Temperatura do produto de 70 ºC indica fim do cozimento e, (B) *chroma* b*= 9,0 representa a cor do ITT que indica "produto adequadamente pasteurizado".
As barras de erro representam o desvio padrão entre as medições.

De acordo com Silva e Gibbs (2012) e Fai et al. (2011), o processo de cocção de presuntos deve ser programado de maneira que atinja no produto final uma capacidade de conservação, estabilidade da estrutura e da cor, rendimento e sabor desejáveis. Para isso, durante a cocção a temperatura externa deve ir aumentando de forma escalonada até a obtenção de uma temperatura interna de 70-72 ºC, que sinaliza o fim do tratamento térmico. Assim, considerando neste estudo a temperatura interna do produto de 70 ºC como indicativo de fim do cozimento (Figura 7A), e o valor de *chroma* b* = 9,0 como a cor dos ITT que evidencia visualmente o produto adequadamente pasteurizado (Figura 7B), ambos (produto e ITT) alcançaram estes índices de forma coincidente com o término do tratamento térmico industrial avaliado. Na Figura 7B ainda pode ser observado que a resposta de cor dos ITT obteve boa reprodutibilidade durante o aquecimento industrial, apresentando baixos desvios (de 0,18 a 0,32) entre os valores mensurados nas etiquetas para cada condição de tempo avaliada.

Comparando os resultados médios de *chroma* b* mensurados nos ITT (6,5 % de amilase) durante simulação de tratamento térmico em banho de água (Figura 5B) com aqueles obtidos no cozimento industrial (Figura 7B) não foi detectada diferença significativa ($p > 0,05$), o que evidencia a precisão do novo sistema de indicador desenvolvido.

A Figura 8 ilustra os resultados obtidos durante a avaliação da cor dos ITT por funcionários de empresas frigoríficas que processam termicamente produtos cárneos.

Figura 8 - Esquema apresentando os resultados da aplicação de questionário (Figura 4) a funcionários de empresas frigoríficas



Os resultados evidenciam que a resposta de cor do indicador foi facilmente compreensível pelos funcionários das empresas, onde todos correlacionaram corretamente a cor do indicador inteligente com o respectivo estágio do tratamento térmico. Esta facilidade na compreensão da resposta de cor apresentada pelo indicador é uma característica indispensável no uso de ITT industrialmente, pois evita erros de sinalização inadequada pelos operadores e funcionários. De acordo com Taoukis (2008), o sinal da resposta é o parâmetro que determina a facilidade de leitura de um ITT. Este deve apresentar uma mudança compreensível e perceptível pelo público alvo. Assim, a configuração deve ser de fácil leitura visual, com consequente tradução da mensagem correta para todos.

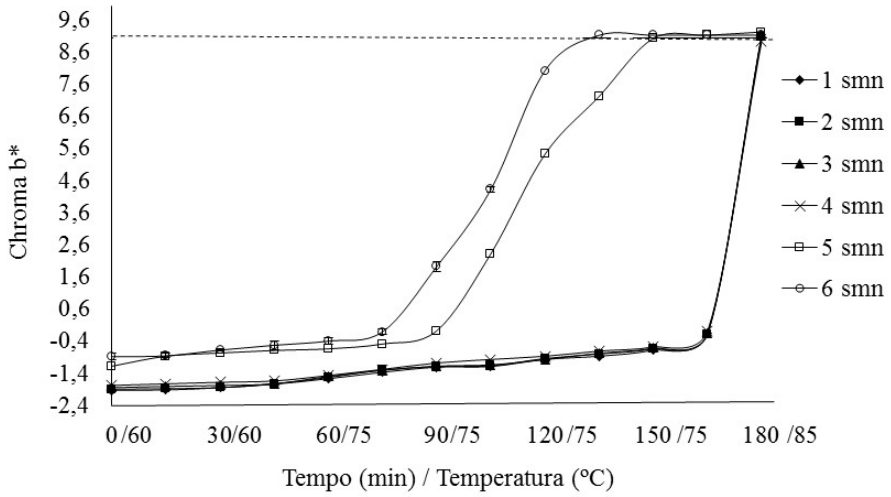
Indicadores inteligentes podem ser ferramentas valiosas na avaliação da eficiência de processos (PACQUIT et al., 2007; MEHAUDEN et al., 2007). De acordo com UBABEF (2014), há um grande interesse do setor industrial no uso de técnicas não destrutivas e confiáveis para validar processos térmicos. Assim, a utilização do novo ITT pode favorecer os produtores de alimentos a otimizar seus processos de pasteurização e entregar ao consumidor produtos com segurança garantida, ja que, atualmente há uma constante pressão dos consumidores por segurança alimentar e os regulamentos de segurança e qualidade dos alimentos encontram-se cada vez mais rigorosos.

No entanto, erros em medições usando ITT são comuns devido a ausência de informações necessárias para seu uso adequado, como por exemplo, o período de vida-útil e as condições apropriadas de estoque. Por isso, buscando sanar esta carência e aprimorar a

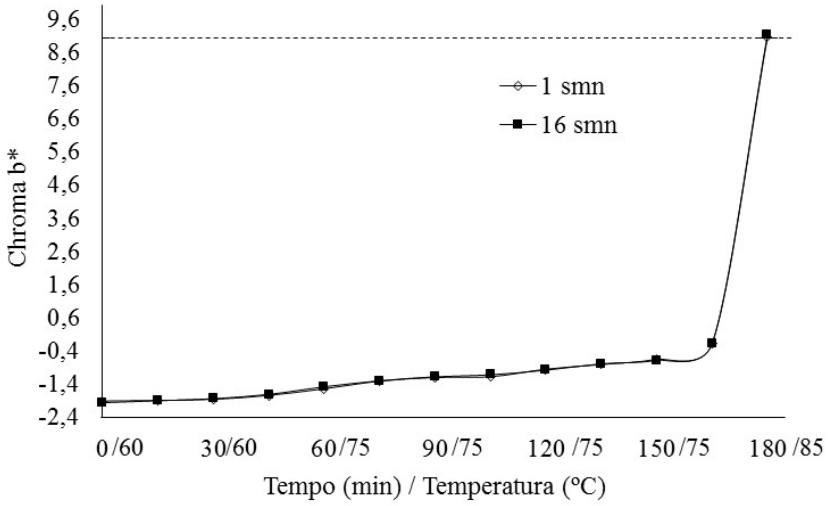
aplicação do novo ITT desenvolvido, foi realizado um estudo que estimou a sua vida-útil sob diferentes condições de armazenamento, cujos resultados são mostrados na Figura 9.

Figura 9 - Descoloração apresentada pelos ITT (6,5 % de amilase) durante aquecimento em banho de água realizado após: (A) a primeira até a sexta semana de armazenamento a temperatura ambiente; (B, C) uma e dezeseis semanas de armazenamento sob (B) refrigeração e (C) congelamento

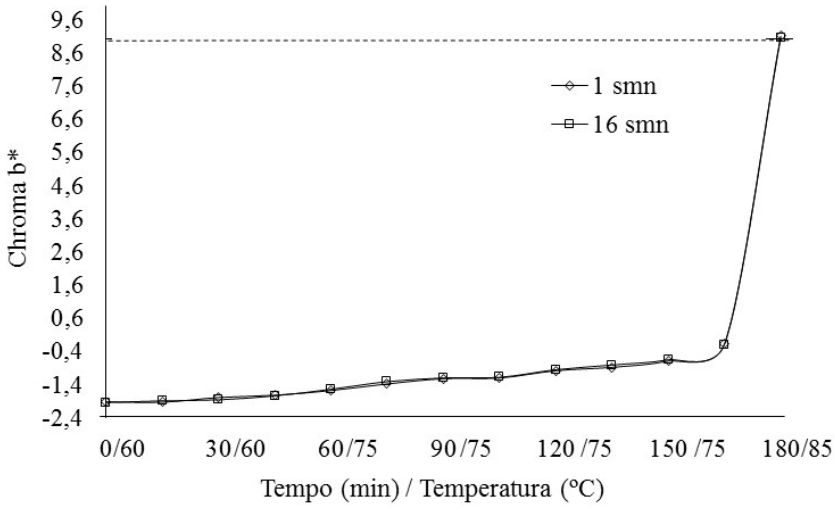
(A)



(B)



(C)



Onde *chroma* b*= 9,0 representa a cor do ITT que indica “fim de pasteurização” e smn = semanas.

Os ITT armazenados a temperatura ambiente (Figura 9A) a partir da quinta semana de estoque começaram a apresentar uma coloração azul menos intensa, provavelmente devido a atuação da enzima sobre a estrutura do amido. Esta descoloração inicial causou uma alteração no comportamento do indicador durante o aquecimento, com isso, o valor de *chroma* b*= 9,0 foi atingido antecipadamente. Assim, para esta situação de estoque, recomenda-se a utilização do ITT em no máximo quatro semanas de armazenamento.

Condição diferente foi constatada na Figura 9B e 9C, onde observa-se que os ITT armazenados sob refrigeração e congelamento obtiveram o mesmo desempenho durante processo de aquecimento em todo o período avaliado (dezesseis semanas). Os resultados evidenciam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores médios de *chroma* b* mensurados entre a primeira e última semana de estoque para cada condição de tempo avaliada. Com isso, os autores sugerem o estoque do novo ITT sob refrigeração, condição que se mostrou a mais segura e econômica para a manutenção da precisão do indicador por períodos prolongados de armazenamento.

4. CONCLUSÃO

A resposta de cor dos protótipos de ITT elaborados foi visualmente interpretada, como adaptável à medição usando equipamento adequado, apresentando boa reprodutibilidade durante o processo de descoloração em todas as condições estudadas.

Para as condições avaliadas, o protótipo de ITT contendo 6,5 % de amilase foi aquele cujo resultado melhor se adequou à utilização na validação de cozimento de presuntos. Nestas condições, este pequeno indicador inteligente colado à embalagem primária do produto indicou visualmente o processo de pasteurização de forma fácil, precisa, não destrutiva e com baixo custo. Podendo ainda ser armazenado sob refrigeração sem alterar seu desempenho.

ARTIGO II

DESENVOLVIMENTO DE INDICADOR ENZIMÁTICO INTELIGENTE PARA ACOMPANHAMENTO DINÂMICO DA VIDA-ÚTIL DE PRODUTOS ALIMENTÍCIOS

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

1. INTRODUÇÃO

Nas indústrias, o monitoramento da temperatura é frequentemente realizado por meio de medições aleatórias do núcleo do produto. Durante a distribuição, esta é principalmente controlada por registradores de dados, que geralmente medem a temperatura ambiente. Apesar de apresentarem vantagens, esses sistemas de monitoramento somente são aplicáveis da produção até o fim do transporte (BRIZIO, 2014; KREYENSCHMIDT et al., 2010; RAAB et al., 2008). As interrupções da cadeia de frio, que frequentemente aparecem nas últimas etapas, como no ponto de venda, no caminho do varejista para o consumidor e durante armazenamento doméstico, ainda não estão integradas neste conceito de monitoramento (LIMBO et al., 2010; THOMAS, 2007).

Uma alternativa tecnológica para garantir a validade dinâmica de alimentos consiste no uso de embalagens inteligentes contendo indicadores de tempo e temperatura (ITT). Segundo Choi et al. (2013) e Robertson (2013), os principais requisitos e propriedades de um ITT ideal são: compatibilidade da dependência térmica com o alimento; facilidade e conveniência no uso; irreversibilidade da reação de cor; pequena dimensão; e baixo custo. Por isso, apesar do grande potencial de contribuição, poucos sistemas de ITT até o momento têm sido capazes de conseguir aplicação industrial.

Com o objetivo de identificar uma combinação favorável de eficiência, confiabilidade e viabilidade, este trabalho visa desenvolver um novo ITT utilizando um mecanismo baseado na reação de complexação entre o amido e o iodo (azul escuro), e na posterior atuação de uma enzima amilase termosensível sobre esse complexo, causando a redução de intensidade da cor azul a uma taxa dependente do tempo e da temperatura de armazenagem ao qual o ITT é exposto. Com isso, espera-se conferir benefícios efetivos à conservação de alimentos perecíveis, o que favorecerá a prática de venda e distribuição de produtos seguros.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização da enzima

A enzima utilizada foi uma α-amilase comercialmente denominada de Fungamyl® 800L (*Novozymes* S/A, Bagsvaerd, Dinamarca). A Fungamyl® 800L contém uma endoamilase

bacteriana produzida por fermentação submersa de uma cepa selecionada de *Aspergillus oryzae*. A Tabela 1 mostra a composição e as principais características da Fungamyl® 800L.

Tabela 1 - Composição e características da enzima Fungamyl® 800L (*Novozymes* A/S)

Ingredientes	% p/p
Água, CAS[1] nº7732-18-5	46,0
Sorbitol, CAS nº50-70-4	32,0
Cloreto de Sódio, CAS nº7647-14-5	11,0
Sorbato de potássio, CAS nº 24634-61-5	0,2
α - amilase, CAS nº9000-90-4[2]	11,0
Características	**Valor/Unidade**
Densidade	1,26 g/mL
pH a 25ºC ótimo	5,0
Temperatura ótima	35-40 ºC
Atividade Enzimática	800 FAU/g[3]

[1]Chemical Abstracts Service.

[2]Definido como enzima concentrada (base matéria seca).

[3]Unidade alfa-amilásica por grama.

Fonte: Ficha de Informação do Produto – *Novozymes* (2012)

2.2 Preparação dos protótipos de ITT

O iodo (I_2) utilizado foi solubilizado em Iodeto de Potássio (KI) (LABYNTH Produtos para Laboratório Ltda., São Paulo, Brasil). Uma solução contendo 0,05g I_2 /0,5g KI em 100 ml de água destilada foi preparada. Concentração final de I_2 na solução de 0,004 mol/L.

Uma solução contendo 5,0 % de amido solúvel (LABYNTH Produtos para Laboratório Ltda., São Paulo, Brasil) foi previamente gelatinizada (80 ºC por 5 min) e, após arrefecimento, foi misturada a solução de I_2 na proporção de 1:12,5 v_{iodo}/v_{amido}, tornando a mistura azul intensa.

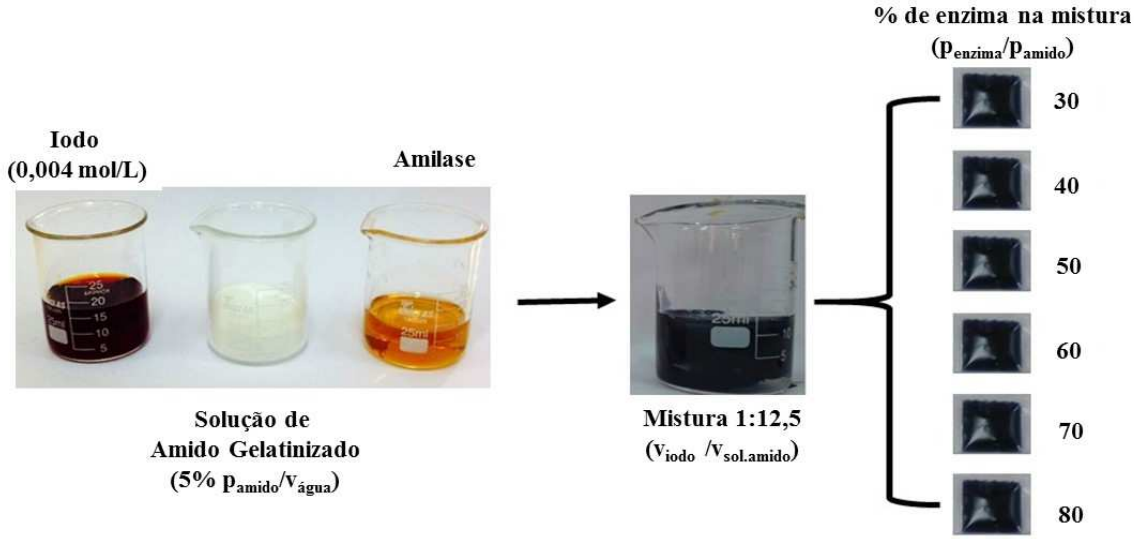
Para a preparação dos protótipos de ITT foi adicionado a mistura de amido e iodo, e α – amilase (Fungamyl® 800L) em diferentes quantidades, para obter 30; 40; 50; 60; 70; 80 % de enzima na mistura (p_{enzima}/p_{amido}), elaborando seis diferentes protótipos de ITT.

Cada protótipo foi homogeneizado e 2 ml da solução colocada em pequena embalagem plástica (3x3 cm) de filme coextrusado de poliamida e polipropileno (Modelo *ULTRA THERM*, Maquiplast Plásticos Especiais Ldta., São Paulo, Brasil), e finalmente fechada com auxílio de

máquina seladora (Modelo Selamult, R. BAIÃO Indústria e Comércio Ltda., Minas Gerais, Brasil), conforme mostra a Figura 1.

A temperatura ambiente durante o procedimento de elaboração dos protótipos foi controlada em 20,0±1,0 °C. A temperatura da solução de amido + iodo e a amilase encontravam-se à 4 ºC no momento da mistura.

Figura 1 - Procedimento de obtenção dos protótipos de ITT



Fonte: autor

2.3 Estimativa de custo das matérias-primas utilizadas na elaboração dos protótipos de ITT

Uma estimativa dos custos das matérias-primas utilizadas na obtenção dos protótipos foi realizada, obtendo o preço/unidade para cada ITT.

2.4 Comportamento e estimativa de vida-útil dos protótipos de ITT durante simulação de cadeia de abastecimento

Distintas concentrações de amilase nos protótipos de ITT foram investigadas, com objetivo de analisar a influência da quantidade de enzima sobre sua descoloração quando armazenados sob diferentes temperaturas.

Protótipos de ITT foram elaborados (conforme item *2.2 Preparação dos protótipos de ITT*) e estocados em diferentes incubadoras de alta precisão (Modelo MA 415/S, Marconi, São Paulo, Brasil), cujas temperaturas internas foram monitoradas por coletores de dados (Data Logger DHT5012, Perceptec, São Paulo, Brasil).

As condições de temperaturas estudadas foram: 4,0 (situação ideal); 7,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 (situações de abuso) ± 0,5 °C, caracterizando os perfis de temperatura que representam as condições da cadeia de distribuição de produtos frescos, desde o produtor até o consumidor final (ZHANG et al., 2012; LIMBO et al., 2010; CÁRDENAS et al., 2008).

Diariamente a descoloração dos diferentes protótipos de ITT (30; 40; 50; 60; 70; 80 % de amilase) armazenados sob condições diversas de temperatura (4,0; 7,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 ºC) 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 Internacionale de L'Eclairege* (iluminante D_{65}), 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 01.

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

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. Todas as análises foram realizadas em triplicata

O fim da vida-útil dos protótipos foi definido como o tempo que leva a cor azul escura da etiqueta, imediatamente confeccionada, para chegar a uma condição incolor (ΔE^* = 47,0), conforme mostra a Figura 2.

Figura 2 - (A) Tonalidade de azul escuro apresentada pela etiqueta imediatamente confeccionada; (B) cor definida como fim da vida-útil do indicador inteligente, quando ΔE^*= 47,0

(A) (B)

Fonte: autor

2.5 Avaliação cinética dos novos ITT

De acordo com Taoukis e Labuza (1989), indicadores inteligentes devem apresentar uma taxa de resposta com uma dependência térmica semelhante a dependência térmica da deterioração do produto ao qual será anexado, ou seja, alimento e indicador devem apresentar Energias de Ativação (Ea) semelhantes. Assim, a aplicabilidade de um ITT como indicador de qualidade requer o estudo da cinética do alimento e do sensor inteligente (TAOUKIS; LABUZA, 2003).

Buscando avaliar o emprego dos novos indicadores inteligentes desenvolvidos, foi realizada uma avaliação cinética entre a resposta de cor dos ITT e a perda de qualidade de um produto fresco. A escolha do alimento analisado fundamentou-se nas suas características intrínsecas e pela importância econômica para o Brasil, por isso, o segmento escolhido foi o setor de carne de frango.

Para calcular as Energias de Ativação (kcal/mol), Taoukis e Labbuza (1989) propõem, com base na expressão de Arrhenius, que a resposta de cor dos ITT e a resposta das análises tradicionais de qualidade do alimento podem ser expressas através da Equação 2.

$$f(A) = K(T)t \tag{2}$$

Onde *f*(A) representa a mudança do índice de qualidade, K é a constante cinética de velocidade da reação e t expressa o tempo de armazenamento. Assim, correlacionando a resposta de cor dos ITT em função do tempo e a resposta das análises tradicionais de qualidade do alimento em função do tempo, os valores das constantes $K_{indicador}$ e $K_{tradicional,}$ respectivamente, podem ser obtidas através da declividade das retas. E após, tomando logaritmo em ambos os

lados da função de Arrhenius, e traçando uma relação entre $logK_{indicador}$ e 1/T e $logK_{tradicioanl}$ e 1/T, a Energia de Ativação dos indicadores inteligentes e das análises tradicionais de qualidade podem ser encontradas através da declividade das retas.

Cabe salientar, que para obter o valor de *Ea* as expressões cinéticas devem ser validadas de forma dinâmica, ou seja, em condições variadas de temperatura (TSIRONI et al., 2011; TOUKIS; LABBUZA, 1989). Por isso, a descoloração dos ITT e a qualidade da carne de frango foram investigadas sob diferentes temperaturas de armazenamento (4-25 ºC), conforme mostram os itens subsequentes.

2.5.1 Descoloração dos novos ITT

Dados obtidos no item "2.4 *Comportamento e estimativa de vida-útil dos protótipos* de *ITT durante simulação de cadeia de abastecimento*".

2.5.2 Avaliação da perda de qualidade de amostras cárneas

Para caracterizar a perda de qualidade dos produtos avícolas, amostras de peito de frango desossado foram estocadas em incubadoras de alta precisão sob diferentes condições de temperaturas de: 4,0 (situação ideal); 7,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 (situações de abuso) ± 0,5 °C.

Análises microbiológicas de determinação de coliformes termotolerantes a 45 °C foram conduzidas nas amostras nos tempos zero, 1, 4, 7, 10 dias de armazenamento, conforme metodologia oficial do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2003). A escolha do micro-organismo foi baseada na legislação brasileira (BRASIL, 2001) e todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.6 Aplicabilidade do novo ITT

Para verificar a aplicabilidade do novo ITT foi realizado um estudo que avaliou seu desempenho sob condições reais de produção industrial, transporte terrestre e posterior armazenamento comercial.

Os protótipos de ITT utilizados foram aqueles cuja concentração de enzima proporcionou: *1)* No item *"2.4 Comportamento e estimativa de vida-útil dos protótipos de ITT durante simulação de cadeia de abastecimento"* uma vida-útil de aproximadamente dez dias quando armazenados a 4 ºC, condição que representa o prazo de validade comercial do peito de frango desossado refrigerado (dados contidos no rótulo do produto); *2)* No item "*2.5 Avaliação*

cinética dos novos ITT" Energias de Ativação semelhantes entre o ITT e o produto avícola, com valores de *Ea* inferiores a 5 kcal/mol (diferença confiável segundo TAOUKIS et al., 1999).

2.6.1 Preparo das amostras

A matéria-prima cárnea utilizada foi peito de frango desossado refrigerado, fornecida por um matadouro-frigorífico localizado no Estado do Rio Grande do Sul.

No matadouro-frigorífico, os produtos cárneos seguiram seu processo normal de obtenção, conforme fluxo de produção da planta beneficiadora (Anexo II), até a etapa de acondicionamento das peças na embalagem primária. Nesta etapa, amostras foram selecionadas e nelas foram inseridos coletores de dados, posteriormente, as bandejas seguiram para a plastificação onde foram anexados os novos ITT na superfície do filme, conforme mostra a Figura 3.

Figura 3 - Ilustração do preparo de amostras. (A) Colocação do controlador de temperatura *data logger* no interior da bandejo de produto; (B) Colocação* do ITT

(A) (B)

*ITT aderido a embalagem do produto com Fita 369 Tartan (3M do Brasil, São Paulo, Brasil).

Após, os produtos contidos nas embalagens inteligentes, juntamente aos demais do lote de produção, foram colocados em caminhão frigorificado para transporte ao seu destino final, o mercado varejista.

2.6.2 Acompanhamento da cadeia logística terrestre de produtos frescos

O mapeamento das condições de temperatura durante a distribuição de alimentos avícolas frescos foi avaliado em uma rota de transporte terrestre, de aproximadamente 120 km. A temperatura foi mensurada utilizando como referência os produtos cárneos acondicionados nas embalagens inteligentes contendo os novos ITT e os coletores de dados.

Após o transporte e distribuição dos produtos, os dados mensurados pelos coletores de dados foram confrontados com os resultados de cor dos ITT, correlacionando a descoloração do indicador com a temperatura interna das peças cárneas.

2.6.3 Monitoramento de armazenamento comercial

Após completar a viagem, os produtos foram descarregados em seu destino final e armazenadas em balcões frigoríficos de estabelecimento comercial (ponto de venda) (Modelo Expositor Ilha Plus EIP 2000, Refrigeração Costa Ldta, São Paulo, Brasil). Com exceção de doze bandejas de produto que foram imediatamente transportadas para laboratório de análise.

No laboratório, os produtos permaneceram estocados em incubadora de alta precisão a 4 ºC por dez dias (amostras controle). Já no ponto de venda, após consentimento da empresa, os produtos contendo os ITT e os controladores de temperatura foram identificadas para que os consumidores não os comprassem, permanecendo no local durante os 10 dias de sua validade. Durante o período de estoque, a temperatura dos produtos foi continuamente monitorada e amostras foram retiradas para acompanhamento de sua qualidade, realizada através de análises tradicionais (microbiológicas do músculo) e não tradicionais (coloração dos ITT).

Ao final da validade dos produtos cárneos foi realizada uma comparação entre a taxa de resposta dos ITT e a perda de qualidade do alimento.

2.6.3.1 Estabilidade microbiológica do peito de frango desossado

Análises microbiológicas foram conduzidas no peito de frango desossado nos tempos zero, 1, 3, 5, 7, 10 dias de armazenamento.

Foram realizadas as análises de contagem total de aeróbios psicrotróficos; enumeração de *Staphyloccoccus* spp. e determinação de coliformes termotolerantes a 45 °C, conforme metodologia oficial do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2003) e *American Public Health Association* (APHA, 2001). A escolha dos micro-organismos avaliados baseou-se na literatura (JAY, 2005) e na legislação brasileira (BRASIL, 2001) e todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.6.3.2 Descoloração dos novos ITT's

A descoloração dos ITT foi avaliada diariamente de forma visual e mensurada, em triplicata, através de colorímetro, pelo sistema de cor *CIELab* (iluminante D_{65}), acompanhando o valor de ΔE^* calculado através do *chroma* L*, a*, b*.

2.6.3.3 Temperatura de armazenamento dos produtos

A temperatura de armazenamento dos produtos foi monitorada continuamente através dos coletores de dados presentes no interior das bandejas.

2.7 Desempenho do novo ITT após estoque sob congelamento

Para operacionalizar a utilização industrial do novo ITT enzimático torna-se importante validar as suas condições de estoque antes do uso. Por isso, um estudo para avaliar seu desempenho após períodos sob congelamento foi realizado.

Indicadores Inteligentes foram elaborados (conforme item *2.2 Preparação dos protótipos de ITT*) e imediatamente estocados sob condições de congelamento (-12 ºC ±1 ºC) em freezer (Modelo Intelligent Freezer 32, Robert Bosch Ltda., São Paula, Brasil) por período de dois meses.

Amostras foram retiradas semanalmente das condições de congelamento e armazenadas em incubadora de alta precisão a temperatura de 4 ºC. Diariamente a descoloração das etiquetas foi avaliada visualmente e mensurada através de colorímetro, acompanhando a ΔE^* calculada através do *chroma* L*, a*, b*, até obter um valor de $\Delta E^* = 47{,}0$. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Comparações entre a resposta de cor do $ITT_{sem\ congelamento}$ com aquela apresentada pelo $ITT_{com\ congelamento}$ foram realizadas. Assim, para verificar se houve diferença entre o desempenho do ITT após congelamento, os resultados de $\Delta E^*_{sem\ congelamento}$ e $\Delta E^*_{com\ congelamento}$ foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e posterior Teste de Tukey, com nível de significância de 5 % ($p < 0{,}05$), utilizando o programa Statistica 5.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Analise de custos

No Quadro 1 são apresentados os valores de cada matéria-prima utilizada na elaboração dos novos protótipos e, posteriormente, o custo em reais por ITT.

Quadro 1 - Valores das matérias-primas que compõe os protótipos de ITT e o custo por unidade

Materiais	Preço	Custo (R$)/ITT					
		30 %*	40%	50%	60%	70%	80%
Amido Solúvel	27,80 R$/500 g	0,008					
Amilase Fungamyl	39,40 R$/1000 g	0,0000064	0,0000084	0,0000108	0,0000128	0,0000148	0,0000169
Iodeto de Potássio	68,20 R$/100 g	0,008					
Iodo	74,90 R$/100 g	0,002					
Embalagem plástica	15,20 R$/1000 un.	0,060					
Custo/unidade		**0,078/ITT**					

*Concentração de amilase no ITT.

O preço é um dos principais fatores da relutância industrial em adotar o uso de ITT em alimentos (CHOI et al., 2014). Por isso, a obtenção de sistemas de indicadores economicamente viáveis é o ponto chave para estimular sua utilização. Os protótipos de ITT aqui desenvolvidos constituem-se de materiais de baixo custo facilmente disponíveis. Utilizam uma α-amilase obtida por fermentação submensa de *Aspergillus oryzae*, que é a espécie fúngica mais frequentemente utilizada na produção comercial de α-amilase, devido ao seu baixo custo de produção (SAJEDI et al., 2005). Por essas razões, o custo por unidade de ITT obteve um baixo valor, de aproximadamente oito centavos. Assim, estes ITT podem ser atraentes para uso em embalagens individuais e cadeias de produtos com baixa margem de lucro.

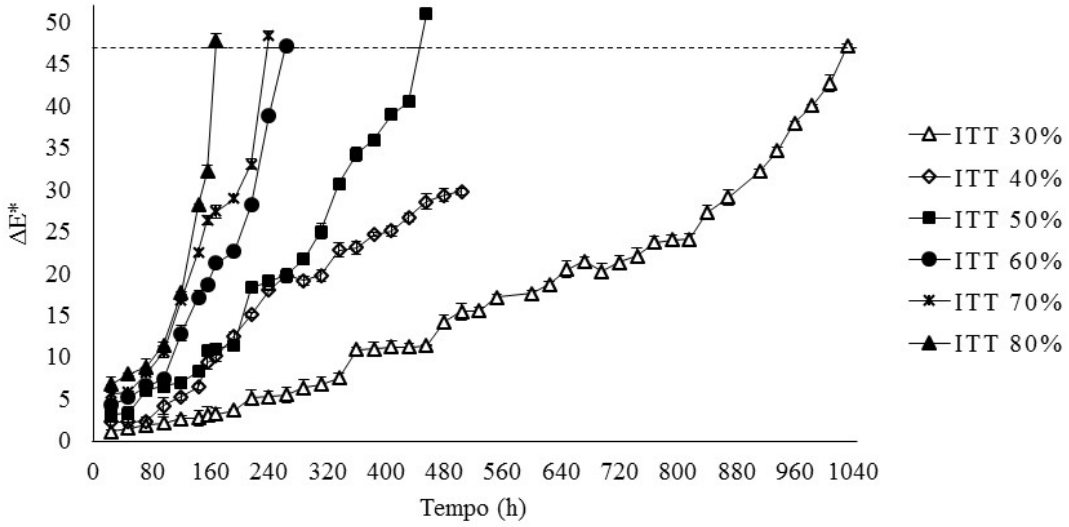
Comparando o preço do novo ITT com outras marcas de indicadores comerciais, os valores são significativamente inferiores, como por exemplo, o *MonitorMark*, da empresa 3M (3M do Brasil, São Paulo, Brasil), cujo valor é de 18,0 reais/unidade.

3.2 Comportamento e estimativa de vida-útil dos protótipos de ITT durante simulação de cadeia de abastecimento

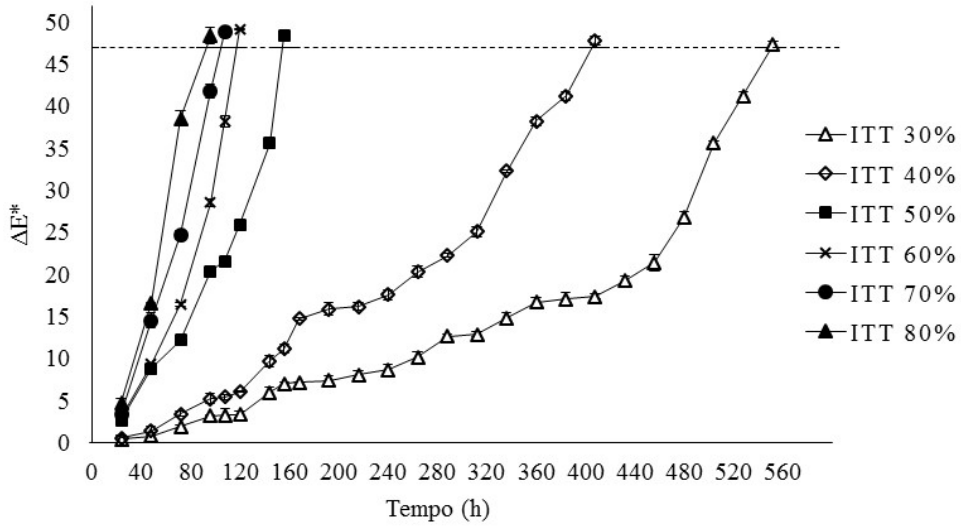
A Figura 4 mostra os resultados de cor dos protótipos de ITT mensurados durante simulação de cadeia de abastecimento.

Figura 4 - Descoloração apresentada pelos protótipos de ITT durante armazenamento: (A) 4; (B) 7; (C) 10; (D) 15; (E) 20; (F) 25 °C

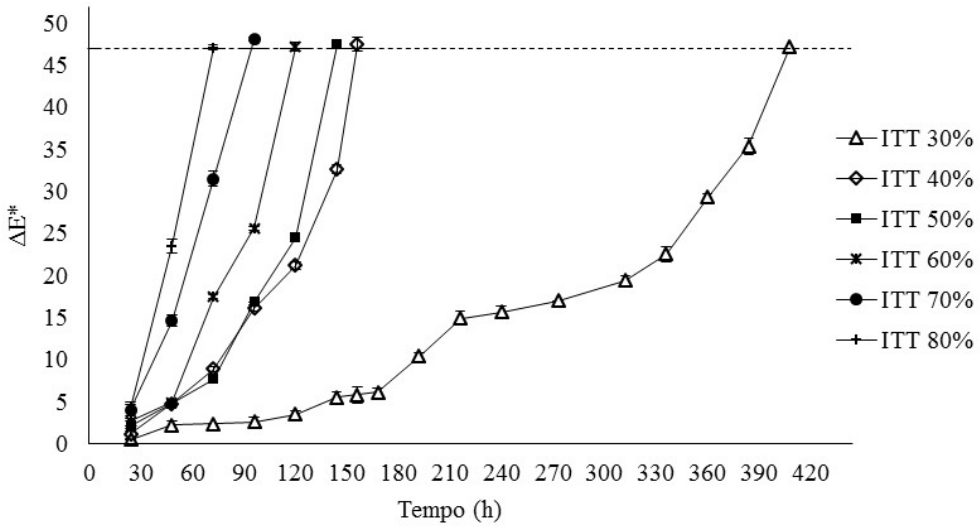
(A)



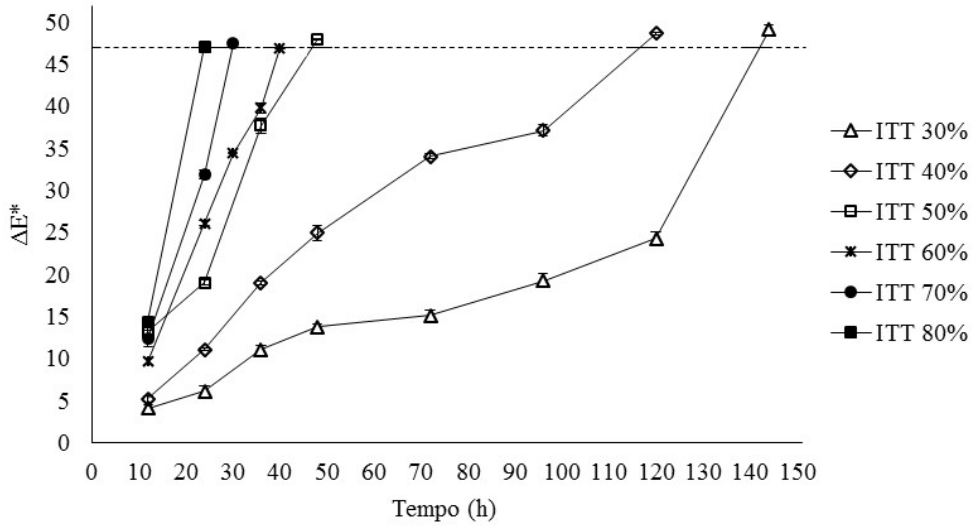
(B)



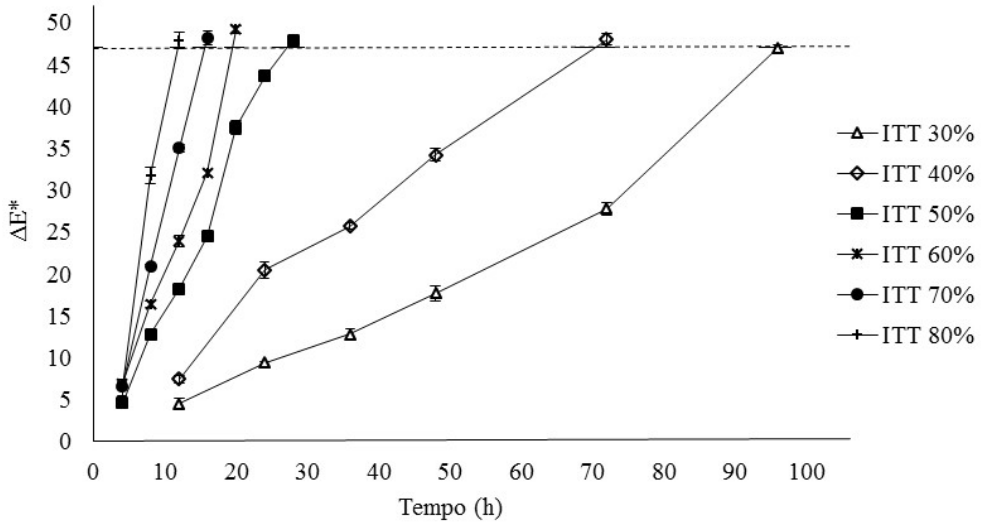
(C)


ΔE*
Tempo (h)
ITT 30%
ITT 40%
ITT 50%
ITT 60%
ITT 70%
ITT 80%

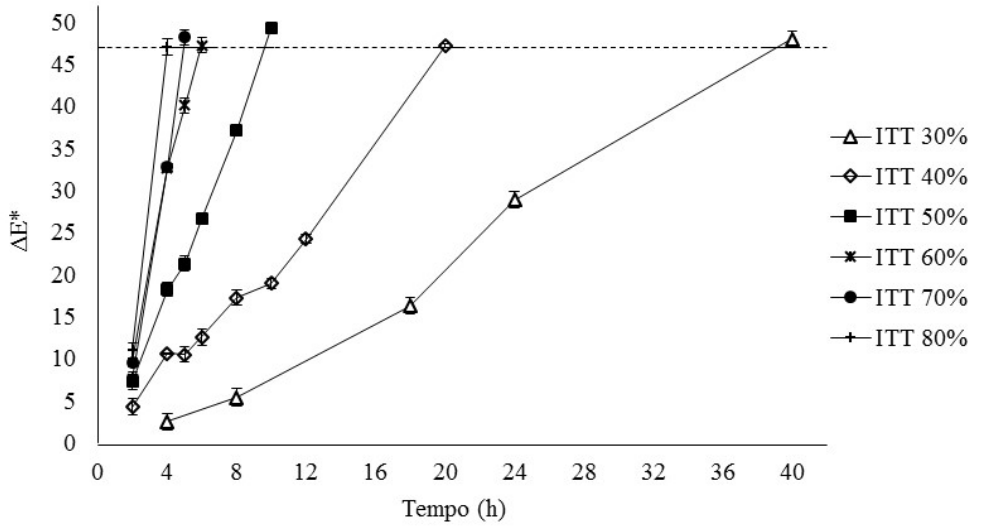
(D)


ΔE*
Tempo (h)
ITT 30%
ITT 40%
ITT 50%
ITT 60%
ITT 70%
ITT 80%

(E)



(F)



Onde *ΔE** = 47,0 representa a diferença de cor definida como fim da vida-útil do ITT. As barras de erro representam o desvio padrão das triplicatas de cada medição.

A resposta de cor dos protótipos obteve boa reprodutibilidade durante o armazenamento nas temperaturas avaliadas, apresentando baixos desvios entre os valores das triplicatas mensuradas em cada ITT. Segundo Mai et al. (2011) e Mehauden et al. (2007), a precisão de um sistema de indicador inteligente é uma característica imprescindível para a sua adequada implementação.

A descoloração dos protótipos mostrou uma dependência clara e proporcional a quantidade de enzima e a temperatura do meio. Todos os protótipos testados apresentaram

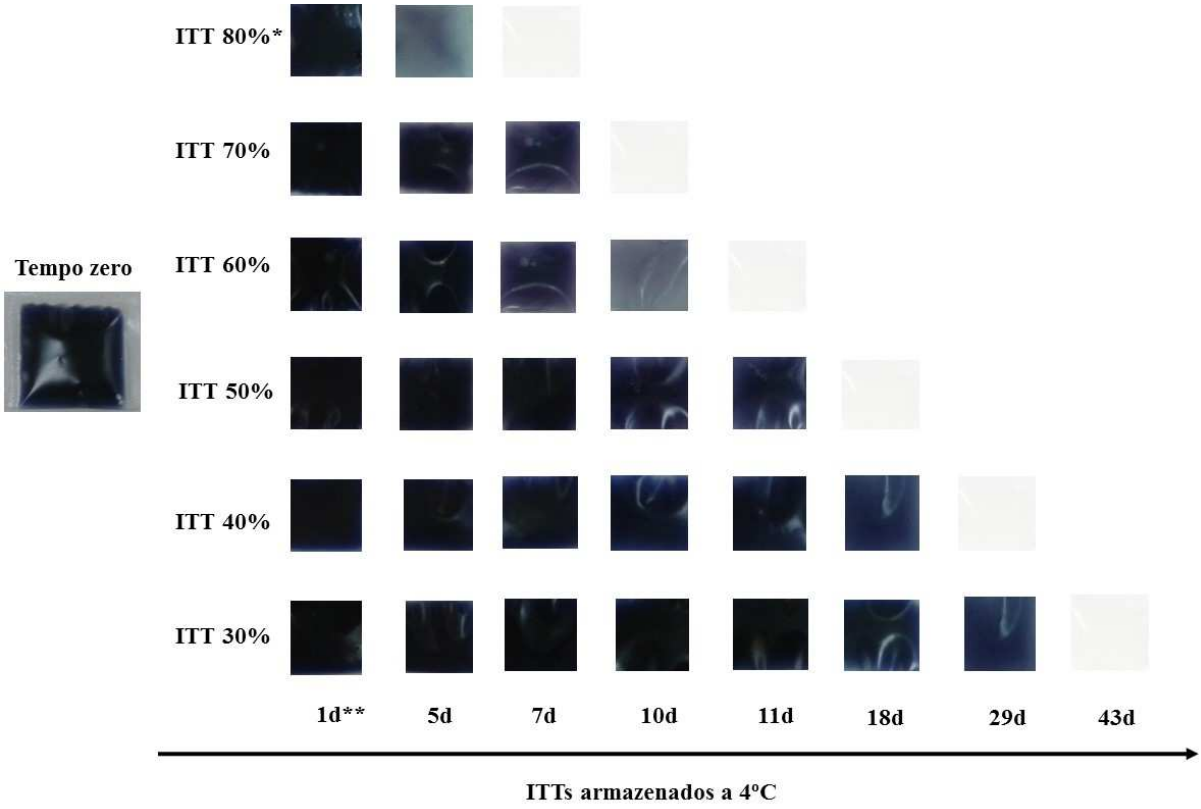
flexibilidade no que diz respeito ao seu tempo de resposta total, de poucas horas a várias semanas, cobrindo o tempo de monitorização necessário para diferentes produtos perecíveis.

Durante o armazenamento, as mudanças visuais dos protótipos foram facilmente perceptíveis, característica favorável e indispensável no uso de ITT, pois evita erros de sinalização inadequada pelos consumidores. De acordo com Taoukis (2008), o sinal da resposta é o parâmetro que determina a facilidade de leitura de um ITT. Este deve apresentar uma mudança compreensível e perceptível pelo consumidor. Assim, a configuração deve ser de fácil leitura visual, com consequente tradução da mensagem correta para todos.

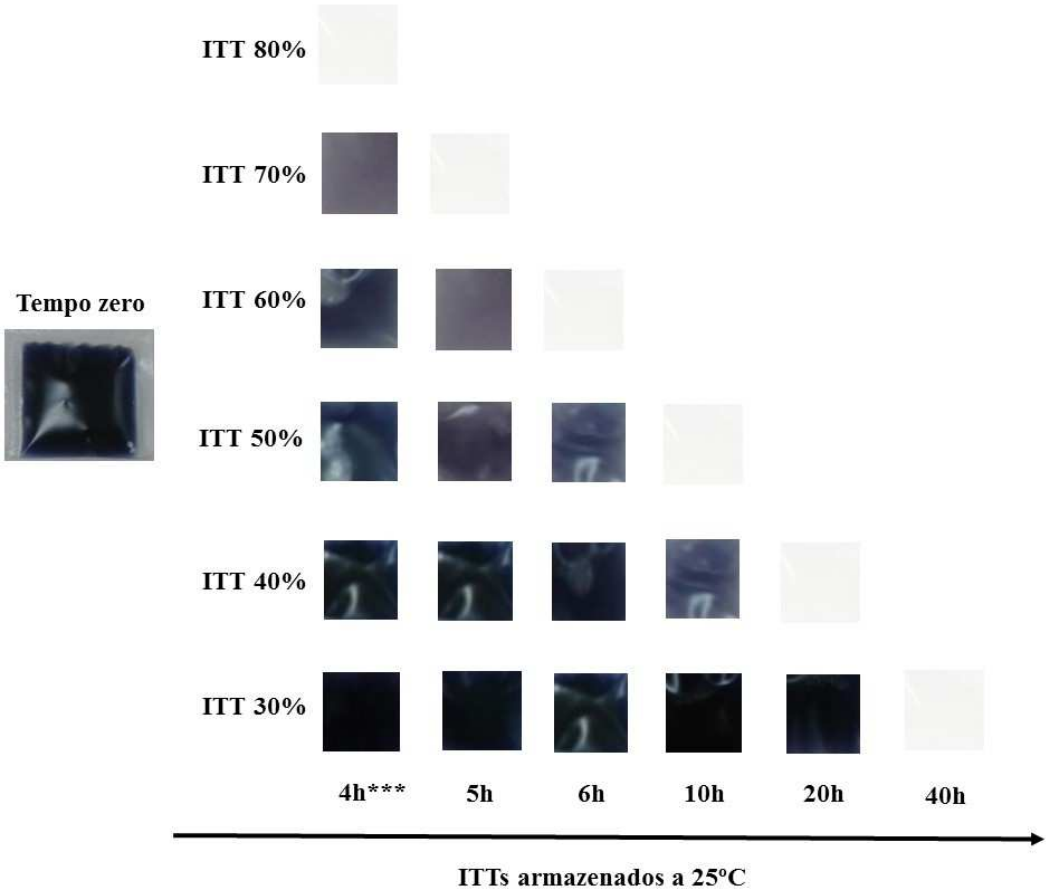
Nos indicadores propostos neste trabalho, a atuação da amilase sob a mistura de amido e iodo proporcionou uma nítida descoloração do azul escuro em cores sequencias, até atingir a total transparência do meio, evidenciando, segundo Whitaker et al. (2003), a degradação do amido à maltose, situação intensificada com o aumento da temperatura de armazenamento, como ilustra a Figura 5.

Figura 5 - Descoloração apresentada pelos protótipos de ITT durante armazenamento: (A) 4 ºC; (B) 25 ºC

(A)



(B)



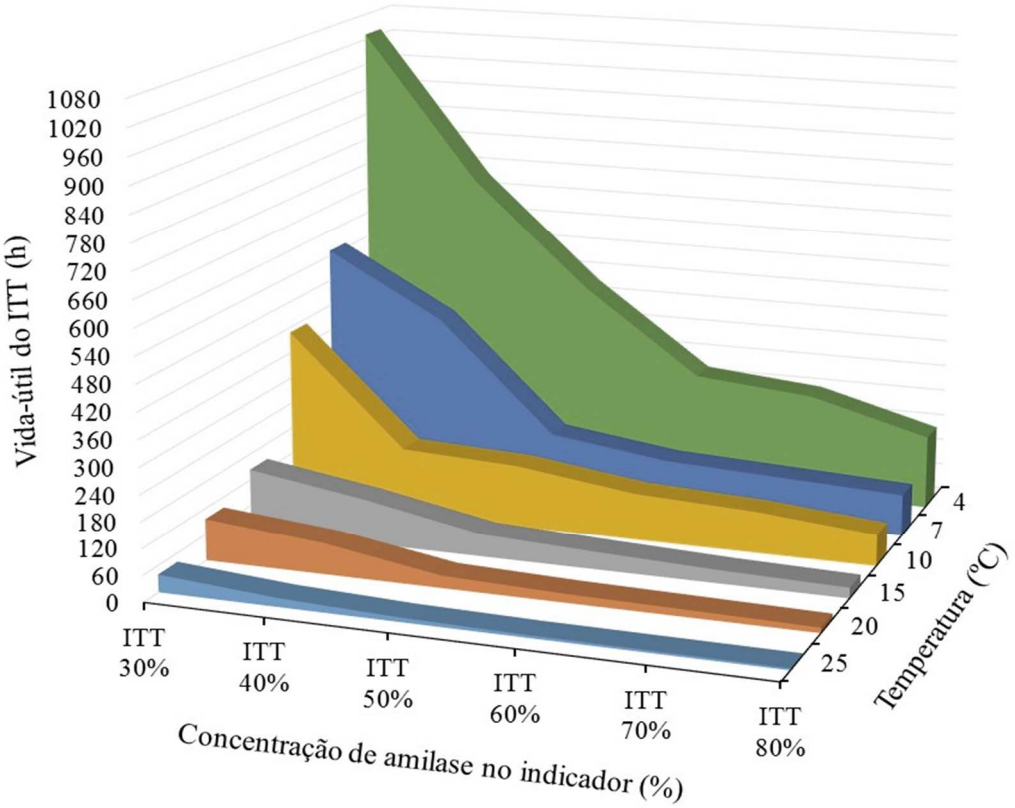
*Concentração de amilase no ITT; **Dias; ***Horas.

A Figura 6 complementa os resultados já obtidos através da representação que fornece uma abrangente relação entre a temperatura de armazenamento, a concentração de enzima no protótipo e sua validade. Esta ferramenta pode ser usada para decidir qual concentração de enzima no ITT tem de ser usada para um determinado tipo de produto alimentício, através da integração de suas validades. Assim, a etiqueta pode ser ajustada para o uso em diversos alimentos perecíveis.

Na visão do consumidor, como não há uma correlação algoritma usada, mas sim um ponto final visual único, este deverá indicar de perto o fim de vida-útil a qualquer temperatura. Para atingir isto, o ponto final do ITT deverá coincidir com o fim de vida-útil do produto a uma temperatura de referência (TAOUKIS, 2008). Assim, considerando a validade dos produtos à base de frango de dez dias quando mantidos a 4 ºC, a melhor concentração de amilase no ITT parece ser 60 %. Nesta condição, o novo indicador inteligente apresentou uma vida-útil semelhante aos dias de validade da carne. No entanto, para uma aplicação bem-sucedida, é

necessário verificar, através de modelos cinéticos, se a degradação do alimento apresenta uma dependência da temperatura similar àquela verificada para este ITT.

Figura 6 - Superfície de resposta que relaciona a vida-útil dos indicadores inteligentes, com a sua respectiva concentração de amilase a uma dada temperatura de referência



3.3 Avaliação cinética dos novos ITT

A abordagem cinética proporcionou uma caracterização precisa do comportamento dos ITT em relação a deterioração da carne de aves. A Figura 7 apresenta a relação de dependência entre o logaritmo da constante de velocidade reacional ($K_{indicador}$ e $K_{tradicional}$) e a temperatura, enquanto a Tabela 2 evidencia os diferentes parâmetros cinéticos e o ajuste dos dados.

Figura 7 - Ln da constante de velocidade de resposta: (A) análise microbiológica do músculo; (B) descoloração dos ITT com 30 – 80 % de amilase; plotados *versus* 1/T (Kelvin)

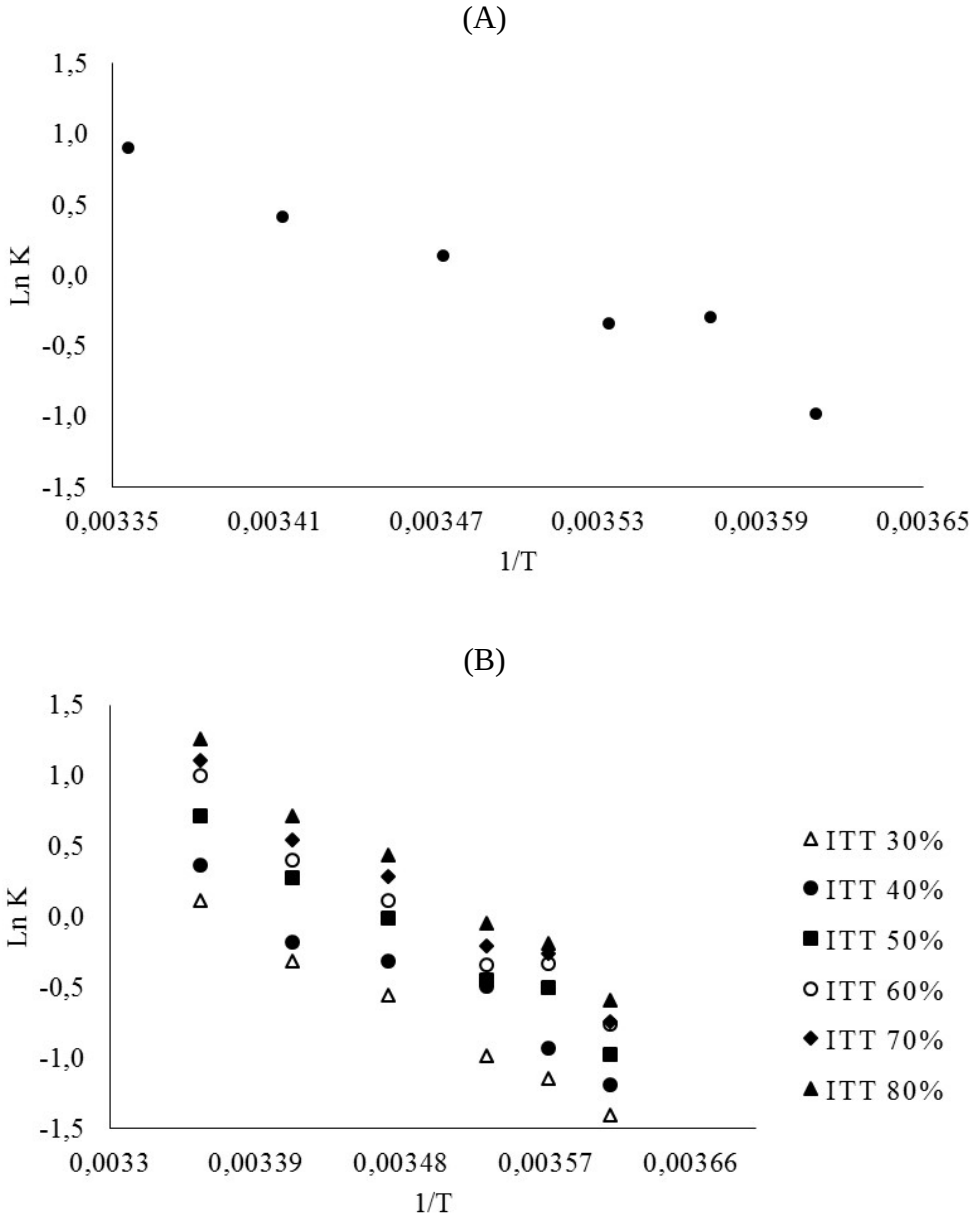


Tabela 2 - Parâmetros cinéticos dos ITT e das análises tradicionais do músculo de frango

Análise	Ea (kcal/mol)	R^{2*}
ITT (80 %**)	24,35	0,97
ITT (70 %)	23,54	0,98
ITT (60 %)	22,29	0,98
ITT (50 %)	21,53	0,98
ITT (40 %)	17,63	0,95
ITT (30 %)	14,96	0,99
Microbiológica do músculo	22,01	0,87

* Ajuste de dados.

**Porcentagem de amilase no indicador inteligente.

Os dados observados no ITT obtiveram bons ajustes, apresentando altos valores de coeficientes de determinação. As linhas de regressão linear mostram uma clara e quase paralela dependência com a temperatura. Quanto maior a *EA*, mais rápida a reação ocorre quando a temperatura é elevada.

De acordo com estudos realizados por Taoukis et al. (1999), os indicadores inteligentes poderão ser aplicados quando a diferença da *Ea* entre eles e o alimento for inferior a 5 kcal/mol, no entanto, quanto mais próximo forem os valores de *Ea* obtidos, mais favorável e precisa será sua aplicação. Assim, avaliando os dados apresentados, pode-se concluir que os resultados desta pesquisa são positivos a aplicação do novo indicador inteligente contendo 60 % de amilase para a carne de frango, já que, a mudança do índice de qualidade entre ITT e análises tradicionais foi validada com sucesso, e a data de validade deste ITT foi idêntica a vida-útil constante no rótulo do produto cárneo.

No entanto, para conhecer o verdadeiro potencial de utilização industrial do novo ITT faz-se necessário avaliar o seu comportamento sob condições reais de produção, distribuição e armazenamento de produtos avícolas.

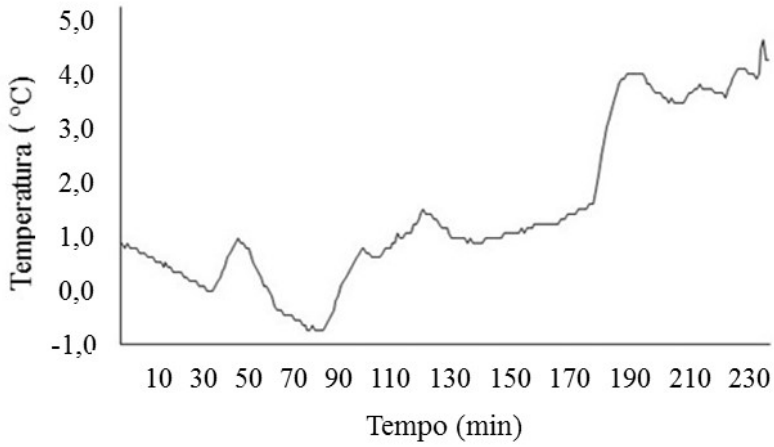
3.4 Aplicabilidade do novo ITT

3.4.1 Acompanhamento da cadeia logística terrestre de produtos frescos

A Figura 8 mostra os resultados de temperatura mensurados por *data loggers* durante o monitoramento da rota logística terrestre. Enquanto a Tabela 3, apresenta os resultados de cor dos ITT anexados as amostras, antes e depois do transporte.

Figura 8 - Valores de temperatura mensurados por *data loggers* durante transporte logístico terrestre: (A) condição ambiente do caminhão; (B) condição interna dos produtos

(A)



(B)

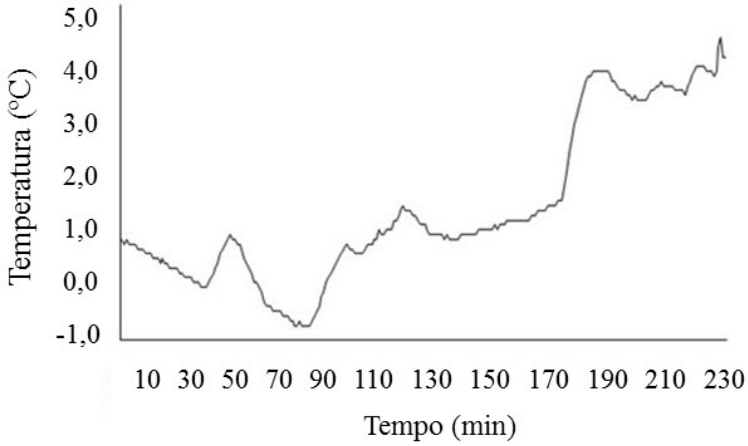
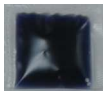
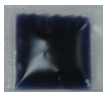


Tabela 3 - Imagem dos ITT (60 % de amilase) e valores de *chroma L*, a*, b** mensurados nos indicadores anexados aos produtos, antes e depois do transporte. Com posterior cálculo da diferença de cor (*ΔE**)

	Chroma l, a*,* b*			Imagem	*ΔE*[3]
Antes[1]	25,29	0,45	-1,42		0,297
Depois[2]	25,58	0,50	-1,38		

[1] Valores mensurados na planta fabril.

[2] Valores verificados após o transporte logístico.

[3] $\Delta E^* = \sqrt{(L_{depois\ \ transp.} - L_{antes\ \ transp.})^2 + (a_{depois\ \ transp.} - a_{antes\ \ transp.})^2 + (b_{depois\ \ transp.} - b_{antes\ \ transp.})^2}$

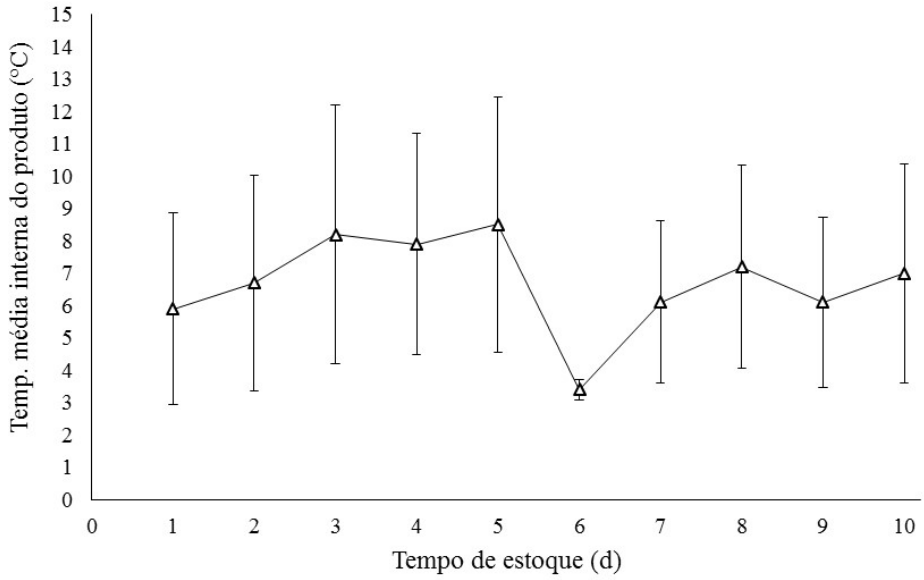
Os resultados mostram que durante a rota logística monitorada houve conformidade com os padrões de temperatura preconizados pela legislação brasileira, de no máximo 4 ºC (BRASIL, 1998).

O valor obtido de *ΔE**, calculado através do *chroma L*, a*, b** mensurado antes e depois do transporte, evidenciou que não houve uma mudança de cor significativa nos ITT durante o transporte dos produtos. Resultado que corrobora com as temperaturas verificadas nas amostras cárneas durante a distribuição.

3.4.2 Monitoramento de armazenamento comercial

A Figura 9 apresenta os resultados de temperatura mensurados durante armazenamento das amostras cárneas em balcão frigorífico de estabelecimento comercial.

Figura 9 - Temperaturas médias monitoradas nas amostras durante dez dias de estoque em balcão frigorífico de estabelecimento comercial



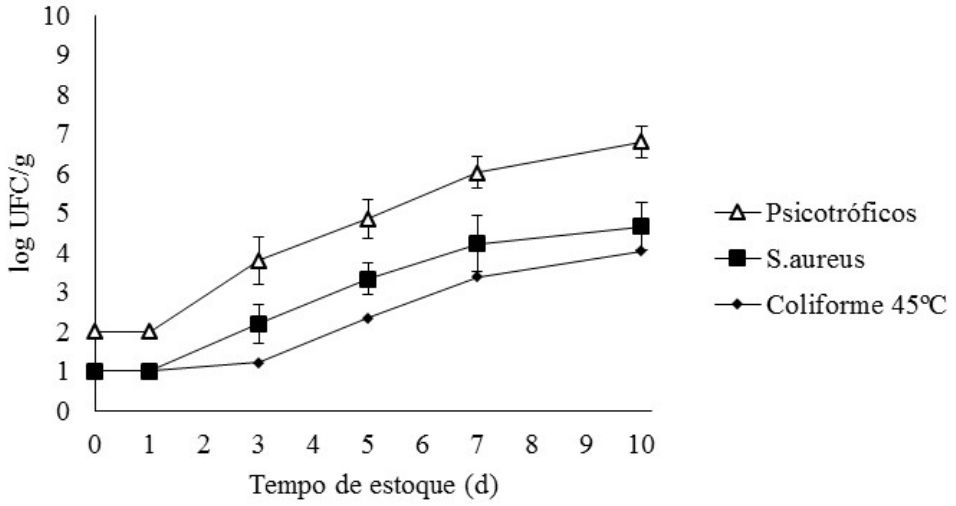
As barras de erro representam o desvio padrão entre os valores mensurados em cada dia de monitoramento.

Com exceção do sexto dia de estoque, que correspondeu a um domingo e o estabelecimento estava fechado, os demais dias de monitoramento apresentaram valores médios de temperatura acima do padrão estabelecido no rótulo do produto, de 0 a 4 ºC. Elevados desvios foram observados nas medições, com temperaturas que chegaram a alcançar 16 ºC durante horário de maior movimento do estabelecimento, ocasionados provavelmente pela intensa abertura do balcão frigorífico ou pelo não fechamento do mesmo.

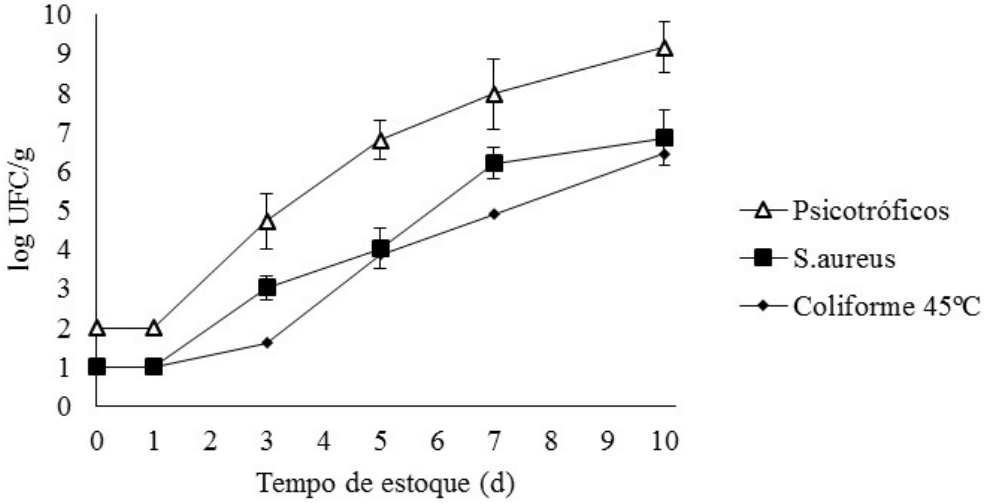
Flutuações de temperatura podem causar uma redução da validade de produtos perecíveis (JAY, 2005), acarretando numa discrepância entre a data final de consumo constante no rótulo e as legítimas condições de qualidade do alimento. A confirmação desta situação é apresentada na Figura 10, onde são mostrados os resultados microbiológicos de enumeração de micro-organismos aeróbios psicrotróficos, *Staphyloccoccus* spp. e coliformes termotolerantes das amostras cárneas analisadas.

Figura 10 - Resultados das análises microbiológicas das amostras cárneas mantidas a: (A) 4 °C; (B) situação real de armazenamento (Figura 9)

(A)



(B)



As barras de erro representam o desvio padrão das triplicatas de cada medição.

Embora a contagem de micro-organismos aeróbios psicotróficos indique o grau de deterioração da carne de ave refrigerada (PATSIAS et al., 2008), a legislação brasileira não estabelece padrão para estes micro-organismos. Entretanto, a *International Commission on Microbiological Specificacions for Foods* (1978) considera fora das condições higiênico-sanitárias ideias os produtos cárneos que ultrapassam contagens de 10^6 (6 $\log_{10}$) a 10^7 (7 $\log_{10}$) Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/g para este grupo de bactérias. Assim, atendendo o padrão de 7 $\log_{10}$ UFC/g, as amostras mantidas em condições ideias de armazenamento (4°C) obtiveram contagens abaixo das supracitadas até o décimo dia de validade, enquanto os

produtos armazenados no ponto de venda apresentaram valores superiores depois do quinto dia de estoque.

Seguindo o padrão microbiológico brasileiro para coliformes termotolerantes a 45 °C (BRASIL, 2001), o único para carne de frango, de $\leq 10^4$ (4 $\log_{10}$) UFC/g, as amostras controle mantiveram-se adequadas para o consumo até o décimo dia de armazenamento, no entanto, aquelas armazenadas em estabelecimento comercial ultrapassaram o padrão legal após o quinto dia.

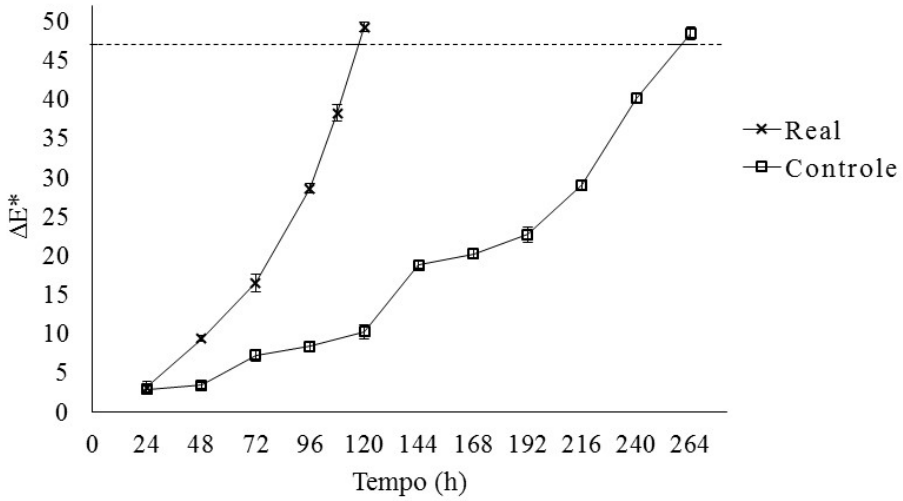
Os *Staphylococcus* são micro-organismos que fazem parte da microflora da carne crua de aves (Russell, 2008), trabalhos realizados por Franco e Landgraf (2008) e Barbut (2002) relataram que são necessárias entre 10^5 (5 $\log_{10}$) e 10^6 (6 $\log_{10}$) unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus* por grama de alimento para que a toxina seja formada em níveis capazes de provocar intoxicação. Considerando esta faixa, as amostras mantidas em estabelecimento comercial, antes do sétimo dia de estoque já poderiam representar risco à saúde do consumidor, caso a cepa fosse enterotoxigênica.

Cabe salientar, que a baixa prevalência de todas as bactérias analisadas no tempo zero indicou um bom controle de processo durante as etapas de obtenção dos produtos, com aplicação de forma eficaz das Boas Práticas de Fabricação (BPF's) pelo matadouro avaliado.

Os resultados das análises microbiológicas mostraram que o crescimento da microflora bacteriana da carne foi significativamente retardada nas amostras controle. O peito de frango desossado obteve uma vida-útil de dez dias sob condições ideias de armazenamento, enquanto as amostras estocadas em estabelcimento comercial deveriam ser consumidas até o quinto dia de validade, depois desta data, já representariam risco a saúde dos consumidos caso fossem consumidas. Sendo assim, torna-se impressindível o desenvolvimento de estratégias que visem o controle efetivo da temperatura durante a cadeia de abastecimento de produtos avícolas frescos, ou, ainda, o desenvolvimento de instrumentos que possibilitem conhecer o histórico real de temperatura ao qual o alimento foi exposto e, com isso, prever sua verdadeira vida-útil.

Assim, uma alternativa tecnológica, simples e de baixo custo para garantir a validade dinâmica de alimentos perecíveis poderia ser o uso de embalagens inteligentes contendo o novo ITT enzimático aqui desenvolvido, cujos resultados de sua aplicação, em produtos avícolas, constam nas Figuras 11 e 12.

Figura 11 - Resposta de cor apresentada pelos ITT (60 % de amilase) mantidos a 4 °C (controle) e situação real de armazenamento (Figura 9)



Onde *ΔE** = 47,0 representa a diferença de cor definida como fim da vida-útil do ITT.

As barras de erro representam o desvio padrão das triplicatas de cada medição.

Figura 12 - Descoloração diária observada visualmente nos ITT (60 % de amilase) mantidos sob temperatura ideal (4 °C) e real (Figura 9)

A resposta de cor dos ITT obteve boa reprodutibilidade, apresentando baixos desvios entre os valores das triplicatas mensuradas. A descoloração foi tanto visualmente compreensível (Figura 12) como adaptável à medição por equipamentos (Figura 11).

Os ITT contendo 60 % de amilase apresentaram uma descoloração similar à taxa de deterioração do produto cárneo analisado, obtendo a mesma validade nas condições de temperatura avaliadas (controle e real).

A informação obtida na monitorização contínua e global do sistema de distribuição de produtos à base de frango leva ao reconhecimento e correção de pontos problemáticos consistentes. Além disso, permitiria a segmentação da responsabilidade, servindo como prova do cumprimento das exigências contratuais pelo produtor e pelo distribuidor. Pode garantir ainda uma manipulação apropriada do alimento que foi entregue ao vendedor, eliminando, assim, a possibilidade de rejeição por alegações infundadas aclamadas pelo último. Além disso, pode ser uma ferramenta de marketing eficaz.

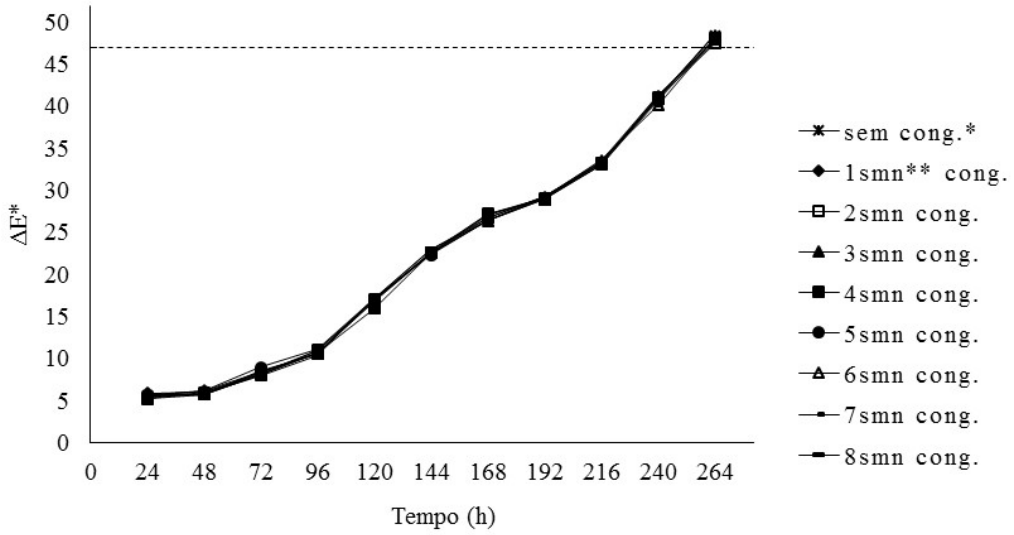
Assim, adoção de medidas de higiene adequadas dentro das plantas fabris, combinada a utilização deste novo ITT constitui-se numa alternativa viável na produção de alimentos à base de frango seguros, desde a produção até o consumo.

3.5 Desempenho do ITT após estoque sob congelamento

Erros em medições de ITT são comuns devido a ausência de informações necessárias para seu adequado uso, como por exemplo, ciência das condições apropriadas de estoque antes da sua utilização. Por isso, buscando sanar esta carência e aprimorar a aplicação do novo ITT, a Figura 13 apresenta o desempenho do indicador após armazenamento sob congelamento.

Os resultados evidenciam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores médios de ΔE^* mensurados nos ITT em todas as condições avaliadas. Com isso, o estoque sob temperaturas de congelamento mostrou-se seguro para a manutenção da precisão da resposta do indicador.

Figura 13 - Desempenho apresentado pelo ITT contendo 60 % de amilase durante armazenamento a 4 ºC depois de diferentes períodos de estoque sob condições de congelamento



Onde *ΔE** = 47,0 representa a diferença de cor definida como fim da vida-útil do ITT.
*sem congelamento.
**tempo de congelamento em semanas.

4. CONCLUSÕES

A resposta de cor dos protótipos de ITT foi visualmente interpretada, como adaptável à medição usando equipamentos adequados, apresentando boa reprodutibilidade durante o processo de descoloração em todas as condições estudadas.

Devido à possibilidade de definir a vida-útil dos ITT variando as concentrações de enzima, os indicadores podem ser facilmente utilizados para controlar as condições de temperatura na cadeia de diversos alimentos perecíveis.

O ITT contendo 60 % de amilase foi aquele cujo resultado melhor se adequou à utilização no controle durante a cadeia avícola. Nesta condição, o indicador inteligente colado à embalagem primária do produto, indicou visualmente o histórico de tempo e temperatura do alimento de forma fácil, precisa e com baixo custo. Podendo ainda ser armazenado sob congelamento sem alterar seu desempenho.

As flutuações de temperatura mensuradas neste estudo demostraram causar uma redução significativa da validade dos produtos avícolas, acarretando em uma discrepância entre a data final de consumo constante no rótulo e as legítimas condições de qualidade do alimento.

Por isso, a utilização do novo ITT, combinada com sistemas de gestão da produção efetivos, pode constituir uma ferramenta inovadora para garantir a distribuição de alimentos à base de frango seguros.

Estudos complementares podem ser realizados utilizando o principio de funcionamento aqui proposto, com intuito de validar os ITT enzimáticos para utilização em outras cadeias alimentares, conferindo benefícios à conservação de grande variedade de alimentos, e, desta forma, garantindo sua segurança até o consumo.

.

ARTIGO III

ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA DE EMBALAGENS INTELIGENTES: UM ESTUDO BRASILEIRO

1. INTRODUÇÃO

A relação entre o consumidor, a compra e a aceitação de um alimento é um fenômeno complexo. A atitude frente a um produto é influenciada por fatores relacionados à psicologia do consumidor, bem como ao aspecto sensorial e de marketing (JAEGER, 2006; ENNEKING et al., 2006). Nesse contexto, a embalagem apresenta-se como um importante elemento no processo da decisão de compra, sendo a principal mídia do produto (BUELOW et al., 2010).

Estudos recentes evidenciam um aumento no interesse dos consumidores por inovações relacionadas a embalagens alimentícias (WADHERA; CAPALDI-PHILLIPS, 2014; FERNQVIST; EKELUND, 2014; CHEN et al., 2013; VENTER et al., 2010; SIEGRIST, 2008). Por isso, empresas, centros de pesquisa e universidades têm investido no estudo de novas tecnologias, desenvolvendo embalagens inteligentes capazes de fornecer informações aos consumidores sobre possíveis problemas de qualidade do produto embalado (BRIZIO, 2014).

Entre todas as embalagens inteligentes desenvolvidas, os indicadores de tempo e temperatura (ITT) são o segmento que cresce mais rapidamente (HON et al., 2014; BRIZIO, 2014). Os ITTs são dispositivos que contêm uma substância termicamente lábil como mecanismo de funcionamento, e quando anexados à superfície de uma embalagem mostram o histórico de tempo-temperatura cumulativa de um alimento (TAOUKIS; LABUZA, 1989).

Apesar do grande potencial de contribuição destes indicadores, pouco se sabe até onde a tecnologia utilizada para produzir esta inovação pode influenciar a aceitação dos produtos. Por isso, o entendimento das respostas comportamentais dos consumidores torna-se imprescindível. Atendendo a esta lacuna, esta pesquisa visa buscar informações detalhadas sobre a percepção dos consumidores brasileiros frente ao uso de indicadores de tempo e temperatura em embalagens alimentícias. Com isso, foi possível compreender como os consumidores respondem a aplicação de indicadores de tempo e temperatura (ITT); verificar a sua aceitação; constatar como a presença desta tecnologia pode afetar a intenção de compra de um alimento; e caracterizar o perfil do possível comprador de ITT.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Construção do questionário

Um questionário auto administrado foi desenvolvido para este estudo (Figura 1). Inicialmente, a pesquisa foi apresentada juntamente com as instruções de preenchimento do questionário. Perguntas para determinar as características socioeconômicas dos respondentes (sexo, idade, nível de escolaridade e renda familiar mensal) foram inseridas primeiramente, e, logo após, o questionário foi estruturado em 10 perguntas de respostas fechadas, com escala de resposta nominal (dicotômica - sim/não). Buscando informações mais detalhadas, para contextualizar as respostas obtidas através da escala nominal, quatro perguntas deviam ser justificadas pelos respondentes. Em soma, o questionário também apresentava uma breve explicação sobre o que seriam embalagens inteligentes contendo indicadores de tempo e temperatura.

2.2 Validação da clareza do questionário

Com o objetivo de verificar se todos os itens contidos no questionário (Figura 1) eram compatíveis (claros) para a população do estudo (consumidores de alimentos) foi realizada uma análise semântica do seu conteúdo. Para isto, alunos do curso de Administração de Empresas da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), avaliaram sua clareza de linguagem através da ficha apresentada na Figura 2. Um total de 42 alunos, sendo 20 homens e 22 mulheres, de idade entre 19-63 anos participaram da avaliação.

O critério utilizado para avaliar o índice de clareza foi o nível intervalar, onde para cada questão organizou-se uma escala do tipo *Likert* com valores de 1 a 5, sendo 1 = pouco claro e 5 = muito claro. O índice de clareza foi obtido por meio da média aritmética do somatório das notas atribuídas pelos estudantes. As respostas quantitativas também foram justificadas de forma descritiva pelos respondentes. Os enunciados com índice de clareza $\leq$ 4,5 foram reelaborados, sendo substituídos por outros termos com o mesmo conceito. Cabe salientar, que estes questionários não foram analisados ao final do estudo.

Figura 1 - Questionário inicial de avaliação de consumidor

Este questionário faz parte de um Projeto de Doutorado do Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Sua participação é importante, por isso, por favor responda as perguntas a seguir:

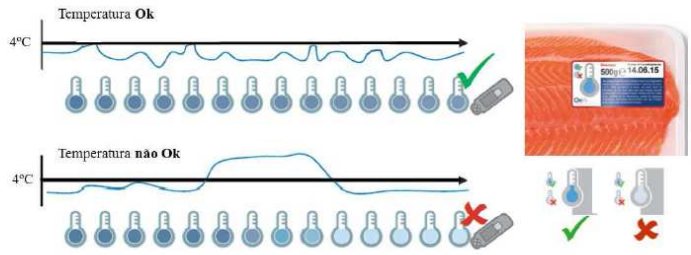
Sexo: Fem. ☐ Masc. ☐ Idade:_____ Escolaridade: Ensino fundamental ☐ Ensino médio ☐ Superior incompleto ☐ Superior completo ☐ Pós-graduação ☐

Renda familiar mensal: 1 a 4 ☐ > 4 a 10 ☐ > 10 ☐
(em salários mínimos)

1. Você geralmente observa os rótulos (dados contidos na embalagem) dos produtos que consome? Se *SIM*, o que você mais observa?
Sim ☐ Não ☐ _____

2. Você já ouviu falar em embalagens inteligentes? Se *SIM*, qual/quais?
Sim ☐ Não ☐ _____

Leia atentamente a descrição abaixo e depois responda as perguntas 3, 4 e 5.
Os chamados indicadores de tempo e temperatura (ITT) são embalagens inteligentes que mostram visualmente ao consumidor o histórico de temperatura do produto durante toda sua validade. A figura abaixo ilustra o funcionamento de um ITT.



*Neste exemplo: Temperatura **OK** = cor do ITT azul; Temperatura **não OK** = cor do ITT cinza clara. Lembrando que a mudança de cor é IRREVERSÍVEL, ou seja, depois que o ITT muda de cor não volta a cor original.*

3. Você considera importante o uso de ITT em alimentos que estragam facilmente (ex. carnes)? Por que?
Sim ☐ Não ☐ _____

4. Você compraria um produto alimentício com ITT?
Sim ☐ Não ☐

5. Considerando que o preço de 1kg de peito de frango seja 10,0 reais, responda as perguntas abaixo:

5.1 Você compraria este produto embalado em uma embalagem com ITT se seu preço fosse 11,0 reais?
Sim ☐ Não ☐

5.2 Você compraria este produto embalado em uma embalagem com ITT se seu preço fosse 12,0 reais?
Sim ☐ Não ☐

5.3 Você compraria este produto embalado em uma embalagem com ITT se seu preço fosse 15,0 reais?
Sim ☐ Não ☐

5.4 Você compraria este produto embalado em uma embalagem com ITT se seu preço fosse 20,0 reais?
Sim ☐ Não ☐

Caso você queira fazer alguma consideração com relação a este questionário use o verso da folha.

Obrigada!

Fonte: autor

Figura 2 - Questionário de avaliação de clareza

Pedimos a sua colaboração para avaliar o instrumento anteriormente respondido quanto a clareza de linguagem.

Considere CLAREZA como a linguagem utilizada nos itens do questionário tendo em vista que os respondentes serão consumidores de alimentos.

"Os itens são suficientemente claros, portanto compreensíveis, para esta população?"

Classifique cada item de 1 à 5, sendo 1 = pouco claro e 5 = muito claro. Marque com "x" a resposta que melhor descreve sua percepção, justificando-a.

A Pergunta nº 1 é: 1. ☐ 2. ☐ 3. ☐ 4. ☐ 5. ☐

Justique sua resposta _____

A Pergunta nº 2 é: 1. ☐ 2. ☐ 3. ☐ 4. ☐ 5. ☐

Justique sua resposta _____

A Pergunta nº 3 é: 1. ☐ 2. ☐ 3. ☐ 4. ☐ 5. ☐

Justique sua resposta _____

A Pergunta nº 4 é: 1. ☐ 2. ☐ 3. ☐ 4. ☐ 5. ☐

Justique sua resposta _____

A Pergunta nº 5 é: 1. ☐ 2. ☐ 3. ☐ 4. ☐ 5. ☐

Justique sua resposta _____

O texto apresentado para explicar as embalagen inteligentes com indicadores de tempo e temperatura (ITT) é:

1. ☐ 2. ☐ 3. ☐ 4. ☐ 5. ☐

Justique sua resposta _____

O esquema ilustrativo do funcionamento de um ITT é:

1. ☐ 2. ☐ 3. ☐ 4. ☐ 5. ☐

Justique sua resposta _____

Caso você queira fazer alguma consideração adicional utilize o verso da folha.

Obrigada!

Fonte: autor

2.3 Participantes do estudo e a apresentação do questionário

O questionário final, após modificações para melhorar sua clareza, foi apresentado a 1806 respondentes, os quais tinham em comum serem consumidores de alimentos e realizarem compras de produtos alimentícios em supermercados. Os questionários foram distribuídos em oito cidades brasileiras, sendo três capitais (São Paulo/SP, Porto Alegre/RS, Florianópolis/SC) e 5 cidades do interior (Pelotas/RS, Rio Grande/RS, Lajeado/RS, Caxias do Sul/RS; Campinas/SP).

Os questionários foram entregues por meio de abordagem direta, ou seja, o pesquisador realizou pessoalmente a entrega do documento, sendo respondido por consumidores de alimentos sem qualquer interferência do primeiro, assim os respondentes expressaram livremente suas percepções.

2.4 Análises dos Dados

Análises qualitativas: Através da respostas dissertativas da pergunta "*Você considera importante o uso de ITT em alimentos? Por que?*" foi realizada uma Análise de Conteúdo. Nesta análise foram avaliados os conteúdos das respostas, determinando categorias comuns, para que posteriormente, através de uma perspectiva quantitativa, estas categorias fossem analisadas numericamente.

Análises quantitativas: a análise estatística dos resultados obtidos a partir do processamento dos questionários foi realizada utilizando o programa SPSS 20.0 (*Statistical Package for the Social Sciences* - IBM, New York, USA). O nível de significância estatístico foi de 5 % ($p < 0,05$).

As respostas de todos os participantes da pesquisa (1806 consumidores de alimentos) foram analisadas, em primeiro lugar, através de uma Análise Descritiva Simples, visando obter e caracterizar às frequências das respostas dos participantes, assim como, descrever as características socioeconômicas da população amostrada.

Logo, os dados foram divididos em dois grupos de análise, conforme resposta à pergunta *"Você geralmente observa os rótulos (dados contidos na embalagem) dos produtos que consome?"*. Assim, as avaliações das respostas do questionário foram reunidas em um grupo daqueles que olham os dados contidos na embalagem (cuja resposta à pergunta foi SIM) e outro grupo para aqueles que não olham as embalagens dos alimentos (cuja resposta à pergunta foi NÃO). Análises foram realizadas para verificar a existência de associação entre as respostas, através de Tabulação Cruzada e Teste Qui-quadrado (χ^2)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Validação da clareza do questionário

A Tabela 1 mostra os resultados da avaliação de clareza do conteúdo contido no questionário proposto na Figura 1, através da resposta da ficha mostrada na Figura 2.

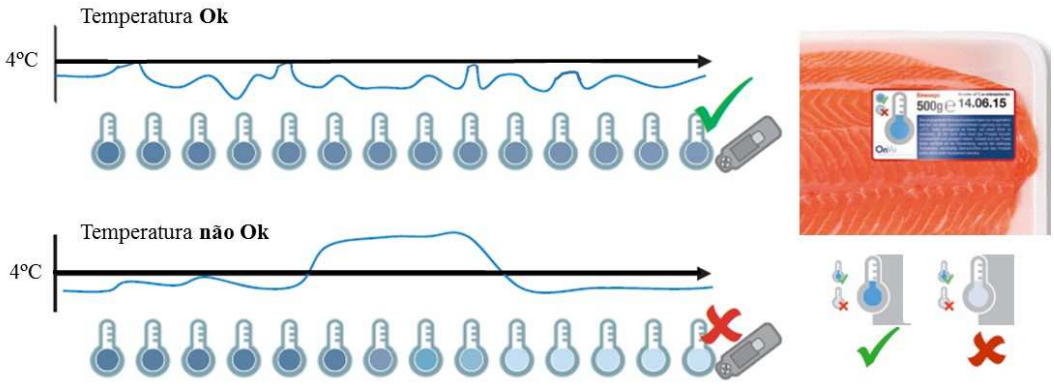
Tabela 1 - Resultados da avaliação da clareza de conteúdo do questionário proposto na Figura 1

Clareza de linguagem	Pontuação média	Justificativa
Pergunta nº1	5,00	Clara
Pergunta nº2	4,50	Sugere-se a alteração da ordem da pergunta para depois do texto explicativo
Pergunta nº3	4,50	"alimentos que estragam facilmente" parece uma afirmação tendenciosa
Pergunta nº4	5,00	Clara
Pergunta nº5	4,97	Clara
Texto explicativo	4,97	Clara
Ilustração esquemática do funcionamento de um ITT	3,91	Difícil entendimento/compreensão

Avaliando os resultados da Tabela 1, e considerando que os enunciados com índice de clareza $\leq$ 4,5 deveriam ser revistos para melhorar a compreensão do questionário, foram reelaboradas as perguntas nº2, nº3 e a ilustração esquemática do funcionamento de um ITT. As justificativas dos avaliadores foram levadas em consideração para a reestruturação dos itens supracitados. Nesse sentido, a pergunta nº2 manteve sua estrutura gramatical, mas foi alocada após o texto explicativo; a pergunta n º3 foi substituída para *"Você considera o uso de ITT em alimentos importante? Por que?"*; e a ilustração esquemática do funcionamento de um ITT passou a ser em forma de imagem sem gráficos, conforme mostra a Figura 3. Após as adequações, o questionário final é apresentado na Figura 4.

Figura 3 - (A) Ilustração esquemática do funcionamento de um ITT contido no questionário inicial (Figura 1); (B) ilustração esquemática do funcionamento de um ITT após adequação (Figura 4)

(A)



(B)

Figura 4 - Questionário final após adequações de clareza de linguagem

Este questionário faz parte de um Projeto de Doutorado do Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Sua participação é importante, por isso, por favor responda as perguntas a seguir:

Sexo: Fem. ☐ Masc. ☐ Idade:_____

Escolaridade: Ensino fundamental ☐
Ensino médio ☐
Superior incompleto ☐
Superior completo ☐
Pós-graduação ☐

Renda familiar mensal: 1 a 4 ☐ > 4 a 10 ☐ > 10 ☐
(em salários mínimos)

1. Você geralmente observa os rótulos (dados contidos na embalagem) dos produtos que consome? Se *SIM*, o que você mais observa?
Sim ☐ Não ☐ _____

Leia atentamente a descrição abaixo e depois responda as perguntas 2, 3, 4 e 5.
Os chamados indicadores de tempo e temperatura (ITT) são embalagens inteligentes que mostram visualmente ao consumidor o histórico de temperatura do produto durante todo sua validade. A figura abaixo ilustra um ITT.

*Neste exemplo: Temperatura **OK** = cor do ITT azul; Temperatura **não OK** = cor do ITT cinza clara. Lembrando que a mudança de cor é IRREVERSÍVEL, ou seja, depois que o ITT muda de cor não volta a cor original.*

2. Você já ouviu falar em embalagens inteligentes? Se *SIM*, qual/quais?
Sim ☐ Não ☐ _____

3. Você considera importante o uso de ITT em alimentos? Por quê?
Sim ☐ Não ☐ _____

4. Você compraria um produto alimentício com ITT?
Sim ☐ Não ☐

5. Considerando que o preço de 1kg de peito de frango seja 10,0 reais, responda as perguntas abaixo:

5.1 Você compraria este produto embalado em uma embalagem com ITT se seu preço fosse 11,0 reais?
Sim ☐ Não ☐

5.2 Você compraria este produto embalado em uma embalagem com ITT se seu preço fosse 12,0 reais?
Sim ☐ Não ☐

5.3 Você compraria este produto embalado em uma embalagem com ITT se seu preço fosse 13,0 reais?
Sim ☐ Não ☐

5.4 Você compraria este produto embalado em uma embalagem com ITT se seu preço fosse 14,0 reais?
Sim ☐ Não ☐

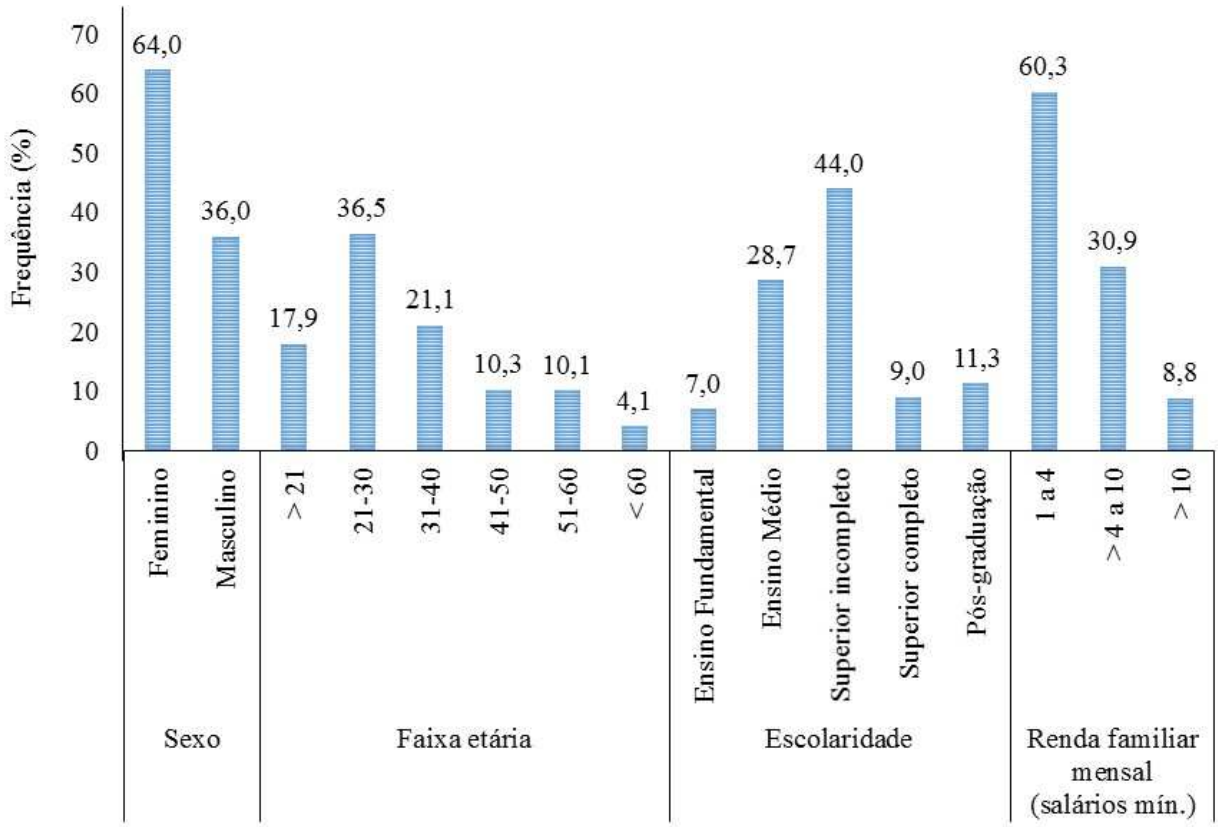
5.5 Você compraria este produto embalado em uma embalagem com ITT se seu preço fosse 15,0 reais?
Sim ☐ Não ☐

Caso você queira fazer alguma consideração com relação a este questionário use o verso da folha. *Obrigada!*

3.2 Avaliação dos resultados de toda a população amostral (n = 1806)

Na Figura 5 tem-se a descrição do perfil socioeconômico dos participantes do estudo, enquanto a Tabela 2 apesenta a frequência das suas respostas às perguntas fechadas dicotômicas presentes no questionário.

Figura 5 - Características socioeconômicas dos consumidores de alimentos pesquisados (n = 1806)



A faixa etária predominante dos entrevistados foi de 21-40 anos (57,6 %), sendo a maioria do sexo feminino, com escolaridade dominante entre o ensino médio e graduação em andamento. Os entrevistados apresentaram em sua maioria, renda salarial mensal de 1 a 4 salários mínimos (60,3 %). Os resultados representam bem as características socioeconômicas dos brasileiros, onde segundo IBGE (2013), em torno de 66 % dos brasileiros ativos (entre 19 e 65 anos) tem de 20 a 40 anos e renda mensal média de até 3 salários mínimos.

Tabela 2 - Frequência das respostas dos consumidores de alimentos amostrada frente às perguntas fechadas dicotômicas presentes na pesquisa (n = 1806)

	Frequência (%)	
Descrição da pergunta	Sim	Não
Você geralmente observa os rótulos?	70,1	29,9
Você já ouviu falar em embalagens inteligentes?	11,9	88,1
Você considera importante o uso de ITT?	98,2	1,8
Você compraria um produto alimentício com ITT?	98,6	1,4
Você compraria um produto com ITT se ele custasse 10 % a mais?	85,1	14,9
... e se custasse 20 % a mais?	55,4	44,6
... e se custasse 30 % a mais?	25,3	74,7
... e se custasse 40 % a mais?	12,5	87,5
... e se custasse 50 % a mais?	10,3	89,7

A maioria dos participantes (70,1 %) relatou observar os rótulos dos produtos alimentícios. Cerca de 10 % dos entrevistados já tinham ouvido falar de embalagens inteligentes, no entanto, destes em torno de 90 % citaram conhecer apenas a embalagem inteligente da Cerveja Skol, a qual esteve presente no rótulo desta marca de cerveja por um período, mas seu sistema não era irreversível (uma parte do rótulo mostrava a coloração azul quando a cerveja estava “gelada – pronta para beber” e incolor quando estava “quente – não consumir”, no entanto o mesmo rótulo poderia mostrar inúmeras vezes essas situações), o que torna o seu funcionamento e apelo totalmente diferente.

Percentuais positivos elevados, acima de 98 %, foram obtidos através das respostas dadas pelos consumidores com relação à importância do uso de ITT em alimentos e com relação à intenção de compra desses produtos. Esses valores se mantiveram bastante elevados (85,1 %) ainda se o produto apresentasse um acréscimo de 10 % no valor (preço), em comparação ao concorrente sem ITT.

Se o uso de indicadores de tempo e temperatura em embalagens alimentícias causasse um incremento de 50 % no valor (preço) do produto em relação ao concorrente sem ITT, mais de 10 % da população amostrada ainda compraria o produto contendo o ITT. Neste caso, parece que o benefício percebido pelo uso de ITT foi o fator preponderante na influência da aceitação

de novos alimentos. Estudos realizados por Frewer et al. (2004), Brown e Ping (2003), e Magnusson e Hursti (2002), evidenciaram que quando os consumidores conseguem perceber benefícios tangíveis aos produtos inovadores sua vontade de comprá-los aumenta. Pesquisa realizada por Ronteltap et al. (2007), baseado em uma revisão da literatura, concluiu que a percepção do custo-benefício é o principal determinante dos consumidores na aceitação de novas tecnologias alimentares.

Segundo autores como Choi et al. (2013) e Deliza et al. (2003), a crescente demanda por produtos seguros, saudáveis e nutritivos é consequência da presença de consumidores cada vez mais exigentes, fato que contribui para uma necessidade contínua de novos produtos. Este cenário colabora para o desenvolvimento de tecnologias emergentes, que podem conduzir à disponibilidade de produtos com melhor qualidade, como por exemplo, alimentos contendo embalagens inteligentes. No entanto, a aceitação pelos consumidores é crucial para o sucesso de uma inovação em produtos alimentícios (SIEGRIST, 2008). Do ponto de vista da atitude dos consumidores, as inovações podem ser categorizadas como receptivas ou resistentes (GARCIA et al., 2007). Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram que o uso de ITT em embalagens alimentícias parece ser uma inovação receptiva, com consequente aceitação e intenção de compra elevada pela população brasileira.

Sheth et al. (2001) definiram o comportamento do consumidor como “as atividades físicas e mentais que resultam em decisões e ações, como comprar e utilizar produtos, bem como quanto pagar por eles”. Por isso, investigar o comportamento do consumidor antes de uma inovação em embalagem ser totalmente desenvolvida é o ponto-chave para o seu sucesso. Assim, buscando informações mais detalhadas, para contextualizar as respostas obtidas na Tabela 3, foram avaliadas as justificativas (dados qualitativos) apontadas pelos consumidores para a pergunta nº3 do questionário final (Figura 4) e após, foi realizada uma categorização das respostas através da similaridade de conteúdo. O Quadro 1 mostra as categorias que emergiram da avaliação de conteúdo e suas respectivas frequências.

Nota-se no Quadro 1 que emergiram durante a pesquisa diferentes percepções de importância com relação ao uso de indicadores de tempo e temperatura em embalagens alimentícias. Atributos relacionados a parâmetros de controle e qualidade dos produtos foram os mais lembrados pelos respondentes, no entanto, também foram levantadas questões relacionadas à integridade fisica e mental dos consumidores (como saúde, comer produtos aptos para consumo, etc). Cabe ressaltar, que 28 respondentes de um total de 1806 não acharam

importante o uso de ITT em alimentos, mas somente 7 participantes justificaram as razões, as quais também constam no Quadro 1.

Quadro 1 - Categorias e suas respectivas descrições e frequências (n = 1806) após a realização da Análise de Conteúdo das respostas dissertativas da pergunta *"Você considera importante o uso de ITT em alimentos? Por que?"*

Categoria	Descrição	Frequência (%)
Qualidade	*Qualidade:* saber; garantir; manter; controlar; identificar; analisar; avaliar; indicar; informar; preservar; ver; assegurar; melhorar; monitorar; visualizar a qualidade dos alimentos.	21,0
Temperatura	*Temperatura:* facilitar a identificação da; controlar a; indicar a; saber a; saber sobre o histórico de; indicar se houve variação da temperatura dos alimentos. Indicar; identificar; saber; mostrar; manter a temperatura certa; adequada; ideal para o consumo.	12,8
Promover produtos aptos	*Promover produtos aptos:* dar certeza de comprar; consumir um produto bom. Facilitar o reconhecimento do produto bom. Saber se o produto está bom. Indicar; verificar se o alimento está apto; próprio; em boas condições para o consumo. Indicar; saber se o produto está fresco.	12,8
Conservação	*Conservação:* manter a; melhorar a; identificar a; identificar uma boa; garantir a; garantir uma boa; controlar a; saber a; facilitar uma boa; acompanhar a; conhecer as condições; saber as condições; revelar as condições de conservação dos alimentos. Mostrar; identificar; indicar; conhecer o estado de conservação dos alimentos.	11,7
Confiança	*Confiança:* confiabilidade; confiança; maior confiança; maior confiabilidade na compra do produto. Saber se é confiável. Garantir a verdade. Garantir a	7,3

	procedência. Saber o que consumir; comprar. Garantir a integridade dos alimentos.	
Não justificaram a importância	*Não responderam*	7,1
Evitar produtos inaptos	*Evitar produtos inaptos:* informar ao consumidor se o produto está ruim. Evitar a venda de produtos estragados; deteriorados; vencidos. Evitar o consumo de produtos estragados; deteriorados; vencidos; ruins. Evitar a compra de produtos estragados; deteriorados; vencidos. Não gastar com produtos ruins.	6,2
Saúde	*Saúde do consumidor:* mais segurança da nossa; melhorar nossa; ter mais; importante para nossa; não causar danos a nossa; evitar a compra de produtos de façam mal a nossa; evitar o risco a; proteger o consumidor de ingerir alimentos que façam mal a; garantir o consumo de produtos bons para nossa saúde. Consumir alimentos mais; ajudar a ter um produto mais; saber se o produto é mais saudável.	4,8
Segurança	*Segurança:* aumentar a; melhorar a; garantir a; controlar a; atender aos requisitos de segurança ao consumir alimentos. Possibilitar a compra; maior controle na venda; garantir a venda de alimentos seguros	4,8
Armazenamento	*Armazenamento:* garantir o bom; saber as condições de; controlar as condições de; informar sobre o; melhorar o; ter certeza do bom armazenamento dos alimentos. Saber se; verificar se; mostrar se; indicar se os alimentos foram bem armazenados.	4,7
Validade	*Validade:* observar a; mostrar a, identificar a; verificar a; facilitar a verificação da; saber sobre a; ter certeza da; melhorar o controle da verdadeira validade dos alimentos.	3,0

Orientação	*Orientação:* fornecer informações adicionais ao consumidor.	2,9
Fraude	*Fraude:* fiscalizar; evitar; proteger fraudes nos alimentos.	2,2
Comercialização	*Comercialização:* evitar que os comerciantes desliguem os refrigeradores dos estabelecimentos; saber se o processo de refrigeração comercial funciona; controlar a comercialização dos alimentos	1,8
Não acham importante	*Respostas diversas para justificar que não consideram importante o uso de ITT em alimentos*: não observo rótulos; validade e conservação do alimento deve ser priorizado independente da embalagem; mais um item para encarecer os alimentos; não é um diferencial; sou vegano.	1,6
Praticidade	*Praticidade:* maior praticidade na compra de alimentos.	1,4
Alerta	*Alerta:* alertar o; chamar a atenção do; manter atento o consumidor.	1,0
Direito	*Direito:* direito do consumidor	0,8
Padronização	*Padronização:* padronizar controles.	0,8

As relações entre as categorias destacadas como importantes pelos consumidores participantes e as demais respostas do questionário são apresentadas e discutidas no item subsequente deste trabalho.

3.2 Avaliação dos resultados da população amostral que observa os rótulos X população amostral que não observa os rótulos das embalagens alimentícias

Nas Tabelas 3 e 4 são apresentados os perfis socioeconômicos dos respondentes e a frequência de suas respostas às perguntas presentes no questionário, respectivamente, ambas considerando a divisão dos participantes do estudo em dois grupos de análise, onde um grupo compreende as respostas dos participantes que observam os rótulos, e o outro compila os dados daqueles que não observam os rótulos dos produtos alimentícios.

Tabela 3 - Características socioeconômicas dos consumidores pesquisados divididos em dois grupos de análise, dos que observam os rótulos e dos que não observam os rótulos dos alimentos

		Frequência (%)	
Característica	Descrição	Observam rótulos (n=1126)	Não observam rótulos (n=680)
Sexo	Feminino	67,9[a]	55,2[b]
	Masculino	32,1[a]	44,8[b]
Faixa etária	< 21	14,9[a]	24,8[b]
	21-30	37,7[a]	35,9[a]
	31-40	22,4[a]	16,3[b]
	41-50	10,7[a]	8,8[b]
	51-60	10,4[a]	9,6[a]
	> 60	3,9[a]	4,6[a]
Escolaridade	Ensino Fundamental	5,9[a]	9,5[b]
	Ensino Médio	25,6[a]	36,2[b]
	Superior incompleto	45,1[a]	41,4[a]
	Superior completo	10,2[a]	6,0[b]
	Pós-graduação	13,2[a]	6,9[b]
Renda familiar mensal (salários mínimos)	1 a 4	57,5[a]	67,5[b]
	> 4 a 10	32,7[a]	26,5[b]
	> 10	9,8[a]	6,0[b]

Valores identificados com letras iguais dentro de uma mesma linha não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) pelo Qui-quadrado.

Através da avaliação dos resultados contidos na Tabela 3 pode-se constatar que: os participantes do sexo masculino tendem a observar menos os rótulos dos que os consumidores do sexo feminino; jovens menores de 21 anos e consumidores com idade superior a 51 observam menos os rótulos dos produtos; o nível de escolaridade e a renda dos consumidores que observam os rótulos é superior ao daqueles que não observam os dados contidos nas embalagens de alimentos.

Apesar das diferenças socioeconômicas encontradas entre os dois grupos de análise, não foi verificada diferença significativa ($p > 0,05$) entre eles (grupos) em relação a importância do

uso de ITT em alimentos e sua intenção de compra para estes produtos. No entanto, quando o uso de ITT em embalagens alimentícias foi associado a um incremento de preço de até 30 %, a intenção de compra divergiu entre os dois grupos, conforme mostra a Tabela 4. Para aumento no preço dos produtos com ITT acima de 40 % ambos grupos apresentaram intenção de compra semelhante.

Tabela 4 - Frequência das respostas dos consumidores pesquisados divididos em dois grupos de análise, dos observam os rótulos e dos que não observam os rótulos dos alimentos

	Frequência (%)			
	Observam rótulos (n=1126)		Não observam rótulos (n=680)	
Descrição da pergunta	Sim	Não	Sim	Não
Você considera importante o uso de ITT?	98,8[a]	1,2	97,1[a]	2,9
Você compraria um produto alimentício com ITT?	98,9[a]	1,1	97,9[a]	2,1
Você compraria um produto com ITT se ele custasse 10% a mais?	87,4[a]	12,6	79,8[b]	20,2
... e se custasse 20 % a mais?	58,5[a]	41,5	47,9[b]	52,1
... e se custasse 30 % a mais?	27,2[a]	72,8	20,6[b]	79,4
... e se custasse 40 % a mais?	12,8[a]	87,2	11,8[a]	88,2
... e se custasse 50 % a mais?	10,1[a]	89,9	10,5[a]	89,5

Valores identificados com letras iguais dentro de uma mesma linha não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) pelo Qui-quadrado.

Os resultados das duas primeiras perguntas contidas na Tabela 4 evidenciam que, mesmo os consumidores que não olham os rótulos dos alimentos consideraram importante o uso de ITT em embalagens de produtos alimentícios e comprariam estes produtos. No entanto, pelo fato deles não olharem as embalagens, estratégias de *marketing* precisariam ser desenvolvidas para que este tipo de consumidor prestasse atenção às embalagens ou saibam que um determinado produto contém este diferencial, caso contrário ele poderá não comprar o produto pelo simples fato de não saber da existência do uso de ITT. De acordo com estudos realizados por Gutjar et al. (2015), Chen et al. (2013), Brown e Ping (2003) e Magnusson e

Hursti (2002), os consumidores que foram expostos a informações sobre a aplicação da inovação, apresentaram melhores índices de aceitação e intenção de compra.

Na Tabela 5 são apresentadas as frequências das categorias de atributos relacionados à importância do uso de ITT em alimentos, as quais foram mencionadas pelos dois grupos de análise (participantes que observam os rótulos e participantes que não observam os rótulos das embalagens alimentícias).

Tabela 5 - Frequência das categorias de atributos de importância do uso de ITT mencionados pelos dois grupos de análise

	Frequência (%)	
Categoria	Observar rótulos (n=1126)	Não observam rótulos (n=680)
Qualidade	21,0	15,5
Conservação	11,1	6,7
Armazenamento	4,1	4,6
Temperatura	8,5	12,1
Orientação	2,7	3,3
Evitar produtos inaptos	5,5	5,9
Promover produtos aptos	10,7	11,3
Validade	2,8	2,5
Segurança	5,3	2,1
Confiança	6,5	5,4
Saúde	4,6	3,8
Praticidade	1,1	1,3
Alerta	1,2	0,8
Fraude	3,1	0,0
Direito	0,7	0,8
Padronização	1,2	0,0
Comercialização	2,3	0,0
Sem descrição	6,9	22,6
Diversos - não acham importante	0,7	1,3

Com exceção das categorias “Fraude”, “Padronização” e “Comercialização”, as demais categorias foram lembradas pelos consumidores pertencentes aos dois grupos. Nota-se que o número de participantes que não justificou a importância do uso de ITT em alimentos foi muito superior no grupo dos consumidores que disseram não observar os rótulos dos alimentos (22,6 %), fato este que pode ter contribuído para os mais baixos valores pagos por esse tipo de consumidor quando deparado com as perguntas *“Você compraria um produto com ITT se ele custasse 10 % a mais? ... e se custasse 20 % a mais? ... e se custasse 30 % a mais?”*.

A Tabela 6 apresenta as relações entre as categorias destacadas como importantes pelos consumidores e suas respectivas intenções de compra para produtos alimentícios com ITT, para os dois grupos de análise. Avaliando estes dados, constata-se que os atributos ligados à integridade física e mental dos consumidores (de ambos os grupos) foram os que receberam maior intenção de compra. Nota-se, que os consumidores que associaram o uso de ITT em alimentos ao consumo de um produto melhor, atribuiram um maior benefício percebido. Assim, categorias como “Segurança”, “Confiança”, “Saúde”, “Produtos Aptos”, apresentaram índices de aceitação elevados para os dois grupos de consumidores avaliados. Segundo Ram (1989), as percepções de valor de uso se relacionam diretamente com o custo-benefício percebido de uma inovação, e ao mesmo tempo reduzem as barreiras psicológicas da resistência do consumidor frente a essa novidade.

Um destaque especial deve ser dado para a categoria “Saúde”. Os participantes que atribuíram um benefício a sua saúde ao consumir alimentos contendo ITT apresentaram os maiores índices de intenção de compra deste estudo (cerca de 40 % dos respondentes desta categoria pagaria até 50 % a mais no preço de um produto com ITT), não diferindo estatisticamente ($p > 0,05$) entre os dois grupos de consumidores avaliados. Estes resultados vem ao encontro dos dados observados nos trabalhos de Jaeger (2006) e Beardsworth et al. (2002), os quais detectaram que os consumidores tendem a atribuir maior custo-benefício a uma inovação em alimentos que retrate saudabilidade. Neste sentido, ressalta-se novamente a importância de estabelecer estratégias de *marketing* eficazes para remeter ao consumidor de alimentos a imagem verdadeira e confiável de que o uso de ITT no produto que irá consumir/comprar poderá auxiliar na garantia da sua saudabilidade e na saubabilidade do alimento (alimento seguro). Isto porque, os atributos associados no momento da compra (categorias da Quadro 1) são de maior importância na aceitação e intenção de compra de produtos contendo ITT do que as características socioeconômicas dos consumidores.

Tabela 6 - Relação entre as categorias de importância do uso de ITT em alimentos e suas respectivas intenções de compra de produtos com ITT, para cada grupo de análise

Descrição	Nada				Qualidade				Conservação				Armazenamento				Temperatura				Orientação			
	Não olham rótulos		Olham rótulos		Não olham rótulos		Olham rótulos		Não olham rótulos		Olham rótulos		Não olham rótulos		Olham rótulos		Não olham rótulos		Olham rótulos		Não olham rótulos		Olham rótulos	
	Frequência (%)																							
	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
Você compraria um produto com ITT se ele custasse 10% a mais?	73,1a	26,9	78,4a	21,6	73,1a	26,9	95,5b	5,0	75,0a	25,0	89,7b	10,3	72,7a	27,3	82,6b	17,4	82,8a	17,2	83,1a	16,9	87,5a	12,5	91,7a	8,3
... e se custasse 20% a mais?	35,8a	64,8	48,6b	51,4	35,8a	64,2	64,5b	35,5	68,8a	31,2	60,3a	39,7	36,4a	63,6	60,9b	39,1	48,3a	51,7	40,7b	59,3	50,0a	50,0	50,0a	50,0
... e se custasse 30% a mais?	9,0a	91,0	18,9b	81,1	9,0a	91,0	33,9b	66,1	37,5a	62,5	25,0b	75,0	18,2a	81,8	17,4a	82,6	17,2a	82,8	20,3a	79,7	0,0	100,0	25,0	75,0
... e se custasse 40% a mais?	6,0a	94,0	5,4a	94,6	6,0a	94,0	14,9b	85,1	25,0a	75,0	4,4b	95,6	9,1	90,9	0,0	100,0	6,9a	93,1	16,9b	83,1	0,0	100,0	16,7	83,3
... e se custasse 50% a mais?	6,0a	94,0	5,4a	94,6	6,0a	94,0	13,2b	86,8	25,0a	75,0	4,4b	95,6	9,1	90,9	0,0	100,0	6,9a	93,1	16,9b	83,1	0,0	100,0	16,7	83,3

Produtos Inaptos				Produtos Aptos				Segurança				Confiança				Saúde				Praticidade				Alerta			
Não olham rótulos		Olham rótulos		Não olham rótulos		Olham rótulos		Não olham rótulos		Olham rótulos		Não olham rótulos		Olham rótulos		Não olham rótulos		Olham rótulos		Não olham rótulos		Olham rótulos		Não olham rótulos		Olham rótulos	
Frequência (%)																											
Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
100,0a	0,0	83,9b	16,1	88,5a	11,5	89,4a	10,6	100,0a	0,0	96,7a	3,3	84,6a	15,4	92,3b	7,7	88,9a	11,1	100,0b	0,0	66,7a	33,3	100,0b	0,0	100,0	0,0	85,7	14,3
71,4a	28,6	58,1b	41,9	65,4a	34,6	65,2a	34,8	100,0a	0,0	86,7b	13,3	61,5a	38,5	61,5a	38,5	88,9a	11,1	100,0b	0,0	0,0a	100,0	33,3b	66,7	100,0	0,0	57,1	42,9
21,4a	78,6	25,8a	74,2	30,8a	69,2	27,3a	72,7	80,0a	20,0	56,7b	43,3	23,1a	76,9	28,2	71,8	77,8a	22,2	92,3b	7,7	0,0a	100,0	16,7b	83,3	0,0	100,0	42,9	57,1
14,3a	85,7	16,1a	83,9	23,1a	76,9	9,1b	90,9	60,0a	40,0	26,7b	73,3	7,7a	92,3	10,3a	89,7	55,6a	44,4	61,5b	38,5	0,0a	100,0	0,0a	100,0	0,0	100,0	42,9	57,1
14,3a	85,7	12,9a	87,1	23,1a	76,9	9,1b	90,9	20,0a	80,0	6,7b	93,3	7,7a	92,3	7,7a	92,3	44,4a	55,6	38,5a	61,5	0,0a	100,0	0,0a	100,0	0,0	100,0	6,7	93,3

Valores identificados com letras iguais dentro de uma mesma linha não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) pelo Qui-quadrado.

4. CONCLUSÃO

Percentuais acima de 98 % foram obtidos através das respostas dadas pelos consumidores com relação à importância do uso de ITT em alimentos e com relação à intenção de compra desses produtos. Estes valores se mantiveram elevados ainda se o produto apresentasse um acréscimo de 10 % no preço em comparação ao concorrente sem ITT. Os resultados mostram que o uso de ITT em embalagens alimentícias é uma inovação receptiva, com consequente aceitação e intenção de compra elevada pela população brasileira.

Os resultados evidenciaram que os atributos associados no momento da compra/consumo são mais importantes na aceitação e intenção de compra de produtos contendo ITT do que as características socioeconômicas dos consumidores. Assim, aqueles consumidores que associaram a importância do uso de ITT em alimentos com benefícios a sua saúde apresentaram o maior índice de intenção de compra deste estudo, com cerca de 40% dos respondentes pagando até 50 % a mais no preço de um produto com ITT. Nesse sentido, ressalta-se a importância de colocar no mercado ITT que sejam confiáveis, e que sejam estabelecidas estratégias de *marketing* para que o consumidor desta inovação perceba um benefício tangível na garantia da sua saúde e na segurança do alimento.

CAPÍTULO IV – CONCLUSÃO GERAL

O princípio do método proposto para elaboração de novos indicadores enzimáticos de tempo e temperatura se mostrou eficaz, apresentando resultados favoráveis tanto para a utilização no acompanhamento de processos térmicos, quanto no acompanhamento da cadeia de distribuição de produtos refrigerados.

A resposta de cor dos protótipos de ITT foi visualmente interpretada, como adaptável à medição usando equipamentos adequados, apresentando boa reprodutibilidade durante a descoloração em todas as condições estudadas (pasteurização e refrigeração). Devido à possibilidade de definir a vida-útil dos ITT variando as concentrações de enzima, os novos indicadores podem ser facilmente utilizados para controlar as condições de temperatura de diversos alimentos perecíveis.

Na validação de processos térmicos de presuntos, o protótipo de ITT contendo 6,5 % de amilase termoestável foi aquele que obteve melhor resultado. Nesta condição, o indicador inteligente colado à embalagem primária do produto indicou visualmente o processo de pasteurização de forma fácil, precisa, não destrutiva e com baixo custo (cerca de 0,25 reais/unidade).

Durante a avaliação da cadeia de distribuição de produtos avícolas refrigerados, o protótipo de ITT contendo 60 % de amilase termosensível foi aquele que apresentou os melhores resultados. Com esta quantidade de enzima na sua formulação, o indicador inteligente anexado a embalagem de produtos à base de frango mostrou o histórico de tempo e temperatura destes alimentos de forma fácil, precisa e com baixo custo (em torno de 0,078 reais/unidade).

As flutuações de temperatura, mensuradas durante a cadeia de distribuição de produtos refrigerados, demostraram causar uma redução significativa da validade dos produtos avícolas, acarretando em uma discrepância entre a data final de consumo constante no rótulo e as legítimas condições de qualidade do alimento. Resultados que ressaltam a importância da implementação de inovações que possibilitem conhecer o histórico real de temperatura ao qual o alimento foi exposto e, com isso, predizer sua verdadeira vida-útil.

Desta forma, a utilização dos novos ITT desenvolvidos, combinada com sistemas de gestão da produção efetivos, pode significar: *para o cliente*, um alimento seguro, interativo e com vida-útil nominal assegurada; *para o fabricante*, a possibilidade de identifcar ineficiências, reduzir índices de reclamação, melhorar a imagem da empresa e, consequentemente, aumentar o lucro; *para os estabelecimentos comerciais*, a obrigatoriedade de cumprir com os regimes de temperatura constantes nos rótulos dos produtos alimentícios.

Os resultados obtidos na avaliação das percepções dos consumidores frente ao emprego de indicadores inteligentes em embalagens alimentícias mostram que o uso de ITT é uma inovação receptiva, com consequente aceitação e intenção de compra elevada pela população brasileira. Assim, com este trabalho espera-se contribuir efetivamente para que o conceito de embalagens inteligentes possa ser aceito comercialmente e que normas regulamentando seu uso sejam estabelecidas, conferindo benefícios à conservação de grande variedade de alimentos.

SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Novos estudos podem ser realizados, utilizando o mesmo mecanismo de funcionamento prospoto neste trabalho, com objetivo de validar outras concentrações de enzima nos ITT para ampliar sua aplicação, tanto durante o acompanhamento de processos térmicos, quanto no acompanhamento da cadeia de distribuição de produtos alimentícios refrigerados.

Estudos complementares ainda podem ser elaborados com intuito de desenvolver *designers* mais atrativos, ou buscar aplicar os indicadores inteligentes enzimáticos diretamente no material da embalagem.

CAPÍTULO V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

APHA. American Public Health Association. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington. DC, p. 676, 2001.

ARIAS-MENDEZ, A.; VILAS, C.; ALONSO, A.A.; BALSA-CANTO, E. Time e temperature integrators as predictive temperature sensors. **Food Control**, v. 44, p. 258-266, 2014.

AUNG, M.M.; CHANG, Y. S. Temperature management for the quality assurance of a perishable food supply chain. **Food Control**, 40, 198-207, 2014.

AYMERICH, T.; PICOUET, P.; MONFORT, J. Decontamination technologies for meat products. **Meat Science**, v.78 (1-2), p. 114-129, 2008.

AZEREDO, H.M.C. Fundamentos de estabilidade de alimentos. In: Azeredo, H.M.C., Faria, J.A.F., Brito, E.S. **Embalagens e suas interações com os alimentos**. Ed. Técnica da Embrapa, 2012.

BANKS, W.; GREENWOOD, C.T. **Starch and its components**. Edinburg: Edinburg University Press, 1975.

BARBUT, S. **Poultry products processing: an industry guide**. Boca Raton: CRC, p.548, 2002.

BASF. **Packing network team time temperature indicator** – *OnVu*®. (Boletim Técnico), 2012.

BEARDSWORTH, A.; BRYNAN, A.; KEIL, T.; GOODE, J.; HASLAM, C.; LANCASHIRE, E. Women men and food: The significance of gender and nutritional attitudes and choices. **British Food Journal**, v.104(7), p.470–491, 2002.

BIZERBA. Disponível em: www.bizerba.com , acessado em 06/2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 20** de 31 de julho de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Almôndega, de Apresuntado, de Fiambre, de Hamburguer, de Kibe, de Presunto Cozido e de Presunto. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF. Seção I, p. 7-12, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº9**, de abril de 2009. Institui os Procedimentos de Controle da *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF. Seção I, p. 51-53, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *Portaria n°210*, de 10 de novembro de 1998. Aprova Regulamento técnico de inspeção tecnológica e higiênico – sanitária de carnes de aves. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 26 de dezembro de 1998. Seção I, p. 226-272, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº62**, de 26 de agosto de 2003. Aprova os Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para o controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 18 de setembro 2003. Seção I, p.21-32; 40-43; 51-67, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RDC nº12**, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF. Seção I, p. 46-53, 2001.

BRIZIO, A.P.B.R.; GONZAGA Jr., M.A.; DOS SANTOS, F.F.H.; PRENTICE, C. Dynamic monitoring of the shelf life of Cobia (*Rachycentron canadum*): a study on the applicability of a smart photochromic indicator. **International Journal of Food Science & Technology**, v.50, 2015.

BRIZIO, A.P.D.R. **Embalagens ativas e inteligentes: Tecnologias emergentes para o controle dinâmico da qualidade de alimentos**. Ed. da FURG, Rio Grande, 110p, 2014.

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

BROWN, J.L.; PING, Y.C. Consumer perception of risk associated with eating genetically engineered soybeans is less in the presence of a perceived consumer benefit. **Journal of the American Dietetic Association**, v.103(2), p.208–214, 2013.

BUELOW, S.; LEWIS, H.; SONNEVELD, K. The role of labels in directing consumer packaging waste. **Management of Environmental Quality: An International Journal,** v. 21, n. 2, p. 198-213, 2010.

CALEGUER, V.C.; MINIM, V.P.R.; BENASSI, M.T. Impact of Package on the Consumer Purchase Intention for a Powdered Orange Flavoured Soft Drink. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, p. 159-168, 2007.

CÁRDENAS, F.C.; GIANNUZZI, L.; ZARITZKY, N. E. Mathematical modelling of microbial growth in ground beef from Argentina. Effect of lactic acid addition, temperature and packaging film. **Meat Science**, v.79, p.509-520, 2008.

CARVALHO, R.V., CÔRREA, T.L.R., SILVA, J.C.M, MANSUR, L.R.C.O, MARTINS, M.L.L. Properties of an amylase from thermophilic Bacillus sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39: p.102-107, 2008.

CHEN, Q.; ANDERS, S.; AN, H .Measuring consumer resistance to a new food technology: A choice experiment in meat packaging. **Food Quality and Preference,** v.28, p. 419–428, 2013.

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, p.118–123, 2014.

CODEX ALIMENTARIUS. **Code of Hygienic Practice for Refrigerated Packaged Foods With Extended Shelf Life**. CAC/RCP 46, 1999.

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

CRYOLOG. Disponível em :www.cryolog.com, acessado em 06/2015.

DECLERCK, N.; MACHIUS, M.; WIEGAND, G.; HUBER, R.; GAILLARDIN, C. Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis* α-amylase. **Journal of Molecular Biology**, v. 31, p. 1041-1057, 2000.

DELIZA, ROSENTHAL, A.; SILVA, A.L.S. Consumer attitude towards information on non conventional technology. **Trends in Food Science & Technology,** v.14, p. 43–49, 2003.

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

ELLOUZE, M.; PICHAUD, M.; BONAITI, C.; COROLLER, L.; COUVERT, O, THAUAULT, D.; VAILLANT, R. Modelling pH evolution and lactic acid production in the growth medium of a lactic acid bacterium: Application to set a biological TTI. **International Journal of Food Microbiology**, v.128, p.101–107, 2008.

ENNEKING, U.; NEUMANN, C.; HENNEBERG, S. How important intrinsic and extrinsic product attributes affect purchase decision. **Food Quality and Preference**, v.18 (1), p. 133-138, 2007.

FAI, A.E.C.; FIGUEIREDO, E.A.T.; VERDIN, S.E.F.; PINHEIRO, N.M.S.; BRAGA, A.R.C.; STAMFORD, T.L.M. *Salmonella sp* and *Listeria monocytogenes* in fully cooked ham commercialized in supermarkets of Fortaleza (CE, Brazil): risk factor for public health. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.16(2), p.657-662, 2011.

FERNQVIST, F.; EKELUND, L. Credence and the effect on consumer liking of food – A review. **Food Quality and Preference**, v. 32, p. 340–353, 2014.

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

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

FRESH CHECK. Disponível em :www.fresh-check.com, acessado em 06/2015.

FREWER, L.; LASSEN, J.; KETTLITZ, B.; SCHOLDERER, J.; BEEKMAN, V.; BERDAL, K.G. Societal aspects of genetically modified foods. **Food and Chemical Toxicology**, v.42(7), p.1181–1193, 2004.

GALIĆ, K.; ŠČETAR, M.; KUREK, M. The benefits of processing and packaging. **Trends in Food Science and Technology**, v.22, p.127-137, 2011.

GARCIA, R.; BARDHI, F.; FRIEDRICH, C. Overcoming consumer resistance to innovation. **MIT Sloan Management Review**, 48(4), 82–88, 2007.

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

GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K. ; CHAUHAN, B. Microbial α-Amylases: a Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**, v.1, p. 1-18, 2003.

GUTJAR, S.; DE GRAAF, C.; PALASCHA, A.; JAGER, G. Food choice: The battle between package, taste and consumption situation. **Appetite**, v. 80, p. 109–113, 2014.

HUI, Y. H. **Handbook of Food Science, Technology, and Engineering**. Volume 1 e 2. New York: CRC Press., 2006.

IBGE. Instituo Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em www.ibge.gov.br/, acessado em 07/2015.

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganisms in foods: their significance and methods of enumeration**. Toronto: University of Toronto, 1978.

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Shelf-Life Prediction of Chilled Foods**, v.4. Ed. Springer. Reykjavík, Iceland, 2009.

INSTITUTO TECNOLÓGICO DEL EMBALAJE, TRANSPORTE Y LOGÍSTICA (ITENE). **Envases inteligentes: nuevos dispositivos que mejoran la calidad del producto envasado**. (Boletim Técnico), 2011.

JAEGER, S.R. Non-sensory factors in sensory science research. **Food Quality and Preference**, v.17, p. 132–144, 2006.

JAMES, S. The chill chain. **Meat Science**. v.43, p.203–216, 1996.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. (6th ed). Porto Alegre: Artmed, 2005.

JEDERMANN, R.; RUIZ-GARCIA, L.; LANG, W.; Spatial Temperature Profiling by Semi-passive RFID loggers for Perishable Food Transportation. **Computers and Electronicis in Agriculture**, p. 145-154, 2009.

KARADAG D.; PUHAKKA J.A. Effect of changing temperature on anaerobic hydrogen production and microbial community composition in an open-mixed culture bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 10954 - 10959, 2010.

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

KOUTSIMANIS, G.; GETTER C.; BEHE, B.; HARTE, J.; ALMENAR, E. Influences of packaging attributes on consumer purchase decisions for fresh produce. **Appetite**, **v.**59, p. 270–280, 2012.

KREYENSCHMIDT, J.; CHRISTIANSEN, H. A.; HUBNER, V.R.; PETERSEN, B. A novel photochromic time–temperature indicator to support cold chain management. **International Journal of Food Science and Technology**, v.45, p.208–215, 2010.

LABUZA, T. P. An Introduction to Active Packaging for Foods. **Food Technology**, v. 50, n. 1, p. 68-71, 1996.

LEHNINGER, M. **Principles of Biochemistry**. 20º ed. W.H. Freeman and Company, New York, 2008.

LIKAR, K.; JEVSNIK, M. Cold chain maintaining in food trade. **Food Control**, v. 17, n.2, p. 108 - 113, 2006.

LIMBO, S.; TORI, L.; SINELLI, N.; FRANZETTI, L.; CASIRAGHI, E. Evaluation and predictive modeling of shelf life of minced beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaging at different temperatures. **Meat Science**, v.84, p.129–136, 2010.

MAGNUSSON, M. K.; HURSTI, U. K. K. Consumer attitudes towards genetically modified foods. **Appetite**, v.39(1), p.9–24, 2002.

MAI, N.T.T. **Enhancing quality management of fresh fish supply chains through improved logistics**. Tese de Doutorado in Faculty of Food Science and Nutrition (School of Health Sciences), University of Iceland:Reykjavik, 2010.

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

MARRA, F.; ROMANO, V. A mathematical model to study the influence of wireless temperature sensor during assessment of canned food sterilization. **Journal of Food Engineering**, v.59(23), p.245-252, 2003.

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

MUA, J.P.; JACKSON, D.S. Fine structure of corn amylose and amylopectin fractions with various molecular weights. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.3840–3847, 1997.

NOVOZYMES. Information sheet. 2012.

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

PACQUIT, A.; FRISBY, J.; DIAMOND, D.; LAU, K.T.; FARRELL, A.; QUILTY, B.; DIAMOND, D. Development of a smart packaging for the monitoring of fish spoilage. **Food Chemistry**, v.102(2), p.466–470, 2007.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology.** 1º ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, p. 760, 2005.

PATSIAS, A.; BADEKA, A.V.; SAVVAIDIS, I. N.; KONTOMINAS, M. G. Combined effect of freeze chilling and MAP on quality parameters of raw chicken fillets. **Food Microbiology**, v.25, p.575–581, 2008.

PAVELKOVÁ, A. Intelligent packaging as device for monitoring of risk factors in food. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v.2(1), p.82-292, 2012.

PAVELKOVA, A. Time temperature indicators as devices intelligent packaging. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, v. LXI (1), p.245–251, 2013.

RAAB, V.; BRUCKNER, S.; BEIERLE, E.; KAMPMANN, Y.; PETERSEN, B.; KREYENSCHMIDT, J. Generic model for the prediction of remaining shelf life in support of cold chain management in pork and poultry supply chains. **Journal on Chain and Network Science**, v.8, p.59-73, 2008.

RAM, S. Consumer resistance to innovation: The Marketing problem and its solution. **The Journal of Consumer Marketing**, v.6(2), p.5–14, 1989.

REDIERS, H.; CLAES, M.; PEETERS, L.; WILLEMS, K. A. Evaluation of the cold chain of fresh-cut endive from farmer to plate. **Postharvest Biology and Technology**, p. 257-262, 2009.

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

RUSSELL, S.M. The effect of an acidic, copper sulfate-based commercial sanitizer on indicator, pathogenic, and spoilage bacteria associated with broiler chicken carcasses when applied at various intervention points during poultry processing. **Poultry Science**, v.87, p.1435–1440, 2008.

SAJEDI, R. H.; NADERI-MANESH, H.; KHAJEH, K.; AHMADVAND, R.; RANJBAR, B.; ASOODEH, A.; MORADIAN, F. A Ca-independent α-amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus sp*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 666-671, 2005.

SAJEDI, R.H.; NADERI-MANESH, H.; KHAJEH, K.; AHMADVAND, R.; RANJBAR, B.; ASOODEH, A.; MORADIAN, F. A Ca-independent α-amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp. KR-8104. **Enzyme Microbiology Technology**, v.36 (7), p.666-671, 2005.

SARIKAYA, E.; HIGASA, T.; ADACHI, M.; MKAMI, B. Comparison of Abilities of α- and β- amylases on Raw Starch Granules. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 7, p. 711-715, 2000.

SHANNON, J. C.; GARWOOD, D. L. Genetics and Physiology of Starch Development. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E. F. (Editores). **Starch: Chemistry and Technology**. Segunda Edição. London: Academic Press, 1984. cap. 3, p. 26-79.

SHETH, J. N.; MITTAL, B.; NEWMAN, I. B. **Comportamento do cliente: indo além do comportamento do consumidor**. São Paulo: Atlas, 2001.

SHIMONI, E.; ANDERSON E.M.; LABUZA T.P. Reliability of Time Temperature Indicators Under Temperature Abuse. **Journal of Food Science**, v.66, p.1337-1340, 2001.

SIEGRIST, M.; STAMPLI N.; KASTENHOLZ, H. Consumers' willingness to buy functional foods. The influence of carrier, benefit and trust. **Appetite**, v. 51, n. 3, p. 526-529, 2008.

SILVA, F.V.M.; GIBBS, P.A. Thermal pasteurization requirements for the inactivation of Salmonella in foods. **Food Research International**, v.45, p.695–699, 2012.

SLOAN, A. E. What consumers want-and don't want-on food and beverage labels. **Food Technology**, v. 57, n. 11, p.26-36, 2003.

SMOLANDER, M.; ALAKOMI, H. L.; RITVANEN, T.; VAINIONPAA, J.; AHVENAINEN, R. Monitoring of the quality of modified atmosphere packaged broiler chicken cuts stored in different temperature conditions. A. Time-temperature indicators as quality-indicating tools**. Food Control**, v.15, p. 217-229, 2004.

SOARES, N.F.F.; DA SILVA, W.A.; PIRES, A.C.S.; CAMILLOTO, G.P.; SILVA, P.S. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. **Revista Ceres**, v.56, n.4, p. 370-378, 2009.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas _-amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SWINKELS, J.J.M. Composition and properties of commercial native starches. **Starch**, v. 37, p.1–5, 1985.

TAOUKIS, P. S. **Modelling the use of time-temperature indicators in distribution and stock rotation**. In Food Process Modelling. Ed. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. p. 402-428, 2001.

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

TAOUKIS, P.S.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G.J. 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.; LABUZA, T.P. Applicability of time-temperature indicators as shelf life monitors of food products. **Journal of Food Science**, v.54, p.83-788, 1989.

TAOUKIS, P.S.; LABUZA, T.P. Time-temperature indicators (TTIs). In: Ahvenainen, R. **Novel food packaging techniques**. Cambridge: Woodhead, 2003.

TAPARELLI, J. R. **Modificação Química do Amido de Mandioca e Estudo de sua Aplicação em Revestimento de Couché**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Materiais. Campinas, São Paulo, 2005.

TSIRONI, T.; GOGOU, E.; VELLIOU, 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, 2009.

TSIRONI, T.; STAMATIOU, A.; GIANNOGLOU, M.; VELLIOU, E.; TAOUKIS, P.S. Predictive modelling and selection of Time Temperature Integrators for monitoring the shelf life of modified atmosphere packed gilthead seabream fillets. **Food Science and Technology**, v.44, p.1156-1163, 2011.

TUCKER, G.S. **Development and application of time-temperature integrators to thermal food processing**. Tese de Doutorado in University of Birmingham for the degree of Doctors in Philosophy in School of Chemical Engineering, 2008.

TUCKER, G.S.; LAMBOURNE, T.; ADAMS, J.B.; LACH, A. Application of a biochemical time-temperature integrator to estimate pasteurisation values in continuous food processes. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 3, 165-174, 2002.

UBABEF. União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual 2013/2014**. Available in: (http://www.abef.com.br/ubabef/publicacoes_ relatoriosanuais.php). Acesso em 10/07/2015.

USDA. United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service. Food Safety Information: Ham and Food Safety, 2012.

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

VENTER, K.; VAN DER MERWE, D.; BEER, H.; KEMPEN, E.; BOSMAN, M. Consumers' perceptions of food packaging: an exploratory investigation in Potchefstroom, South Africa. **International Journal of Consumer Studies**, v. 34, p. 1-9, 2010.

VITSAB. Disponível em :www.vitsab.com, acessado em 06/2015.

WADHERA, D.; CAPALDI-PHILLIPS, C. A review of visual cues associated with food on food acceptance and consumption. **Eating Behaviors**, v.15, p.132–143, 2014.

WAINWRIGHT, M. **Introducción a la Biotecnología de los Hongos**. Zaragoza: Acribia, p.228, 1995.

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, p.427–434, 2010.

WHITAKER J.R.; VORAGEN A.G.J.; WONG, D.W.J. **Handbook of Food Enzymology** (1th ed.). Marcel Dekker, Inc. New York, USA, 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, p.1100-1104, 2015.

WU, D.; WANG, Y.; CHEN, J.; YE, X.; WU, Q.; LIU, D.; DING, T. Preliminary study on time e temperature indicator (TTI) system based on urease. **Food Control**, v. 34, p.230-234, 2013.

ZHANG, Q.Q.; HAN, Y.Q.; CAO, J. X.; XU, X.L.; ZHOU, G. H.; ZHANG, W.Y. The spoilage of air-packaged broiler meat during storage at normal and fluctuating storage temperatures. **Poultry Science**, 91, 208–214, 2012.

ANEXO I – Artigo Publicado no *Journal of Food Science*, 80(6), p.M1271-M1276, 2015

Development of Aa New Time Temperature Indicator for Enzymatic Validation of Pasteurization of Meat Products

Ana Paula Dutra Resem Brizio and Carlos Prentice

Abstract: This paper presents the development of a new smart time-temperature indicator (TTI) of pasteurization whose operating principle is based on the complexation reaction between starch and iodine, and the subsequent action of an amylase on this complex causing its discoloration at a rate dependent on time and temperature of the medium. Laboratory simulations and tests in a manufacturing plant evaluated different enzyme concentrations in the TTI prototypes when exposed to pasteurization conditions. The results showed that the color response of the indicators was visually interpreted as adaptive to measurement using appropriate equipment, with satisfactory reliability in all conditions studied. The TTI containing 6.5% amylase was one whose best results were suited for use in validating the cooking of hams. When attached to the primary packaging of the product, this TTI indicated the pasteurization process inexpensively, easily, accurately, and nondestructively.

Keywords: cooked products, quality control, smart packaging, temperature

Practical Application: This work provides the development of a new smart indicator of pasteurization. The new small smart indicator glued to the primary product packaging visually indicated the pasteurization process. Thus, the use of this new TTI during pasteurization of meat products can mean a safer product for the client, and for the manufacturer, the possibility of identifying errors and consequently reduce costs of production.

Introduction

The thermal processing named pasteurization consists of one of the most widely used methods for preserving food (Silva and Gibbs 2012; Arias-Mendez and others 2014). For its technological and sanitary importance, companies are faced with the challenge of proving that their products have been properly pasteurized (Tucker and others 2002).

However, this validation process may be inefficient when conventional methods of temperature measurement are used (Marra and Romano 2003; Mehauden and others 2007). Thus, the use of an intelligent time-temperature indicator (TTI) could be a complementary alternative to traditional evaluation tools, assisting in the measurement of the temperature of each individual product, easily, reliably and non destructively.

According to Taoukis and Labuza (1989), TTIs are devices containing a thermally labile substance as the operating mechanism. They can be attached to the surface of a package and, thus, show the cumulative time-temperature history of a food. Although widespread in fresh food products (Nuin and others 2008; Tsironi and others 2011; Vaikousi and others 2009; Ellouze and Augustin 2010; Mai and others 2011; Brizio and Prentice 2014), TTIs for visual real time monitoring of industrial thermal processes are still limited.

In this context, this work presents the idea of a new smart indicator of pasteurization. The working principle of the TTI proposed is based on the complexation reaction between starch and iodine (dark blue), and subsequent degradation by an amylase, causing the fading of the blue color. This discoloration reaction is dependent on pasteurization time and temperature in which the prototype is exposed (Fig. 1).

The use of this new TTI in food labels during pasteurization of meat products can mean: to the client, a safer, more interactive food with a nominal shelf life ensured; to the manufacturer, the possibility of identifying inefficiencies during heat treatment, to reduce costs and errors, to improve the performance in obtaining of the product and thereby increase profits.

Thus, the elaboration, characterization and validation of a new smart enzymatic time temperature indicator to monitor the pasteurization of products accurately and in real-time is proposed.

Materials and Methods

Characterization of the enzyme

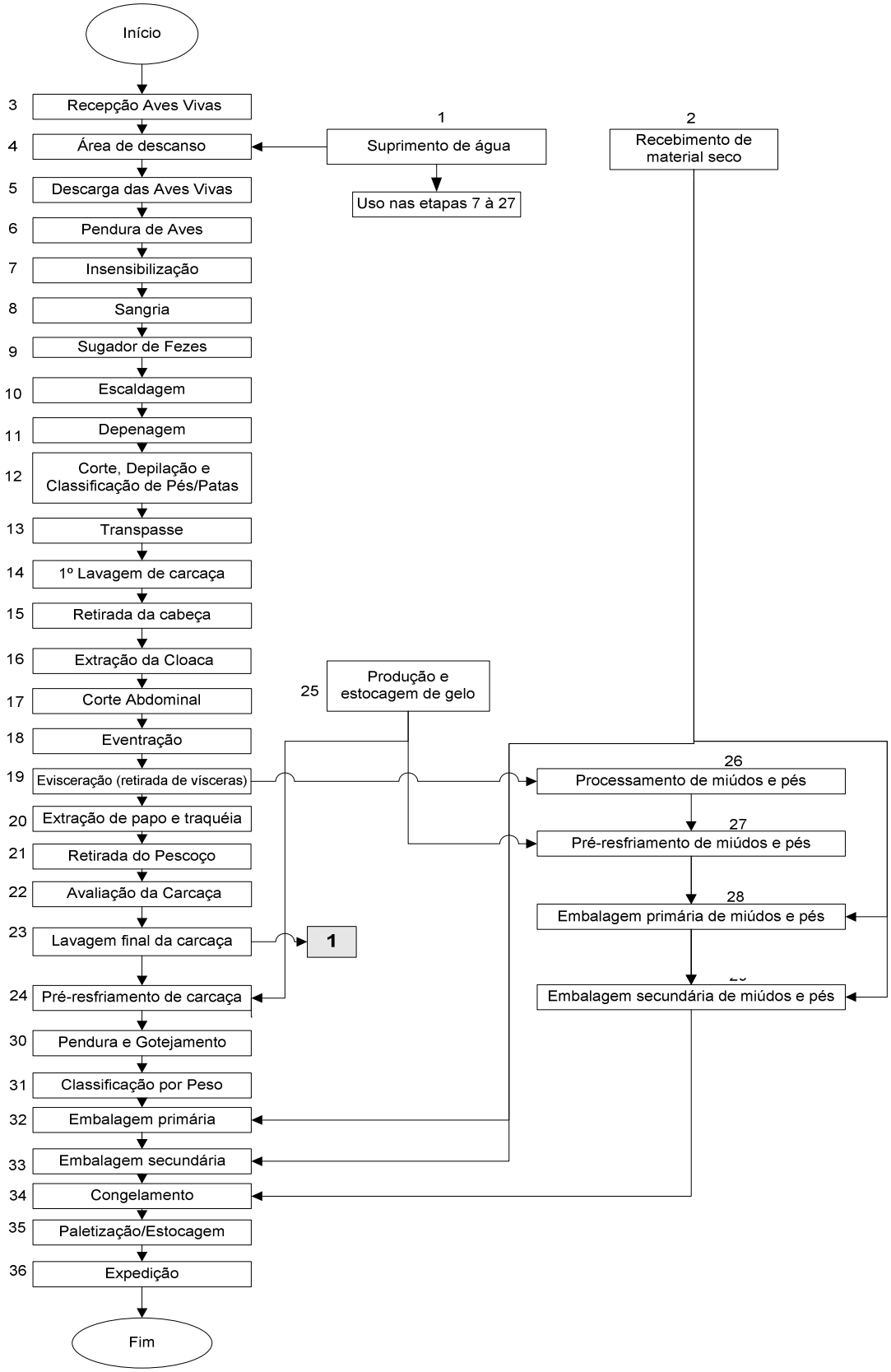
The α-amylase commercially known as BAN® 480L (Novozymes S/A, Bagsvaerd, Denmark) was used. The BAN® 480L contains a thermostable bacterial endoamylase produced by submersed fermentation of a selected strain of *Bacillus amyloliquefaciens*. The enzymatic activity is provided by endoamylase CAS (Chemical Abstracts Service) n°9000-90-2 hydrolyzing (1,4)-alpha-D-glucoside bonds in starchy polysaccharides. This activity was calculated according to the methodology recommended by Novozymes (2012), obtained the value of 60.31 kU, where one unit of enzyme activity (U) is the amount of enzyme required to release 1.0 mg of maltose from starch in 5 min of reaction at pH 5.0 at 50 °C.

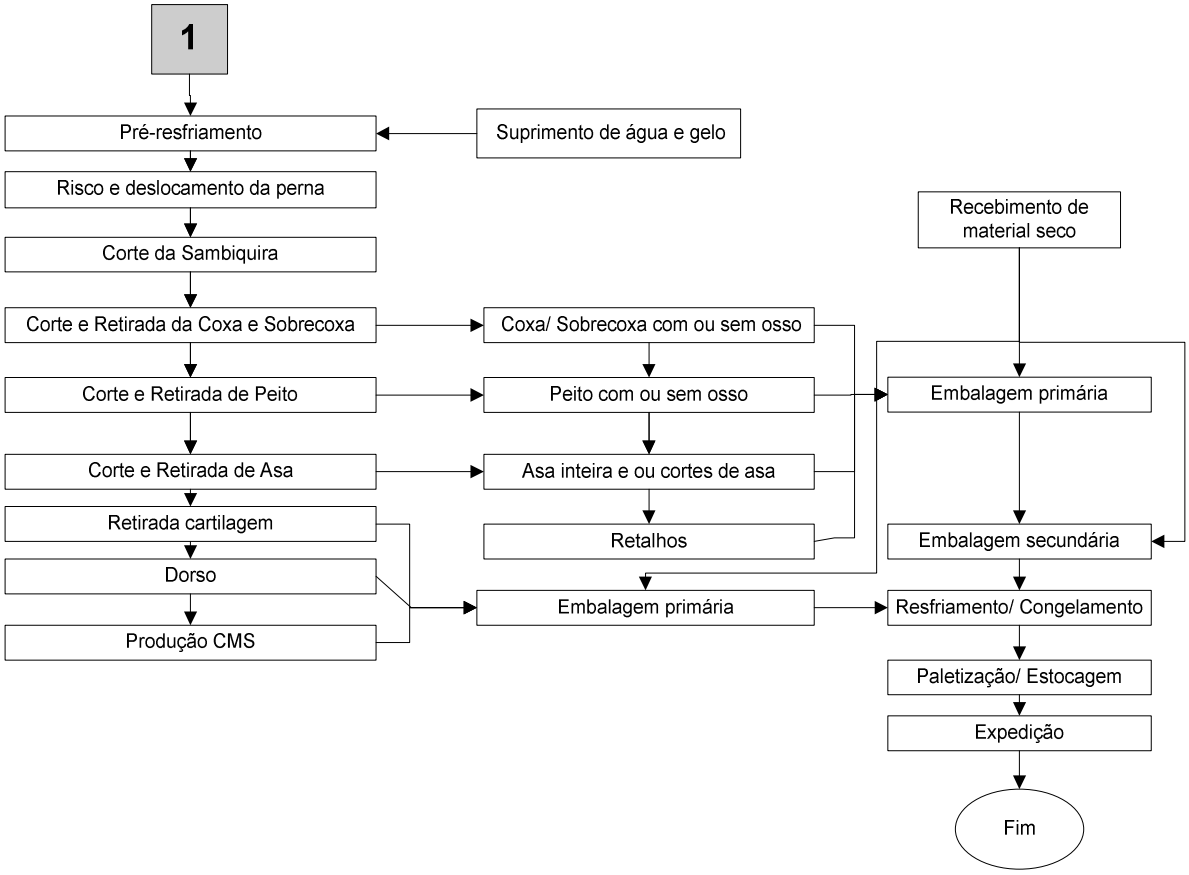
MS 20141847 Submitted 11/6/2015, Accepted 3/23/2015. *Authors are with Federal Univ. of Rio Grande-FURG, School of Chemistry and Food–EQA. Direct inquiries to author Brizio (E-mail: anabrizio@yahoo.com.br)*

Journal of Food Science A Publication of the Institute of Food Technologists

© 2015 Institute of Food Technologists®
doi: 10.1111/1750-3841.12889
Further reproduction without permission is prohibited

ANEXO II - Fluxograma de processo contemplando as etapas de obtenção dos produtos da planta frigorífica avaliada.




1
Pré-resfriamento
Suprimento de água e gelo
Risco e deslocamento da perna
Corte da Sambiquira
Recebimento de material seco
Corte e Retirada da Coxa e Sobrecoxa
Coxa/ Sobrecoxa com ou sem osso
Corte e Retirada de Peito
Peito com ou sem osso
Embalagem primária
Corte e Retirada de Asa
Asa inteira e ou cortes de asa
Retirada cartilagem
Retalhos
Embalagem secundária
Dorso
Embalagem primária
Resfriamento/ Congelamento
Produção CMS
Paletização/ Estocagem
Expedição
Fim

ANEXO III – Artigo Publicado no Innovative Food Science and Emerging Technologies, 30, p.208–217, 2015.

Innovative Food Science and Emerging Technologies 30 (2015) 208–217

Contents lists available at ScienceDirect

Innovative Food Science and Emerging Technologies

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ifset

Development of an intelligent enzyme indicator for dynamic monitoring of the shelf-life of food products

Ana Paula Dutra Resem Brizio *, Carlos Prentice

Federal University of Rio Grande — FURG, School of Chemistry and Food — EQA, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 12 February 2015
Received in revised form 30 March 2015
Accepted 1 April 2015
Available online 18 April 2015

Keywords:
Perishable foods
Cold chain
Smart packaging
Food safety

ABSTRACT

This work describes the development of a new smart time–temperature indicator, whose operating principle is based on the reaction between starch and iodine and the subsequent acting of an amylase on this complex, causing discoloration at a rate dependent on time and temperature of the medium. Laboratory simulations, manufacturing plant tests, and points of sale evaluated various enzyme concentrations in the TTI prototypes. The results showed that the color response of the indicators was visually interpreted as adaptive to measurement using colorimeter. Due to the possibility of defining the shelf-life of TTIs by varying enzyme concentrations, the indicators can be easily adapted to control the temperature conditions in the production chain of many perishable foods in a cheap, easy and accurate form.

Industrial relevance: Temperature control during the distribution and storage of perishable products is often flawed, with conditions other than those recommended by the manufacturer. The difficulty in knowing the temperature history to which a food has been exposed to makes it difficult to predict its true shelf-life. An innovative alternative to dynamically ensure the validity of food can be the use of a smart time–temperature indicator (TTI). However, the success of the industrial application of TTIs depends on the simplicity, cost and reliability during operation, characteristics that have not yet been jointly observed in the indicators available in the market. In this perspective, it is part of the development of this work, which aims to develop a new TTI that presents a favorable combination of efficiency, reliability and viability. Thus, the aim is to contribute to the commercial acceptance of the concepts of smart packaging and in the establishment of regulation standards of usage, providing benefits to the conservation of a wide variety of foods.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The increasing demand for quality food has increased consumer expectations, leading to a greater importance for maintaining quality between production and consumption (Brizio, 2014). In this context, food packaging has become more complex. Traditionally used to contain and passively protect the food, today the packaging plays the role of communication, marketing, convenience and more recently, quality indication, actively contributing to the sale of a product (Azeredo, 2012; Galić, Ščetar, & Kurek, 2011). Since storage temperature greatly affects the quality and safety of perishable food products (Brizio & Prentice, 2014; Kreyenschmidt, Christiansen, Hubner, & Petersen, 2010; Mai et al., 2011), new packaging systems, called time–temperature indicators (TTIs), are being proposed to act as "smart messengers" providing more information to consumers, and thus ensuring the quality of the product throughout its shelf-life (Pavelková, 2012).

The operating principle of a TTI is based on an irreversible change that can be mechanical, chemical, electrochemical, enzymatic or microbiological, normally expressed as a visible response (Mai et al., 2011). The rate of this change is dependent on time and temperature, thus the visible response gives an indication of cumulative storage conditions to which the label was exposed (Verdade, 2010). This response should correlate product deterioration with time and temperature of the supply chain (De Jong et al., 2005). Thus, the applicability of a TTI as a quality indicator requires the kinetic study of both products: food and smart sensor (Taoukis & Labuza, 2003).

Despite the great contribution potential, few TTI systems so far have been used in industrial (Brizio, 2014). The main reasons for the lack of current commercial TTI systems for food products are cost, reliability and applicability (Choi, Jung, Kim, & Lee, 2014; Verdade, 2010). More studies are needed to identify new compounds as TTIs indicators, as well as clarify mechanisms to determine a favorable combination of efficiency and reliability.

Our objective was to develop, characterize and validate a TTI whose operating principle is based on the complexation reaction between starch and iodine (dark blue), and the subsequent performance of an

* Corresponding author.
E-mail address: anabrizio@yahoo.com.br (A.P.D.R. Brizio).

http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2015.04.001
1466-8564/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.