UNIVERSIDADE REGIONAL DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
PRÓ-REITORIA DE ENSINO, PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
URI - CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CAROLINE FÁTIMA CASANOVA

DESENVOLVIMENTO DE UM INDICADOR COLORIMÉTRICO DE TEMPO-TEMPERATURA PARA EMBALAGEM INTELIGENTE

ERECHIM - RS
2019

CAROLINE FÁTIMA CASANOVA

DESENVOLVIMENTO DE UM INDICADOR COLORIMÉTRICO DE TEMPO-TEMPERATURA PARA EMBALAGEM INTELIGENTE

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da URI – Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

Orientadores: Dr. Rogério Luis Cansian
Drª. Geciane Toniazzo Backes

ERECHIM – RS
2019

DESENVOLVIMENTO DE UM INDICADOR COLORIMÉTRICO DE TEMPO-TEMPERATURA PARA EMBALAGEM INTELIGENTE

CAROLINE FÁTIMA CASANOVA

Tese de Doutorado apresentada como quesito parcial à obtenção do grau de Doutor, pelo Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim.

Erechim, 25 de março de 2019.

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Geciane Toniazzo Backes, D. Sc.
Orientadora (URI - Erechim)

_____

Prof. Rogério Luis Cansian, D. Sc.
Orientador (URI - Erechim)

_____

Helen Treichel, D.Sc.
(UFFS – Campus de Erechim)

_____

Adriane Pegoraro Brustolin, D.Sc.
(Aurora Alimentos)

_____

Rosicler Colet, D.Sc.
(URI - Erechim)

_____

Rogério Marcos Dallago, D.Sc.
(URI - Erechim)

C335d Casanova, Caroline Fátima
Desenvolvimento de um indicador colorimétrico de tempo – temperatura para embalagem inteligente / Caroline Fátima. - 2019.
80 f.

Tese (doutorado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2019.

"Orientação: Dr. Luis Cansian, Dra Geciane Toniazzo Backes"

1. Micro-organismos 2. Conservação - alimentos 3. Refrigeração 3. Frango I. Título

C.D.U.: 664

Catalogação na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

Aos meus pais, Roque e Carmen.

São exemplos de caráter e retidão que sempre me inspiraram no caminho do bem, dedico à vocês esta vitória, meu amor e minha eterna gratidão...

Ao meu marido Luiz, por estar sempre ao meu lado compartilhando angústias, alegrias e tristezas. Obrigada pela paciência, amor e carinho, a você todo meu amor.

Aos meus familiares que sempre estiveram presentes em minha vida. Obrigada por acreditarem em mim, pelos conselhos, e pelo apoio incondicional e todo seu amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar concluindo o curso de pós-graduação, por possibilitar mais esse avanço na minha formação profissional, e permitir que eu descubra e supere meus limites.

Aos meus orientadores Geciane Toniazzo Backes e Rogério Cansian, pela ajuda incondicional, pelos ensinamentos, pela paciência e dedicação no decorrer deste trabalho. Serei eternamente grata à vocês.

A AURORA ALIMENTOS, pela cooperação e incentivo à minha atualização profissional de forma concomitante ao meu trabalho.

Agradeço à minha família pelo amor, apoio e incentivo.

A todas as pessoas que colaboraram de alguma forma, na realização deste projeto, onde o auxílio foi de fundamental importância, em especial a Rosicler Colet que sem sua contribuição esse projeto não teria alcançado os devidos resultados.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

A cadeia de frio além de manter a qualidade do produto, prolonga o seu período de comercialização, mas se faz necessário a verificação do seu correto uso, pois abusos de temperatura permitem que ocorra a proliferação de micro-organismos por muitas vezes patogênicos, causando prejuízos na saúde do consumidor. Tendo em vista as possíveis variações de temperaturas de expositores de alimentos refrigerados, o objetivo desta pesquisa foi desenvolver um indicador enzimático de tempo-temperatura e correlacionar o crescimento bacteriano com a alteração de cor do sistema sob abuso de temperatura. O sistema enzimático foi desenvolvido avaliando-se variações de pH e cor na hidrólise de tributirina em diferentes concentrações de enzima lipase Cal-B, em presença de indicador colorimétrico de pH (azul de bromotimol, vermelho de metila e vermelho neutro). O crescimento bacteriano foi avaliado com *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus aureus* em filé de peito de frango, incubadas a 5, 20 e 25 °C por 12 horas. Após, foram realizados testes com diferentes concentrações de enzima até a obtenção da concentração de enzima ideal, a qual foi de 0,01 µL/L. Identificou-se as alterações visuais de cor das amostras quando expostas a diferentes condições de temperaturas, sendo possível correlacionar os valores obtidos da escala Cielab, para todos os parâmetros, principalmente ΔE* ao longo do tempo reacional. Para fins de aplicabilidade do sistema reacional, foi desenvolvido o sistema enzimático colorimétrico, o qual foi obtido mantendo os compostos em duas soluções separadas (tampão/enzima/água) + (substrato/indicador), sendo a conservação realizada, antes da mistura das soluções, tanto em temperatura controlada (5 ºC) como temperatura em ambiente (25 ºC). Correlacionando os resultados das análises microbiológicas com os resultados de alteração de cor do sensor é possível fazer uso do mesmo como um instrumento que visa a garantia da segurança alimentar.

Palavras-chave: Refrigeração. Micro-organismos. Abuso de temperatura. Conservação de alimentos. Frango.

ABSTRACT

The cold chain, besides maintaining the quality of the product, prolongs its period of commercialization, but it is necessary to verify its correct use, because abuses of temperature allow the occurrence of the proliferation of microorganisms that are often pathogenic, causing damages consumer health. The objective of this research was to develop an enzymatic indicator of temperature time and to correlate bacterial growth with the color change of the system under temperature abuse. The enzymatic system was developed by evaluating pH and color variations in the hydrolysis of tributyrin in different concentrations of lipase enzyme Cal-B, in the presence of a colorimetric pH indicator (bromothymol blue, methyl red and neutral red). Bacterial growth was evaluated with *Salmonella choleraesuis* and *Staphylococcus aureus* in chicken breast, incubated at 5, 20 and 25 °C for 12 hours. After, were performing tests with different concentrations of enzyme until obtaining the concentration of ideal enzyme, which was 0.01 μL/L. It was identified the visual changes of color of the samples when exposed to different temperature conditions, being possible to correlate the values obtained of the Cielab scale, for all parameters, mainly ΔE * over the reaction time. For the purpose of applicability of the reaction system, the colorimetric enzymatic system was developed, which was obtained by keeping the compounds in two separate solutions (buffer / enzyme / water) + (substrate / indicator), both at controlled temperature (5 ºC) and room temperature (25 ºC). Correlating the results of the microbiological analyzes with the results of alteration of color of the sensor it is possible to make use of it as an instrument aimed at guaranteeing food safety.

Keywords: Refrigeration. Microorganisms. Temperature Abuse. Food preservation. Chicken.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13
2. OBJETIVOS 15
2.1 Objetivo Geral 15
2.2 Objetivos Específicos 15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 16
3.1. Abuso de Temperatura 16
3.2. Indicadores de Tempo e Temperatura 19
3.2.1. Método Enzimático 22
3.3. Embalagem com Características Inteligentes 25
3.3.1. Colorimetria 27
3.4. Indicador de Tempo e Temperatura nas Embalagens 32
4. MATERIAIS E MÉTODOS 37
4.1. Desenvolvimento do Indicador Enzimático Colorimétrico de Tempo Temperatura 37
4.2 Avaliação do crescimento microbiológico 41
4.3 Análise Estatística 42
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES 43
5.1. Desenvolvimento do Indicador Enzimático Colorimétrico de Tempo Temperatura 43
5.2 Avaliação Microbiológica de Abuso de Temperatura em Produtos 62
5.2.1 Comportamento de *Salmonella choleraesuis* e *S. aureus* em filé de peito de frango 62
6. CONCLUSÃO 67
7. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS 68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – pH e aspecto visual das reações com diferentes concentrações de enzima acondicionadas 5 e 25ºC e diferentes tempos de reação. 44

Tabela 2 – pH e aspecto visual da reação com 0,01 µL/L de enzima acondicionadas em geladeira (5ºC), com banho e sem banho de gelo.....46

Tabela 3 – Parâmetros de cor L*, a*, b*, ΔE, valores de pH e aspecto visual dos indicadores acondicionados na temperatura de 5 ºC.....48

Tabela 4 – Parâmetros de cor L*, a*, b*, ΔE, valores de pH e aspecto visual do sistema reacional acondicionadas na temperatura de 10 ºC. 49

Tabela 5 – Parâmetros de cor L*, a*, b*, ΔE, valores de pH e aspecto visual da reação acondicionadas na temperatura de 15 ºC. 50

Tabela 6 – Parâmetros de cor L*, a*, b*, ΔE, valores de pH e aspecto visual da reação acondicionadas na temperatura de 20 ºC. 51

Tabela 7 – Parâmetros de cor L*, a*, b*, ΔE, valores de pH e aspecto visual da reação acondicionadas na temperatura de 25 ºC. 52

Tabela 8 – Valores de pH e aspecto visual do sistema reacional exposto a abusos sequenciais de temperatura (20 ºC) por 5 minutos e posterior devolução à refrigeração por 2 horas. 54

Tabela 9 – Valores de pH e aspecto visual do sistema reacional exposto a abusos sequenciais de temperatura (20 ºC) por 1 minuto e posterior devolução à refrigeração por 2 horas.....55

Tabela 10 – Parâmetros de cor L*, a*, b*, ΔE, pH e aspecto visual do Sistema I (tampão/enzima/água) + (substrato/indicador) a 5 ºC antes da mistura e 25 ºC após mistura.....57

Tabela 11 – Parâmetros de cor L*, a*, b*, ΔE, pH e aspecto visual do Sistema II (tampão/enzima/indicador/água) + (substrato) a 5 ºC antes da mistura e 25 ºC após mistura.....58

Tabela 12 – Parâmetros de cor L*, a*, b*, ΔE, pH e aspecto visual do Sistema III (tampão/enzima/água) + (substrato/indicador) a 25 ºC antes da mistura e 25 ºC após mistura...59

Tabela 13 – Parâmetros de cor L*, a*, b*, ΔE, pH e aspecto visual do Sistema IV (tampão/enzima/indicador/água) + (substrato) a 25 ºC antes da mistura e 25 ºC após mistura...60

Tabela 14 – Correlação de Pearson entre o crescimento de *S. aureus* e *S. choleraesuis* em peito de frango refrigerado e o ΔE e pH do sistema colorimétrico reacional, submetidos a 20 e 25 ºC. 66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração do funcionamento de ITT de histórico parcial e de histórico total. 20
Figura 2 - Diagrama de cromaticidade. 29
Figura 3 - Espaço CIELAB. 29
Figura 4 - Representação esquemática da escala Cielab. 30
Figura 5- Ciclo de reação do sistema fotocrômico da etiqueta *OnVu*®. A exposição à luz ultravioleta induz a coloração, enquanto o calor promove a reação inversa. 32
Figura 6 - Modelo da etiqueta inteligente *OnVu*®. 33
Figura 7 - Princípio de funcionamento do ITT elaborado pela *VITSAB.* 33
Figura 8 - (A) Modelo do rótulo *Fresh-Check*®; (B) Escala de cores apresentada pelo indicador *Fresh-Check*®eO® TTI da CRYOLOG (www.cryolog.com). 34
Figura 9- Imagem da etiqueta inteligente *eO*®. 34
Figura 10 – Representação esquemática referente ao delineamento experimental. 37
Figura 11 - Variação da coloração do indicador enzimático de tempo e temperatura em relação à redução de pH. 43
Figura 12 - Relação Tempo e Temperatura para alteração da cor do sistema reacional. 53
Figura 13 - Cinética de crescimento de *S. choleraesuis* em 5, 20 e 25 °C em filé de peito. 63
Figura 14 - Cinética de crescimento d *S. aureus* em 5, 20 e 25 °C em filé de peito. 63
Figura 15 - Cinética de crescimento de contagem total de bactérias em 5 ºC em filé de peito de frango. 65

1. INTRODUÇÃO

O consumidor está cada vez mais exigente, e ter segurança alimentar não é mais questão de luxo e sim uma necessidade básica. As datas de validades impressas nos produtos devem garantir que o mesmo esteja em condições adequadas de consumo até o limite apresentado, porém essa garantia por vezes não é totalmente confiável, devido às inúmeras variáveis as quais os produtos estão expostos até chegarem ao consumidor final, ficando assim o consumidor à mercê das informações existentes nos rótulos dos produtos.

Durante o armazenamento de alimentos, várias mudanças estão ocorrendo, as quais afetam negativamente sua qualidade, resultando em rejeição sensorial dos consumidores. As alterações dos produtos refrigerados são causadas principalmente por crescimento microbiano. A temperatura constitui o parâmetro ambiental mais crítico, que influencia nessas alterações (MAN, 2016).

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).

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). A temperatura é um fator crítico na produção de alimentos e nos sistemas de distribuição que devem ser rigorosamente controlados. Há alguns estágios fundamentais envolvidos na cadeia do frio: armazenamento em câmaras refrigeradas na indústria, transporte, centros de distribuição e pontos de vendas. (MARTINO, 2018).

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). A cadeia de frio apresenta alguns elos mais fracos, como por exemplo o tempo de carregamento e descarga na etapa de transporte, que ocorre entre as diferentes fases: na saída da indústria ou durante o armazenamento, nos centros de distribuição e nos pontos de venda. (MARTINO, 2018). 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).

Neste contexto, enquadra-se a pesquisa deste trabalho, a qual visa desenvolver um novo sistema enzimático colorimétrico de tempo e temperatura, avaliando a exposição de produtos cárneos refrigerados submetidos ao abuso de temperatura, tendo em vista a segurança alimentar em função da negligência de alguns estabelecimentos quanto a falta de controle das temperaturas de expositores de alimentos refrigerados.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um sistema enzimático colorimétrico que indique abusos de temperaturas sofridas por produtos cárneos resfriados durante sua distribuição e armazenamento.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Desenvolver um indicador enzimático colorimétrico de tempo temperatura;
- ✓ Avaliar a estabilidade do indicador enzimático colorimétrico de tempo temperatura, desenvolvido, visando superar o tempo de *shelf life* do produto;
- ✓ Avaliar a cinética de cor e pH do indicador enzimático colorimétrico em diferentes temperaturas;
- ✓ Identificar alterações microbianas em produtos cárneos, submetidas ao abuso de diferentes temperaturas;
- ✓ Correlacionar as alterações microbianas de produtos submetidos ao abuso térmico com a cinética de cor do sensor desenvolvido.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Abuso de Temperatura

O principal requisito para garantir a qualidade de um alimento é a sua vida de prateleira, comumente conhecida por validade, que é o período temporal no qual um alimento se mantém seguro para o consumidor, mantendo suas características sensoriais, físicas, químicas e funcionais desejadas, e cumprindo com as características nutricionais evidenciadas na rotulagem, sob as condições de armazenagem recomendadas (DIAS, 2007).

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* (ANVISA, 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".

A vida útil de alimentos embalados é influenciada pelas propriedades dos alimentos (incluindo a atividade de água, o pH, enzimas e micro-organismos e os requerimentos de oxigênio, luz, dióxido de carbono e umidade ou sensibilidade a esses elementos) e pelas propriedades de barreira da embalagem (FELLOWS, 2006; LATOU et al., 2014).

Os micro-organismos mais importantes na alteração dos produtos proteicos são aqueles que crescem em temperaturas nas faixas de mesófilas (22 a 45 ºC) e psicrófilas (-15 a 22 ºC), incluindo o grupo dos psicrotróficos cuja faixa de crescimento é mais ampla, aumentando o seu poder de deterioração (-5 a 45 ºC) em carne de frango, pescado, ovos e outros. Além da produção enzimática que propicia a deterioração, os micro-organismos produzem uma série de substâncias decorrentes da multiplicação, como os pigmentos responsáveis por algumas alterações de cor, ácidos, gases, substâncias alcalinizantes e substâncias fétidas (JÚNIOR & PANETTA, 1992; FRANCO & LANDGRAF, 2008).

O princípio da utilização de baixas temperaturas retarda a atividade microbiana, bem como as reações químicas e enzimáticas que causam alterações. A velocidade de tais alterações é diretamente proporcional à temperatura da carne (a relação não é totalmente linear e varia nas diferentes reações). Na refrigeração de carnes, empregam-se temperaturas de -1 a 5 ºC (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

A cadeia do frio relaciona-se com a qualidade do produto final sob dois diferentes aspectos, porém complementares. O primeiro é a contaminação microbiológica dos alimentos e o risco associado à saúde humana. O segundo está relacionado com as características organolépticas e sensoriais do produto final (BORRÉ & AGITO, 2005).

O tempo de vida útil é um atributo importante de todos os alimentos. Pode ser definido como o tempo que se passa desde a produção, embalagem até o ponto em que o alimento se torna inaceitável para o consumo (FORSYTHE, 2002; SINGH & SINGH, 2005).

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).

A microflora da deterioração de carne é muito complexa, depende de fatores como a velocidade de resfriamento e a temperatura. Alguns critérios objetivos para uma boa aceitação incluem itens como: a aparência, capacidade de retenção de água, parâmetros sensoriais, como cor, sabor e textura (ZHAO et al., 1994). O aparecimento de limo e odores inviabilizam o consumo para o ser humano (DJENANE et al., 2005; KOUTSOUMANIS et al., 2006; ERCOLINI et al., 2006, IRKIN et al., 2011). Enquanto uma apropriada embalagem pode facilmente controlar outros fatores, como a composição em gases e a umidade relativa, a temperatura dos alimentos depende das condições durante a distribuição e o armazenamento. Um aspecto importante da distribuição e consumo da carne de frango fresca é o acompanhamento eficaz das condições de tempo e temperatura, que afetam tanto a segurança alimentar bem como a qualidade global da carne. É geralmente reconhecido pelas indústrias, varejistas, autoridades em alimentos e mesmo os consumidores, que várias fases da cadeia real de frio, tais como pontos de transferência ou áreas de armazenagem, são o elo mais fraco da gestão dos alimentos perecíveis refrigerados (SHEWAN, 1961; REAY& SHEWAN, 1949; KOUTSOUMANIS, 2001).

A dificuldade em controlar e conhecer o histórico da temperatura do alimento durante as fases de produção, armazenamento e transporte torna verdadeiramente difícil de prever a data de validade. Uma previsão não rigorosa do prazo de validade, baseada em suposições errôneas do histórico de temperatura, pode resultar em produtos de qualidade inaceitável antes

do fim da data de validade indicada, principalmente em casos em que ocorre flutuações de temperatura. Por outro lado, uma estimativa conservadora pode levar ao desperdício de produtos de boa qualidade (TAOUKIS, 2001; TAOUKIS, 2008).

Dados de investigação industriais mostram que no transporte, distribuição, manipulação e armazenamento de alimentos refrigerados e congelados e de outros produtos perecíveis frequentemente há um desvio das condições de temperatura recomendadas. Segundo as Boas Práticas de Fabricação e de Higiene a temperatura é o principal parâmetro determinante no pós-processamento para a data de validade, sendo o fator mais importante que afeta a qualidade e a segurança dos alimentos durante a distribuição e o armazenamento (TAOUKIS, 2001; TAOUKIS, 2008).

Durante o processo de logística (por exemplo, carga, descarga, o transporte, armazenamento e retenção), bem como durante o processo após a chegada do produto ao consumidor, armazenamento doméstico, o produto é muitas vezes sujeito a flutuações de temperatura e/ou abuso (BRECHTet al., 2013; LAGUERRE, DERENS & PALAGOS, 2002; BRECHT, 2013).

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).

Os problemas relacionados a não garantia da qualidade da cadeia de frio, poderiam ser minimizados de uma maneira não tão complexa, sendo concebidos para monitorizar a evolução da temperatura do produto e, com base nisso, estimar o período de vida útil remanescente, a solução está baseada em indicadores de tempo e temperatura, os quais oferecem uma solução potencial. Um sistema baseado em indicador de tempo e temperatura poderia conduzir a um controle efetivo da qualidade na cadeia de frio, à otimização da rotação de estoque e à redução de desperdícios, e ainda fornecer informações sobre o período de vida útil restante das unidades do produto (TAOUKIS, 2001; TAOUKIS, 2008).

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, e que refletem o histórico de tempo e temperatura do produto alimentar ao qual estão anexados (GIANNAKOUROU et al., 2005; TAOUKIS & LABUZA, 1989).

3.2. Indicadores de Tempo e Temperatura

Um indicador pode ser definido como um composto capaz de detectar a presença ou ausência de uma substância ou o grau de reação entre dois ou mais componentes através, especialmente, de uma mudança colorimétrica. Os indicadores, diferentemente dos sensores não possuem componentes do receptor e do transdutor e transmitem informações diretamente através da alteração visual da cor (BRAGA & PERES, 2010; KERRY, O'GRADY & HOGAN, 2006). Indicadores de tempo e temperatura são instrumentos simples, dispositivos baratos e pequenos que podem mostrar uma mudança, facilmente mensurável, dependente do tempo e temperatura e que reflete a história de temperatura total ou parcial de um produto alimentar, a partir do local de fabricação até o consumidor (TAOUKIS & LABUZA, 1989).

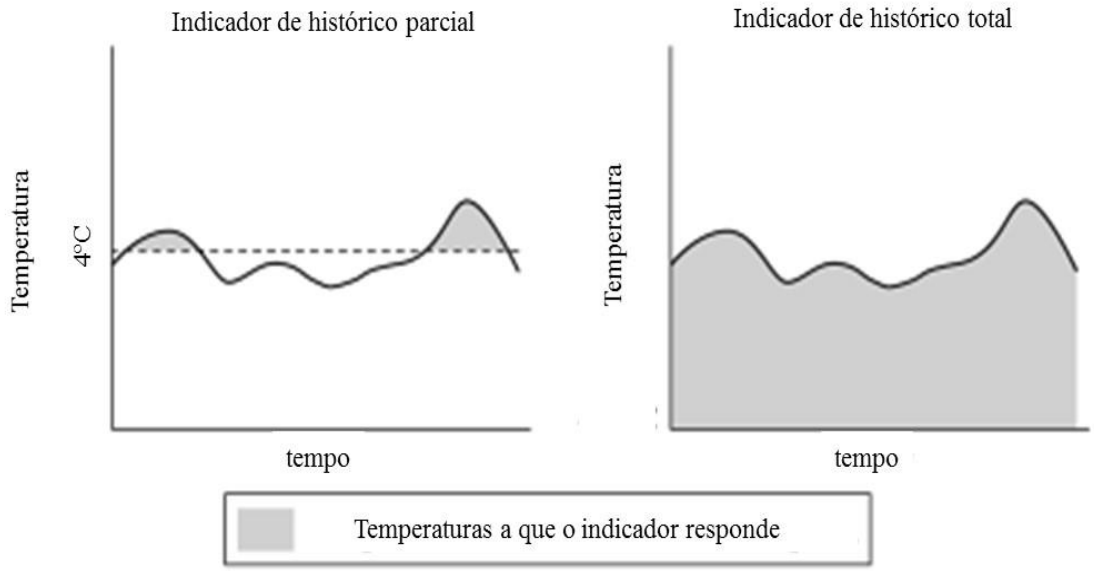
O princípio de funcionamento do indicador tempo e temperatura baseia-se numa mudança irreversível, sob a forma de uma deformação mecânica, um desenvolvimento de uma cor ou um movimento de cor. A taxa de mudança é dependente da temperatura, aumentando mais em temperaturas mais elevadas, tal como acontece com a maioria das reações físico-químicas, nomeadamente as reações responsáveis pela deterioração da qualidade de um produto alimentar (TAOUKIS, 2001; TAOUKIS, 2003; VAIKOUSI, 2008; ELLOUZE, 2010).

Os indicadores de tempo 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). Indicadores visuais podem mudar de cor dependendo das características físico-químicas do meio no qual estão contidos, em função de diversos fatores, tais como pH, potencial elétrico e adsorção em sólidos. Podem

ser classificados de acordo com o mecanismo de mudança de cor ou os tipos de situação nos quais são aplicados (ROSS, 1989).

Integradores ou indicadores de tempo e temperatura (ITT) dão uma resposta contínua, dependente da temperatura ao longo da história do produto. Eles integram, numa única medição, o histórico completo de tempo e temperatura e podem ser usados para indicar uma temperatura "média" durante a distribuição e, eventualmente, serem correlacionados com as reações de perda de qualidade dependentes da temperatura que ocorrem nos alimentos. Como foi referido, os indicadores de tempo e temperatura podem ser classificados tanto como indicadores de histórico parcial ou total, dependendo do seu mecanismo de resposta. Segundo esta classificação entende-se como indicadores de histórico parcial aqueles que não respondem a menos que um limite de temperatura seja excedido e indicam que um produto foi exposto a uma temperatura suficiente para causar uma mudança na qualidade ou na segurança do produto. Já os indicadores de histórico total ou completo dão uma resposta contínua da temperatura ao longo da história do produto e constituem o principal foco de interesse para a investigação e exploração comercial (KERRY, 2006). A Figura 1 ilustra o princípio de funcionamento dos ITT supracitados.

Figura 1 - 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.

Um pré-requisito para a aplicação desta abordagem é o estudo sistemático e a modelação cinética da dependência da temperatura do prazo de validade. Baseado em modelos confiáveis da data de validade do produto alimentar e na cinética de resposta do indicador de tempo e temperatura, o efeito da temperatura pode ser monitorado, registrado e traduzido, desde a produção até à mesa do consumidor (TAOUKIS, 2001; TAOUKIS, 2008). O conceito de indicadores de tempo e temperatura mostra ser bem aceito pelos consumidores, independentemente dos seus custos extras (LAHTEENMAKI & ARVOLA, 2003; SHERLOCK & LABUZA, 1992). Embora exista uma pesquisa ativa nesta área, as aplicações comerciais de sistemas inteligentes têm sido principalmente limitadas ao uso de indicadores visuais de tempo e temperatura. O custo alto de um rótulo indicador, restrições legislativas e até mesmo a aceitação de varejistas e proprietários de marcas podem ser motivos para essa limitação. A preocupação dos empresários pode ser a de que os indicadores apontem possíveis falhas ocorridas em alguma etapa da cadeia de produção do alimento (ARENAS, 2012).

O método de classificação dos indicadores de tempo e temperatura, por vezes usado, é baseado no princípio de funcionamento dos indicadores. Assim, eles podem ser classificados

como mecânicos, químicos, enzimáticos, microbiológicos, polímeros, eletroquímicos, baseados na difusão, etc. (TAOUKIS, 2001; TAOUKIS, 2003; TAOUKIS, 1991).

3.2.1. Método Enzimático

Diversos mecanismos de funcionamento de ITT vêm sendo estudados por pesquisadores com intuito de identificar combinações mais adequadas entre alimento e indicador. Dentre eles, pode-se 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.

O indicador enzimático é baseado em uma mudança de cor causada por um decréscimo do pH resultante de uma reação de hidrólise enzimática de um substrato lipídico (BLIX et al., 1997). Diferentes combinações de enzima-substrato e concentrações podem ser utilizadas, originando uma variedade muito grande na resposta e na dependência térmica. Os substratos mais comuns encontrados na literatura são: glicerina tricapronata (tricaproina), tripelargonina, bis-3,5,5-trimetil hexalipato (THA), misturas de ésteres de álcoois polivalentes e ácidos orgânicos.

O indicador é ativado pelo rompimento da barreira que separa os dois compartimentos, onde é necessário exercer uma força mecânica manual, ou utilizando um dispositivo especial, a fim de misturar a enzima e o substrato para dar início à reação de hidrólise do triglicerídeo. A hidrólise do substrato (tricaproína) causa a liberação de ácidos graxos (ácido capróico), que no meio aquoso, ocasiona a queda do pH, traduzido em uma mudança de cor devido a presença de um indicador. Cores como verde, amarelo, laranja e vermelho são impressas ao redor do compartimento de reação a fim de permitir a medida da mudança de cor comparativamente. Essa mudança contínua de cor também pode ser medida instrumentalmente por um colorímetro portátil (LABUZA, 1989).

Este tipo de indicador tempo-temperatura tem uma vida de prateleira de 1,5 anos antes de sua ativação, se mantido a 4 ºC, devido à grande variedade de substrato e enzimas que podem ser empregadas na reação, tem-se como resultado que as energias de ativação podem também variar amplamente. Ao misturar as soluções, a reação enzimática se inicia a uma taxa condizente com sua temperatura. A medida que há um incremento na temperatura, esse reflete em um aumento na taxa de reação e em uma maior quantidade de produto formado. Nesse caso, o ácido graxo, que se traduz por uma alteração da cor do meio em função da alteração do pH da solução. A cor do meio é dependente do pH, essa se altera no decorrer da reação, conforme ocorre o

aumento da concentração de ácido graxo, até o equilíbrio (cor laranja). A cor do sistema está em função do tipo de indicador de pH utilizado. Desse modo as etiquetas de indicadores tempo e temperatura apresentam uma ampla variedade. São moduladas para monitorar diferentes tipos de alimentos, como carnes moídas, hambúrgueres, leite, saladas preparadas entre outros (VITASAB, 2006).

O uso de sistemas com indicadores de tempo e temperatura tem sido estudados ao longo dos anos. Neste sentido, foi desenvolvido por Kim et al. (2012), um sistema com um indicador tempo e temperatura enzimático, baseado na reação entre uma lipase de *Burkholderia cepacia* e um substrato tricaprilina. A reação provoca uma alteração do pH, o qual possui dependência com a temperatura e com a taxa de resposta, o indicador foi modelado usando a equação de Arrhenius. A resposta do indicador tempo e temperatura foi validada em condições de armazenamento dinâmico com experimentos de temperatura variável independente, sendo que foi obtido um bom acordo entre os valores previstos e valores medidos.

Yan e Huawei et al. (2008) desenvolveram indicadores de tempo e temperatura os quais foram caracterizados utilizando um novo tipo de amilase, esses sistemas são eficazes na fiscalização da cadeia de frio durante todo o processamento e distribuição de alimentos. Nesse sentido, um novo tipo de amilase baseado na reação entre o amido de amilose foi estudado. Quatro tipos de amilases foram estudadas em quatro concentrações diferentes de substrato. Os resultados mostram que este novo tipo de indicador tempo e temperatura com amilase poderia ser aplicado para mostrar o histórico de tempo-temperatura dos alimentos, e para indicar a qualidade do alimento, o que está associado com a exposição em curso do tempo-temperatura.

Ellouze & Augustin (2010) estudaram à aplicabilidade dos indicadores de tempo e temperatura, os quais podem também servir como garantia de qualidade e segurança alimentar dos produtos cárenos. Foram monitorados e modelados o comportamento da *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* objetivando avaliar um indicador de tempo e temperatura biológico que garanta a qualidade e segurança para carne moída embalada sob atmosfera modificada e fatias cozidas de frango embaladas sob atmosfera modificada. Dois protótipos diferentes do indicador de tempo e temperatura foram definidos e fabricados de acordo com a vida de prateleira dos produtos estudados. Os modelos de avaliação da exposição foram criados e usados sob vários perfis de armazenamento realista para avaliar as distribuições da concentração na alimentação das populações de micróbios patogênicos obtidos no final da vida de prateleira do produto ou no ponto final do indicador de tempo e temperatura. Os resultados mostraram que, em caso de más condições de armazenamento, os indicadores de

tempo e temperaturas podem reduzir a exposição dos consumidores aos alimentos alterados ou perigosos.

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 a 45 °C) e sua cinética foi calculada. No entanto, em temperaturas inferiores a 20 ºC 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 uma 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 20 ºC. 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.

Tsironi et al. (2016) desenvolveram um estudo tendo por objetivo avaliar e validar um sistema de gerenciamento da cadeia de refrigeração à base de indicadores de tempo e temperatura (TTI), para monitorar a vida de prateleira de frutos do mar congelados na cadeia de frio real de produção até o momento do consumo. Um estudo piloto foi conduzido com fatias de *blueshark* congeladas e lula com TTI ativado por enzimas e UV, adaptados para monitorar a vida útil da produtos selecionados na cadeia de frio. O nível de qualidade e o prazo de validade restante em tempos predeterminados foram estimados com base na resposta do TTI e os valores

foram comparados com os valores medidos os índices de qualidade selecionados. Os resultados confirmam a aplicabilidade do TTI como indicadores efetivos de qualidade do marisco durante a sua vida comercial.

Tsironi et al. (2017), estudaram o desenvolvimento de etiquetas inteligentes de indicadores de tempo-temperaturas adequadas para corresponder a requisitos de monitoramento específico: O caso do crescimento de *Vibrio spp.* durante o transporte de ostras, este estudo aplicou modelos preditivos para o crescimento de *Vibrio parahaemolyticus* (VP) e *Vibrio vulnificus* (VV) em ostras e utilizou a informação para projetar rótulos inteligentes de indicadores tempo-temperaturas enzimáticos com cinética de resposta adequada para indicar o crescimento potencial de *Vibrio spp.* durante o transporte de ostras da colheita, armazenamento, distribuição e venda. Os resultados do estudo indicaram que os indicadores de tempo-temperaturas desenvolvidos neste estudo podem ser uma ferramenta eficaz e econômica para validar procedimentos aprimorados de manuseio e resfriamento e para monitoramento do transporte de ostras.

O pré-requisito de um método de controle, usando um indicador de tempo-temperatura como monitor da qualidade de um alimento, é conhecer o comportamento da perda da qualidade do sistema alimentício durante a vida de prateleira, e expressado quantitativamente por modelos cinéticos confiáveis (TAOUKIS, 1997).

Os indicadores de tempo e temperatura podem ser classificados como um sistema de embalagem inteligente, ou seja, um sistema que controla o estado dos alimentos embalados de maneira a obter informações, de forma indireta, sobre a qualidade desses alimentos durante o transporte e o armazenamento (TAOUKIS & LABUZA 2003; KERRY et al., 2006). Estes dispositivos inteligentes podem ser inseridos juntos aos materiais na fase de produção das embalagens ou fixados no interior ou exterior mesmo após sua produção (YOSHIDA, 2014).

3.3. Embalagem com Características Inteligentes

As embalagens desempenham papel fundamental na indústria de alimentos devido às suas várias e importantes funções. A proteção dos alimentos embalados é a função primária de toda embalagem, e a função secundária é a de facilitar a distribuição do produto até o consumidor (ARENAS, 2012).

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; GALIC et al., 2011).

As embalagens adquiriram novas funções devido a maior preocupação do mercado consumidor com a qualidade e segurança dos produtos alimentícios. Nesse contexto, surgiram as embalagens inteligentes (SOUZA et al., 2010) que oferecem benefícios em relação às embalagens tradicionais, pois além de proteger, informam para o consumidor ou produtor uma característica específica do alimento embalado (ARENAS, 2012; DAINELLI, 2008; VEIGA-SANTOS; DITCHFIELD & TADINI, 2011), indicando para o consumidor a qualidade do produto (PAVELKOVÁ, 2013).

As embalagens inteligentes podem ser definidas como um sistema que monitora a condição do alimento, fornecendo informações sobre a qualidade do produto embalado durante o transporte e estocagem (KRUIJF et al., 2002). Contém um indicador ou sensor interno ou externo, que expõe a qualidade do produto. Essas embalagens possuem mais propriedades do que somente proteção. Elas podem interagir com o produto e/ou responder a mudanças do ambiente que o afetam (HONG & PARK, 2000 apud ROONEY, 1995). As embalagens inteligentes aferem um componente e sinalizam o resultado desta aferição (SARANTÓPOULOS, & FERNANDES, 2001).

A dificuldade em conhecer o histórico real da temperatura dos alimentos faz com que seja difícil prever a sua vida de prateleira (SHIMONI et al., 2001). Assim, a tecnologia utilizada para garantir a validade de produtos alimentares, é a utilização de embalagens contendo indicadores inteligentes tempo-temperatura (MAI et al., 2011). Tais indicadores refletem, de forma visual, as condições de temperatura de armazenamento durante o período de conservação dos produtos alimentares (GIANNAKOUROU et al., 2005; KERRY et al., 2006; TAOUKIS & LABUZA, 1989).

Dentre as embalagens inteligentes classificadas como indicadores de tempo e temperatura, existem algumas diferenças não somente quanto à resposta, mas também quanto a distintos tipos de princípios de funcionamento. Os novos sistemas de embalagem, chamados de indicadores tempo e temperatura (ITT), estão sendo propostos para atuar como "mensageiros inteligentes" fornecendo mais informações aos consumidores, e assegurando assim o qualidade do produto durante o seu período de vida útil (PAVELKOVÁ, 2012) .

O princípio de funcionamento de um indicador tempo-temperatura baseia-se em uma mudança irreversível, normalmente expressa como uma resposta visível (MAI et al., 2011). A taxa desta mudança é dependente do tempo e da temperatura, assim a resposta visível dá uma indicação das condições de armazenamento cumulativos para o qual o rótulo foi exposto (VERDADE, 2010). Esta resposta deve correlacionar a deterioração do produto com o tempo e temperatura da cadeia de suprimentos (DE JONG et al., 2005). Deste modo, a aplicabilidade de um indicador tempo e temperatura como um indicador de qualidade exige o estudo da cinética dos produtos (TAOUKIS & LABUZA, 2003).

Apesar do grande potencial de contribuição, alguns sistemas de indicadores de tempo e temperatura até agora não têm sido utilizados em escala industrial (BRIZIO, 2014). As principais razões para a falta de indicadores tempo e temperatura comerciais, para produtos alimentares são: custo, confiabilidade e aplicabilidade (CHOI et al., 2014; VERDADE, 2010). Mais estudos são necessários para identificar novos compostos como indicadores tempo e temperatura, bem como para esclarecer os mecanismos para determinar uma combinação favorável de eficiência e confiabilidade. Para o desenvolvimento de um indicador enzimático colorimétrico de tempo e temperatura, com aplicabilidade como embalagem inteligente, se faz necessário conhecer os princípios básicos de funcionamento de análise de cor e pH, pois conforme já citado, os indicadores enzimaticos são baseados em uma mudança de cor causada por um decréscimo do pH resultante de uma reação de hidrólise enzimática de um substrato lipídico (BLIX et al., 1997).

3.3.1. Colorimetria

Em todas as áreas das ciências e da engenharia, a medição assume papel relevante já que da sua confiabilidade dependem os processos de manufatura, estando o mesmo presente em praticamente todas as transações do inter-relacionamento humano.

A cor de um objeto depende de uma séria de fatores, dentre os quais a iluminação, tamanho da amostra, textura e cores no entorno que podem contaminar a cor da amostra. Por se um fenômeno subjetivo, a sensação de cor depende também do observador.

Por definição, colorimetria é a técnica e a ciência que busca com o auxílio de modelos matemáticos, descrever, quantificar e simular a percepção da cor pelo homem. A percepção das cores pelos olhos não é um processo meramente visual, mas sim psico-visual. A cor é algo que se vê com os olhos e se interpreta com o cérebro, é o resultado da interação da luz com os materiais. O sistema Comissão Internacional de Iluminação (CIE) é utilizado para descrever a

cor. Ele não é diferente de nenhum outro, exceto por sua padronização de iluminantes e de observadores (WYSZEKI, 2000).

Em 1931 a CIE determina os valores tri estímulos do observador padrão, que em composição com a distribuição espectral do iluminante e com a curva de refletância do objeto, permitiria transformar esse estímulo em um valor numérico.

Determinavam-se assim os valores tri estímulos X, Y e Z do sistema CIE de colorimetria, por meio das Equações 1 e 2:

$$X = k\,\Sigma\,S\,\lambda\,R\,\overline{\lambda x}_{\lambda}\,\Delta_{\lambda}$$
$$Y = k\,\Sigma\,S\,\lambda\,R\,\overline{\lambda x}_{\lambda}\,\Delta_{\lambda}$$
$$Z = k\,\Sigma\,S\,\lambda\,R\,\overline{\lambda x}_{\lambda}\,\Delta_{\lambda}$$

(Equação 1)

$$k = \frac{100}{\Sigma S \lambda \overline{y} \Delta \frac{\lambda}{\lambda}}$$

(Equação 2)

Sendo S_{λ} a *Spectral Power Distribution* (SPD - Distribuição Espectral de Potência) do iluminante padrão, R_{λ} o fator de refletância do objetivo, as funções tri estímulos espectrais do observador padrão, Δ_{λ} o intervalo de comprimento de onda medido, k o fator de normalização para fazer Y = 100, branco ideal, válido para qualquer cominação de iluminante/observador. Finalmente X, Y e Z, que são valores tri estímulos buscados.

Para o cálculo das coordenadas de cromaticidade (x, y e z), utilizam-se as Equações 3, 4 e 5, conforme abaixo:

$$x = \frac{X}{X + Y + Z}$$

(Equação 3)

$$y = \frac{Y}{X + Y + Z}$$

(Equação 4)

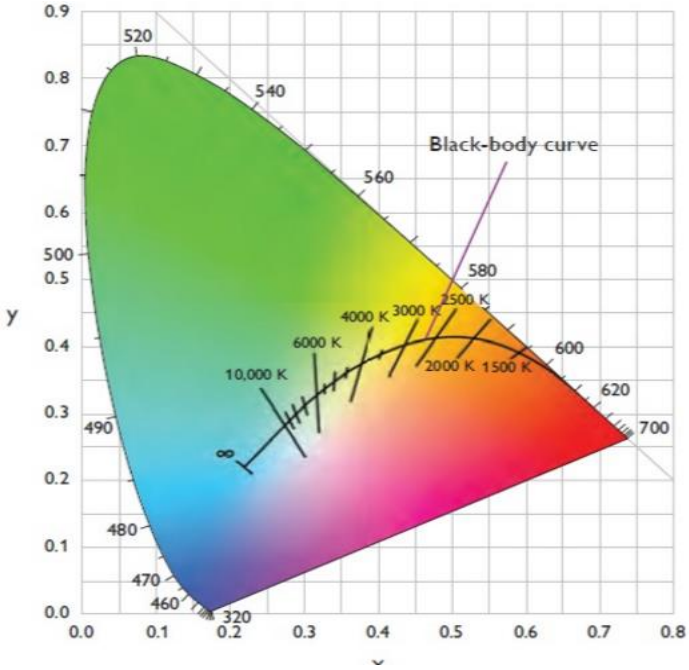
$$z = \frac{Z}{X + Y + Z}$$

(Equação 5)

Nas equações acima, pode ser visto que x + y + z = 1 para qualquer cor. São suficientes apenas duas coordenadas de cromaticidade, para se construir um gráfico bidimensional, como

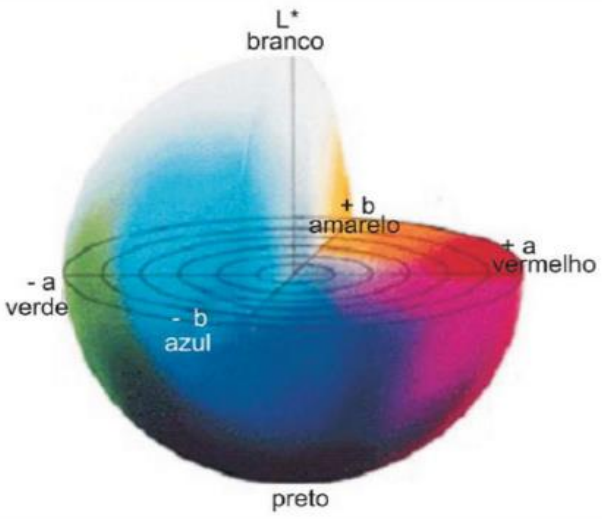
da Figura 2. Também X e Z podem ser facilmente calculados a partir de x, y e Y (SHARMA, 2003).

Figura 2 - Diagrama de cromaticidade.



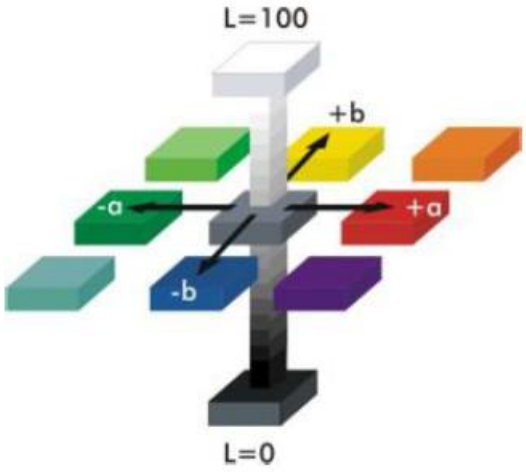
Neste espaço, distâncias iguais não correspondem a diferenças iguais de cores, o que torna esse diagrama visualmente não uniforme. Se este espaço fosse uniforme as linhas de tonalidade constante seriam retas radiais e as cores de croma constante formariam círculos concêntricos. Para superar essas dificuldades foi criado o espaço CIELAB, mostrado na Figura 3 (SHEVELL, 2003).

Figura 3 - Espaço CIELAB.



A Comissão Internacional de Iluminação define os padrões de medição de cor internacionalmente e gerencia o método de referência de cor usado no projeto, o espaço Lab. L*, a*, e b* representam os parâmetros espaciais (L, a, b), que são coordenadas associadas a um espaço vetorial retangular onde cada cor representa um ponto. Cada parâmetro diz respeito a um componente da cor na amostra, baseado no princípio do olho humano para a percepção de cores, e está disposto como é mostrado na Figura 4 (FOLEY, 1990).

Figura 4 - Representação esquemática da escala Cielab.



(L) percebe tons claros ou escuros, é o único parâmetro finito, que vai de L = 0, ausência total de luz, até L = 100, branco difuso;

a) percebe tons vermelhos a verdes, sendo aos vermelhos associados valores positivos e aos verdes negativos;

b) percebe tons amarelos a azuis, sendo aos amarelos associados valores positivos e aos azuis negativos.

Em função dos valores tri estímulos a CIE determina as novas coordenadas LAB que definirão o espaço CIELAB, conforme Equações 6, 7 e 8 abaixo (FOLEY, 1990).

$$L* = 116\ [f\left(\frac{Y}{Yn}\right) - \frac{16}{116}]$$

(Equação 6)

$$a* = 500\ [f\left(\frac{X}{Xn}\right) - f\left(\frac{Y}{Yn}\right)]$$

(Equação 7)

$$b* = 200\ [f\left(\frac{Y}{Yn}\right) - f\left(\frac{Z}{Zn}\right)]$$

(Equação 8)

Sendo

$$\int \left(\frac{X}{Xn}\right) = \left(\frac{X}{Xn}\right)^{\frac{1}{2}} para \frac{X}{Xn} > 0{,}008856$$
$$ou\ 7{,}787\left(\frac{X}{Xn}\right) + \frac{16}{116}, caso\ contrário$$

(Equação 9)

$$\int \left(\frac{Y}{Yn}\right) = \left(\frac{Y}{Yn}\right)^{\frac{1}{2}} para \frac{Y}{Yn} > 0{,}008856$$
$$ou\ 7{,}787\left(\frac{Y}{Yn}\right) + \frac{16}{116}, caso\ contrário$$

(Equação 10)

$$\int \left(\frac{Z}{Zn}\right) = \left(\frac{Z}{Zn}\right)^{\frac{1}{2}} para \frac{Z}{Zn} > 0{,}008856$$
$$ou\ 7{,}787\left(\frac{Z}{Zn}\right) + \frac{16}{116}, caso\ contrário$$

(Equação 11)

Desta forma pode ser quantificada a distância nesse espaço, entre as coordenadas do padrão e da amostra, conforme Equações 11, 12 e 13.

$$\Delta \boldsymbol{L}^* = \boldsymbol{L}^*_{\boldsymbol{amostra}} - \boldsymbol{L}^*_{\boldsymbol{padrão}}$$

(Equação 12)

$$\Delta \boldsymbol{a}^* = \boldsymbol{a}^*_{\boldsymbol{amostra}} - \boldsymbol{a}^*_{\boldsymbol{padrão}}$$

(Equação 13)

$$\Delta \boldsymbol{b}^* = \boldsymbol{b}^*_{\boldsymbol{amostra}} - \boldsymbol{b}^*_{\boldsymbol{padrão}}$$

(Equação 14)

E assim determinada ΔE^*_{ab}, distância nesse espaço entre um padrão e uma mostra, pela Equação 15:

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

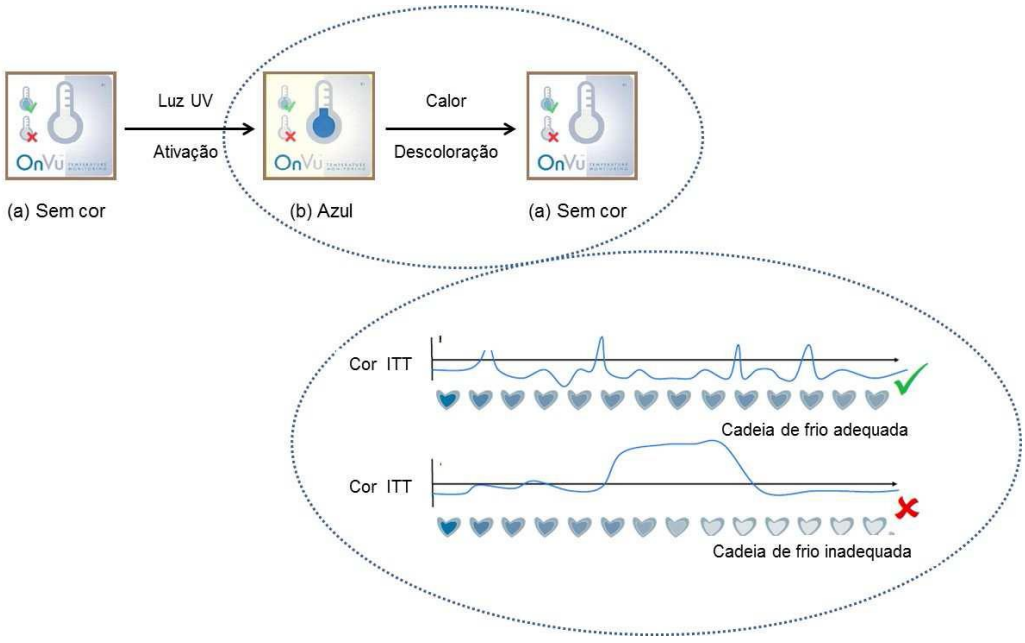
(Equação 15)

3.4. Indicador de Tempo e Temperatura nas Embalagens

Na última década, numerosos sistemas de ITT têm sido propostos, dos quais apenas alguns se tornaram 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):

- *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 5 elucida o princípio de funcionamento da *OnVu*® TTI, enquanto a Figura 6 mostra o *design* da etiqueta inteligente desenvolvida pela BIZERBA.

Figura 5- Ciclo de reação do sistema fotocrômico da etiqueta *OnVu*®. A exposição à luz ultravioleta induz a coloração, enquanto o calor promove a reação inversa.



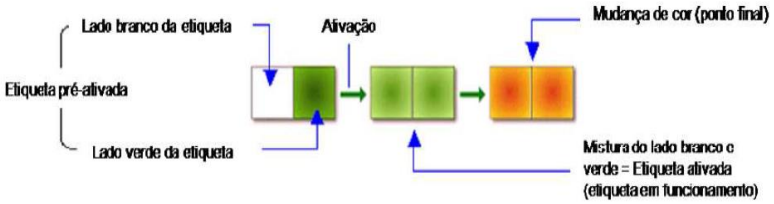
Fonte: Adaptado de BASF – *OnVu*® (2012)

Figura 6 - Modelo da etiqueta inteligente *OnVu®.*

Fonte: BASF – *OnVu®* (2012)

- *Checkpoint® Indicator da VITSAB (Visual IndicatorTag 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 7).

Figura 7 - Princípio de funcionamento do ITT elaborado pela *VITSAB.*

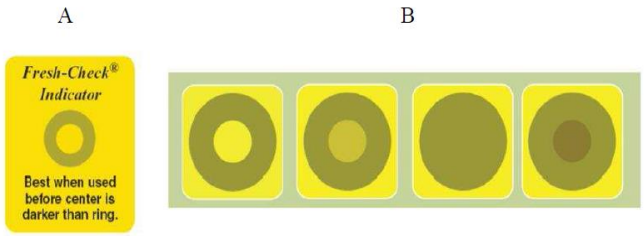


Fonte: BRIZIO (2014)

- *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 8).

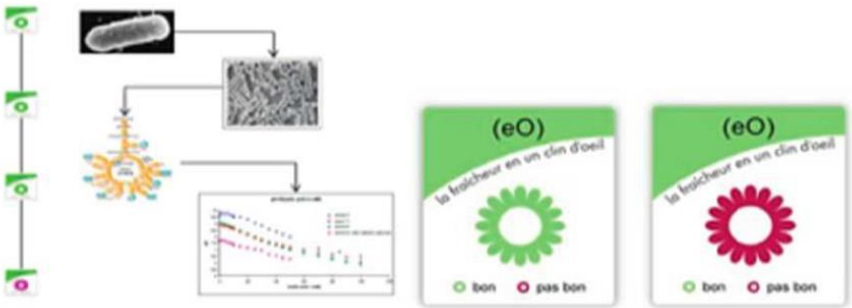
Figura 8 - (A) Modelo do rótulo *Fresh-Check*®; (B) Escala de cores apresentada pelo indicador *Fresh-Check*®eO® TTI da CRYOLOG (www.cryolog.com).



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

Etiqueta inteligente eO® - 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 descongelamento. 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 9).

Figura 9- 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).

Além da aplicação dos indicadores tempo temperaturas enzimáticos, tem surgido no mercado tendências de pesquisa e aplicação de rótulos inteligentes de indicadores tempo-temperaturas microbianos os quais tem sido estudados como mecanismos de resposta para a qualidade dos alimentos. Em comparação com outros indicadores de tempo-temperatura não microbianos disponíveis, a vantagem distinta do indicador tempo-temperatura microbiano é que a sua resposta (mudança de cor) é o resultado de um processo simulando o processo de perda de qualidade de muitos alimentos, especialmente a maioria dos alimentos altamente proteicos resfriados. Isso indica um alta possibilidade de que as mudanças na qualidade dos alimentos devido a micro-organismos possam ser refletidas por indicadores de tempo-temperaturas microbianos com precisão. O estudo apresenta cinco tendências de desenvolvimento de indicadores tempo-temperatura microbianos, os quais podem ser fabricados por um método

simplificado. A abertura de um banco de dados disponível com parâmetros cinéticos de indicadores tempo-temperaturas compartilhados e modelos de predição de vida de prateleira poderiam facilitar a aplicação dos indicadores microbianos. (ZHANG, et al., 2016).

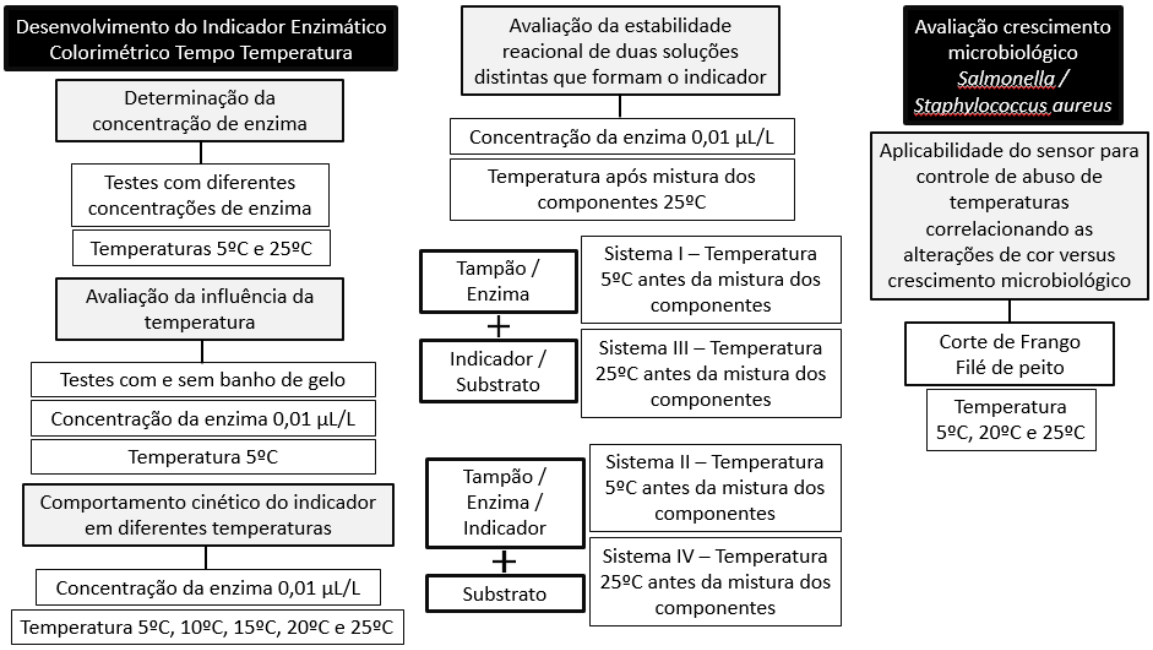
Foram realizados estudos relacionados à preparação de um indicador de tempo-temperatura microbiano usando o forma vegetativa do *Bacillus amyloliquefaciens* para monitorar a qualidade de produtos alimentares refrigerados, através do desenvolvimento de um novo indicador de tempo-temperatura microbiano o qual foi projetado usando a atividade de células da *alphaamylase* vegetativa de *Bacillus amyloliquefaciens*. No sistema projetado, uma mudança de cor de um reagente de iodo ocorre progressivamente para o amarelo, devido à hidrólise do amido. O efeito do nível de inóculo mostrou a relação linear negativa entre os níveis de *Bacillus amyloliquefaciens* inoculado no meio e os pontos finais dos indicadores de tempo-temperatura. As principais vantagens do indicador de tempo-temperatura são baixo custo e aplicação para monitorar a qualidade de produtos alimentares refrigerados. (ESFAHANI, et al., 2017).

Indicadores de tempo-temperatura microbianos foram desenvolvidos para monitorar a vida de prateleira da carne, o objetivo do estudo foi desenvolver um indicador microbiano versátil baseado na formação de violaceína, um pigmento violeta produzido pelo micro-organismo *Janthino bacterium sp*. durante o crescimento inicial, dependendo da temperatura e das propriedades intrínsecas do meio de crescimento. O indicador tempo-temperatura foi validado para a deterioração da carne bovina picada sob condições de armazenamento isotérmico e dinâmico, utilizando dados gerados neste estudo. A aplicabilidade do indicador tempo-temperatura foi também avaliada para outros produtos à base de carne, incluindo carne cozida embalada a vácuo, utilizando dados da literatura. (MATARAGASA, et al., 2019).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste item estão descritos o delineamento experimental, bem como as metodologias da fase experimental, buscando avaliar o emprego do indicador enzimático colorimétrico de tempo e temperatura desenvolvido. A Figura 10 mostra de forma resumida, todas as etapas do desenvolvimento do trabalho, no âmbito desta tese.

Figura 10 – Representação esquemática referente ao delineamento experimental.



Fonte: O autor (2018).

4.1. Desenvolvimento do Indicador Enzimático Colorimétrico de Tempo Temperatura

A preparação do indicador enzimático colorimétrico foi realizada com uma enzima disponível comercialmente, enzima lipase Calb I (lote LCN 02115). O sistema reacional do indicador tempo e temperatura é composto com 4 mM de Tributiryn, 0,1% Triton X-100, 2,5% de tampão (Na_2HPO_4 0,2 M, ácido cítrico 0,1M, pH 7,5), 8,5% indicador de pH (mistura de 0,1% de azul de bromotimol, vermelho metilo vermelho neutro, a 12:4:1) (KIM et al., 2012). Para preparação de 100mL do sistema reacional são adicionados 0,120 ml de Tributiryn, 0,100 mL de Triton, 2,5 mL de tampão, 8,5 mL do indicador de pH e um volume de enzima variável (determinado pelos testes realizados), além da adição de água até completar o volume total da amostra de 100mL, por fim realizada a homogeneização do sistema reacional.

Determinação da concentração de enzima:

Esta etapa consistiu na identificação da concentração de enzima ideal para o sistema reacional, onde foram realizados testes com diferentes concentrações de enzima (20000; 15000; 10000; 5000; 1000; 500; 100; 250; 1; 0,1; 0,05 µL/L e posteriormente 0,01 µL/L). Estes experimentos foram realizados expondo o sistema reacional em condição de temperatura controlada à 5 ºC, bem como em condição de abuso de temperatura à 25 ºC, para realização destes testes fez-se o acompanhamento do pH, através do método eletrométrico, sendo o mesmo medido diretamente na solução com pHmetro, a cor analisada através de registros fotográficos. O tempo de acompanhamento para cada teste foi determinado pelas alterações de pH e aspecto visual de cada amostra, sendo diferente para cada teste realizado.

A atividade de esterificação foi quantificada através de uma reação de síntese, empregando o ácido oleico e etanol (razão molar 1:1) como reagentes ((Bernardes et al. (2007) e Langone et al. (2002)). Após a realização do ensaio em branco, para determinar a acidez do meio reacional, foi conduzida a adição da enzima lipase CALB (1 g da solução enzimática). A reação foi conduzida a 40 °C, durante 40 minutos, em frascos de vidro fechados, mantidos em agitador orbital a 160 rpm. Para as medidas de acidez, alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata e adicionadas a 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v). A quantidade de ácido consumida foi determinada por titulação com hidróxido de sódio (NaOH) 0,05 M. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1µmol de ácido graxo por minuto por grama de catalisador, nas condições do ensaio. A atividade enzimática foi calculada utilizando a Equação 16.

$$AE = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 1000 \times V_f}{t \times M_{EL} \times V_C}$$

(*Equação 16)*

Onde: AE = atividade de esterificação (U/g); V_a = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 min (mL); V_b = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo 0 (mL); M = molaridade da solução de NaOH; V_f = volume final de meio reacional (mL); t = tempo (min); M_{EL} = peso da enzima livre (solução enzimática)/imobilizada; V_c = volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

Avaliação da influência da temperatura:

Novos ensaios foram realizados para avaliar a influência das oscilações da temperatura, ao retirar as amostras do shaker (modelo 4.0 A da NOVA TÉCNICA), para

verificação do pH, para tais testes foi mantida a concentração de enzima em 0,01 µL/L, sendo a temperatura da amostra controlada à 5 ºC, onde foi variado somente a forma de conservação das amostras, sendo que uma das amostras foi mantida com banho de gelo, a fim de eliminar possíveis influências de temperatura ao retirar a amostra do equipamento e uma das amostras foi mantida sem banho de gelo durante a verificação do pH. Os testes com banho de gelo se dão através de um recipiente contendo gelo, sendo que o sistema reacional, o qual está dentro de um *erlenmeyer*, é disposto sobre o gelo durante a verificação do pH, após o retorno da amostra para o ambiente com temperatura controlada, o gelo é descartado. Para estes ensaios realizou-se o acompanhamento do pH, pelo método eletrométrico, sendo o pH medido diretamente na solução com pHmetro, a cor foi analisada através de registros fotográficos, o acompanhamento do pH e cor foi realizado num período de 18 dias.

Comportamento cinético do indicador em diferentes temperaturas:

Esta etapa do desenvolvimento do trabalho consistiu em analisar o comportamento da vida útil do sistema enzimático colorimétrico, mantendo uma mesma concentração de enzima de 0,01 µL/L, expondo o sistema reacional em diferentes condições de temperaturas (5, 10, 15, 20 e 25 ºC). A mistura reacional foi mantida sem agitação no equipamento shaker (modelo 4.0 A da NOVA TÉCNICA). O acompanhamento do pH foi realizado pelo método eletrométrico, sendo medido com pHmetro diretamente na solução, a determinação da cor foi realizada com colorímetro, com posição do filtro UV nominal, com área de visão de uma polegada quadrada, no modo de transmitância total, que incide um feixe de luz normal à superfície da amostra e por registros fotográficos. Para cada temperatura testada, o tempo final de acompanhamento da amostra foi diferente, sendo o mesmo determinado pelas alterações de pH e aspecto visual de cada uma das amostras.

Avaliação da estabilidade do sistema reacional a abusos sequenciais de temperatura:

A fim de avaliar a estabilidade do sistema reacional a exposição de abusos sequenciais de temperatura, simulando a manipulação do consumidor em uma gondola de supermercado, este foi submetido a refrigeração (< 5,0 ºC) por 2 horas e depois exposto à temperatura ambiente (20 ºC) por 1 ou 5 minutos e posterior devolução à refrigeração por mais 2 horas. Este procedimento foi repetido até a alteração do sistema reacional, com manutenção sob refrigeração durante os períodos noturnos (simulando a ausência de manipulação).

Durante o período de exposição a temperatura ambiente, o sistema reacional foi mantido em contato com uma base gelada, para simular um produto refrigerado, o qual não sofre mudança total de temperatura quando em contato com o ambiente por 1 ou 5 minutos.

O acompanhamento da estabilidade do sistema reacional foi feito por determinação do pH e alteração visual da cor mediante registros fotográficos.

Avaliação da estabilidade reacional das soluções que formam o indicador:

Objetivando a aplicabilidade prática do sistema reacional desenvolvido, estudou-se a conservação do sistema em soluções distintas, visto que, quando todos os componentes do sistema reacional estão misturados, o processo de alteração de cor e pH já pode ser iniciado. Para tanto, foi estudada a conservação em temperaturas diferentes (5 e 25ºC), de duas soluções distintas, formando assim quatro sistemas reacionais:

Sistema I: (tampão/enzima/água) + (substrato/indicador) – 5ºC

Sistema II: (tampão/enzima/indicador/água) + (substrato) – 5ºC

Sistema III: (tampão/enzima/água) + (substrato/indicador) – 25ºC

Sistema IV: (tampão/enzima/indicador/água) + (substrato) – 25ºC

Os testes realizados com temperatura de 5 ºC tem por objetivo avaliar a necessidade de conservação dos componentes da reação em condições de temperatura controlada, para tanto os testes com os sistemas reacionais I (tampão/enzima/água) + (substrato/indicador) e II (tampão/enzima/indicador/água) + (substrato) foram realizados mantendo os compostos ainda separados, conservados por 24 horas em temperatura controlada a 5 ºC, transcorrido esse período foi realizada a mistura entre todos os componentes da reação. Para avaliar o comportamento de ambos sistemas reacionais foi realizado cinética reacional, com abuso de temperatura à 25 ºC.

Os testes com os sistemas III (tampão/enzima/água) + (substrato/indicador) e IV (tampão/enzima/indicador/água) + (substrato) foram realizados mantendo os compostos ainda separados conservados por 24 horas em temperatura controlada a 25 ºC, a qual simula uma condição de temperatura ambiente, o objetivo de expor os compostos a essa temperatura é avaliar a possibilidade de conservação dos componentes sem a necessidade de manter os mesmos sob refrigeração. Após transcorridas as 24 horas foi realizada a mistura entre os componentes, onde foi realizado cinética reacional, com abuso de temperatura à 25 ºC, da mesma forma, para acompanhar as mudanças reacionais.

Para os quatro ensaios realizados, o tempo final de acompanhamento das amostras, foi determinado pelas mudanças de pH e aspecto visual de cada uma das amostras, sendo distintos entre si. O pH foi determinado pelo método eletrométrico, sendo medido com pHmetro diretamente nas soluções, a determinação da cor foi realizada com colorímetro, com posição do filtro UV nominal, com área de visão de uma polegada quadrada, no modo de transmitância total, que incide um feixe de luz normal à superfície da amostra e por registros fotográficos para todos os ensaios.

4.2 Avaliação do crescimento microbiológico

Buscando associar o abuso de temperatura correlacionando com o crescimento microbiológico, realizou-se um estudo para acompanhar o crescimento microbiológico de *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708) *e Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) inoculados em filé de peito de frango, em diferentes condições de temperatura (5, 20 e 25 ºC).

As amostras de filé de peito são provenientes de uma empresa frigorífica de grande porte, situada na região norte do Rio Grande do Sul. As amostras foram coletadas sob condições adequadas de temperatura, respeitando a legislação vigente bem como fazendo uso das boas práticas de fabricação, sendo a coleta e análise realizadas no primeiro dia de abate.

S. aureus e *Salmonella* foram inoculados, separadamente, em filé de peito na concentração de 10^2 UFC/mL e incubados nas diferentes temperaturas. Foi realizado um experimento controle, onde amostras de filé de peito sem contaminação foram incubadas nas temperaturas estudadas. Foram coletadas amostras em intervalos de 2 horas para realizar a contagem total de bactérias.

Para o desenvolvimento dos testes foram utilizados pedaços de peitos de frango previamente acondicionados em embalagens herméticas. Os micro-organismos foram previamente crescidos em caldo Luria Bertani - LB (10 g/L triptona; 5 g/L extrato de levedura; 5 g/L NaCl). Para crescimento foi feito o repique em caldo LB e incubado por 24 horas a 37 ºC.

Para o preparo do inóculo, após crescimento foi feita a diluição da concentração de células em água peptonada 0,1%, mergulhou-se por um minuto 12 pedaços com aproximadamente 10g de frango em 90 mL da mesma água e depois transferido para embalagens herméticas. Diariamente, as embalagens passaram pelo homogeneizador *Stomacher*. Por fim, para a contagem de células foi realizado plaqueamento em meio *Plate*

Count Agar – PCA (5 g/L Digestão enzimática da Caseína; 2,5 g/L Extrato de levedura; 1 g/L Glicose (Dextrose); 15 g/L Ágar). As diluições procederam-se em água peptonada 0,1%.

A simulação da negligência em relação à refrigeração foi feita mantendo-se o inóculo sob refrigeração por 2 horas para aclimatação ao frio e posterior desligamento do refrigerador e manutenção da porta aberta. Após 2 horas, cada inóculo foi submetido a uma diferente temperatura (5, 20 e 25°C) simulando diferentes condições ambientais. A cinética de crescimento em cada condição foi feita por plaqueamento e contagem de amostras retiradas do inóculo de hora em hora, por 12 horas.

4.3 Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como gráficos e a correlação de Pearson foram obtidos com o programa Excel.

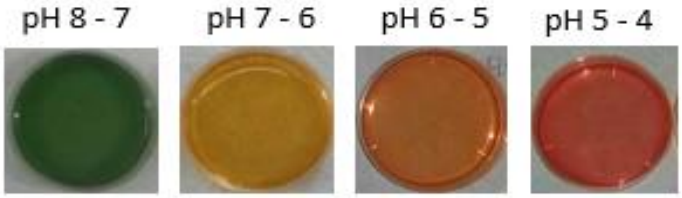
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Desenvolvimento do Indicador Enzimático Colorimétrico de Tempo Temperatura

De acordo com Taoukis (2008), o sinal da resposta é o parâmetro que determina a facilidade de leitura de um indicador de tempo temperatura. 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.

Com base no exposto por Taoukis, foi estudado um sistema reacional de fácil visualização, onde após a mistura do sistema reacional, a amostra apresenta coloração verde e pH na faixa entre 7 e 8, o indicador enzimático provoca uma mudança de cor, de verde para vermelho, causada por um decréscimo do pH resultante de uma reação de hidrólise enzimática de um substrato lipídico, a cor da amostra é alterada com a redução de pH, conforme mostra a Figura 11. A atividade enzimática da lipase CALB, utilizada em todos os experimentos foi determinada em 30,5 U/g.

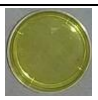
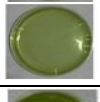
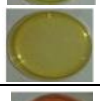
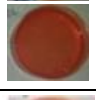
Figura 11 - Variação da coloração do indicador enzimático de tempo e temperatura em relação à redução de pH.



Fonte: O autor (2017).

Foi realizado o acompanhamento do pH das amostras, determinado pelo método eletrométrico, onde o pH das amostras foram medidos diretamente na solução com pHmetro, e por registros fotográficos para o observar o aspecto visual do sistema reacional. A Tabela 1 apresenta os valores de pH e aspecto visual do sistema reacional, onde foi avaliado diferentes concentrações de enzima, acondicionadas em diferentes temperaturas (5 e 25 ºC) determinando os tempos de reação para alteração do aspecto visual das amostras testadas.

Tabela 1 – pH e aspecto visual das reações com diferentes concentrações de enzima acondicionadas 5 e 25 ºC e diferentes tempos de reação.

µL/L	Temperatura	Aspecto Visual Inicial	pH	Aspecto Visual Final	pH	Tempo Final
20000	5 ºC		6,43		5,57	3 horas
	25 ºC		5,94		5,27	3 horas
15000	5 ºC		6,43		5,84	3 horas
	25 ºC		6,20		5,28	3 horas
10000	5 ºC		6,43		5,84	3 horas
	25 ºC		6,46		5,69	3 horas
5000	5 ºC		6,15		6,87	3 horas
	25 ºC		6,43		5,99	3 horas
1000	5 ºC		6,76		5,89	3 horas
	25 ºC		6,76		4,73	3 horas
500	5 ºC		6,80		6,01	3 horas
	25 ºC		6,80		4,43	3 horas
100	5 ºC		6,89		5,99	24 horas
	25 ºC		6,89		6,33	24 horas
250	5 ºC		6,69		5,73	24 horas
	25 ºC		6,88		4,71	24 horas
1	5 ºC		7,41		4,49	6 dias

0,1	5 ºC		7,34		6,57	6 dias
0,05	5 ºC		7,41		6,68	6 dias
	25 ºC		7,43		5,54	6 dias
0,01	5 ºC		7,68		7,17	20 dias

Os resultados apresentados na Tabela 1 deixam claro que as alterações de cor do sistema reacional mostram uma dependência proporcional a quantidade de enzima, onde inicialmente foi utilizado 20000 µL/L de enzima, à reação apresentou alteração de pH e aspecto visual em 3 horas, já com 0,01 µL/L a reação permaneceu por 20 dias sem alteração de cor e redução significativa de pH, quando a amostra foi conservada em temperatura controlada (5 ºC).

A partir da análise dos resultados obtidos, ficou evidente a influência da enzima bem como da temperatura nas alterações do pH bem como nas alterações do aspecto visual. Os resultados demostram que, quando uma amostra com o mesmo percentual de enzima, submetida a diferentes condições de temperaturas, ocorrem tempos reacionais distintos, onde quanto maior a temperatura a qual a amostra foi submetida, mais rápido ocorre a redução do pH e alteração do aspecto visual. Fenômeno este também apresentado no trabalho de Wu (2015), que desenvolveu um indicador de tempo temperatura enzimático baseado na lipase *Aspergillus niger*, sendo que os autores apresentam a simulação do modelo matemático para o indicador de tempo temperatura, o qual expressa a relação das mudanças de cor com o tempo e a temperatura.

O percentual de enzima, o qual apresentou melhor comportamento em relação ao maior tempo para alteração do aspecto visual foi de 0,01 µL/L, quando mantida em geladeira (5 ºC), A partir disso, decidiu-se fazer novas amostras reacionais, mantendo as amostras em banho de gelo, objetivando avaliar a influência da alteração da temperatura, ao retirar a amostra da geladeira para verificar o pH e mantendo as amostras sem o banho de gelo, comparativamente. A amostra sem banho de gelo foi exposta a diferentes condições de temperaturas ambientes, as quais variaram de 20 ºC até 29 ºC, sendo que o tempo de exposição da amostra nessas condições de temperatura, era somente o tempo necessário para estabilização do pH no momento da sua verificação (tempo máximo de 5 minutos), tempo esse semelhante entre os diferentes horários de coleta do pH. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – pH e aspecto visual da reação com 0,01 µL/L de enzima acondicionadas em geladeira (5 ºC), com banho e sem banho de gelo.

Tempo (dias)	Sem banho de gelo		Com banho de gelo	
	Aspecto Visual	pH	Aspecto Visual	pH
1		8,367±0,083		7,677±0,001
2		8,337±0,076		7,606±0,011
3		8,207±0,207		7,542±0,030
4		8,250±0,144		7,467±0,016
5		8,070±0,353		7,423±0,053
6		8,007±0,161		7,453±0,005
7		7,430±0,411		7,353±0,030
8		7,547±0,383		7,416±0,017
9		7,213±0,494		7,381±0,042
10		7,003±0,715		7,353±0,018
11		7,023±0,556		7,323±0,026
12		6,687±0,780		7,302±0,023
13		6,523±0,582		7,278±0,039
14		6,357±0,766		7,255±0,039
15		6,183±0,690		7,227±0,052
16		6,113± 0,779		7,214±0,070

17		6,057±0,698		7,193±0,084
18		5,900±0,879		7,174±0,080

Os resultados obtidos na Tabela 2 mostram que após 18 dias de reação, para as amostras mantidas em banho de gelo, foi possível manter a cor da amostra verde e o pH na faixa 7, conforme objetivo do estudo, efeito esse que não apresentou o mesmo comportamento quando a amostra não foi conservada em banho de gelo, o que demonstrou que a exposição do sistema reacional à pequenas variações de temperatura, provoca um efeito cumulativo e irreversível no resultado da reação. Com este resultado definiu-se que as amostras reacionais do indicador de tempo e temperatura seriam mantidas em banho de gelo, quando expostas a temperatura controlada (5 ºC), bem como os reagentes durante a preparação do sistema reacional, e que novos experimentos seriam realizados com diferentes temperaturas.

Fez-se novamente o acompanhamento do pH das amostras, determinado pelo método eletrométrico, onde o mesmo foi medido diretamente na solução com pHmetro, o acompanhamento da cor foi realizado por registros fotográficos para observar o aspecto visual do sistema reacional, obteve-se também os parâmetros de cor L*, a*, b*, sendo que da escala Cielab, tem-se o cálculo do parâmetro ΔE*, associado à intensidade da cor, sendo o mesmo dado pelo módulo da diferença de valores da amostra e do padrão branco, a partir dos parâmetros medidos pelo equipamento.

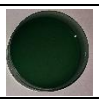
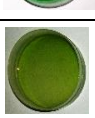
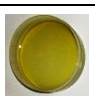
Os novos testes foram realizados utilizando uma concentração de 0,01 µL/L de enzima, onde a variável estudada foi a temperatura, com as seguintes variações: 5, 10, 15, 20 e 25 ºC, durante a composição do experimentos o sistema reacional foi mantido em banho de gelo para a temperatura de 5 ºC. As condições de temperaturas estudadas caracterizam 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). A Tabela 3 mostra os valores de pH, ΔE, parâmetros de cor L*, a*, b* e aspecto visual do sistema reacional, sob a condição de 5 ºC de temperatura, no decorrer do tempo reacional.

O parâmetro L* representa a luminosidade da amostra, a qual não apresentou grandes variações no decorrer do tempo de armazenamento, conforme demonstrado na Tabela 3, sendo

que o mesmo demonstrou ser pouco influenciado na condição de temperatura à que o sensor colorimétrico foi exposto, mesmo transcorrido 18 dias de reação.

Para o parâmetro a*, os dados mostram valores negativos, os quais indicam a predominância da cor verde pela escala Cielab, e sem grandes alterações no decorrer do tempo de armazenamento do indicador colorimétrico. Esta baixa variação indica uma boa capacidade de manutenção da cor verde durante o armazenamento a 5 °C e, portanto, boa funcionalidade do indicador colorimétrico, capaz de manter a cor por pelo menos 18 dias, tempo de reação esse suficiente, visto que superou o tempo de *shelf life* do produto, o qual é de 12 dias.

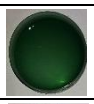
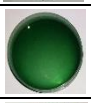
Tabela 3 – Parâmetros de cor L*, a*, b*, ΔE, valores de pH e aspecto visual dos indicadores acondicionados na temperatura de 5 ºC.

Tempo	Média			ΔE	pH	Aspecto Visual
	L	a	b			
0	53,543 ± 0,002	-10,296 ± 0,001	8,164 ± 0,004	0,000	7,671	
5 dias	48,522 ± 0,002	-8,420 ± 0,002	11,304 ± 0,003	6,212	7,422	
10 dias	50,603 ± 0,002	-7,123 ± 0,003	14,375 ± 0,002	7,569	7,351	
15 dias	54,327 ± 0,002	-6,694 ± 0,002	18,330 ± 0,001	10,746	7,225	
18 dias	53,839 ± 0,001	-6,897 ± 0,002	19,433 ± 0,001	11,774	7,182	
18 dias 15 horas	53,123 ± 0,001	-6,870 ± 0,002	19,725 ± 0,001	12,065	7,176	
18 dias 17 horas	51,467 ± 0,001	-6,512 ± 0,001	20,432 ± 0,002	13,005	7,156	
18 dias 19 horas	50,273 ± 0,001	-6,419 ± 0,003	21,488 ± 0,002	14,257	7,143	
18 dias 21 horas	49,868 ± 0,002	-6,170 ± 0,026	21,783 ± 0,002	14,697	7,001	
18 dias 23 horas	49,426 ± 0,001	-5,960 ± 0,010	22,234 ± 0,003	15,288	6,839	

Os valores obtidos para o parâmetro b* são positivos, o que indica a predominância da cor amarela em relação a azul, pode ser observado que no decorrer do tempo reacional, os valores vão aumentando cumulativamente, fenômeno esse também apresentado pelo parâmetro ΔE*, onde após transcorrido 18 dias + 17 horas (18,7 dias) ocorreu alteração visual da cor, estes resultados demonstram que o sensor pode ser utilizado com segurança por até 18 dias quando conservado a uma temperatura de 5 ºC.

A Tabela 4 mostra os valores de pH, ΔE, parâmetros de cor L*, a*, b* e aspecto visual do sistema reacional, sob a condição de 10 ºC de temperatura, no decorrer do tempo reacional.

Tabela 4 – Parâmetros de cor L*, a*, b*, ΔE, valores de pH e aspecto visual do sistema reacional acondicionadas na temperatura de 10 ºC.

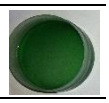
Tempo	Média			ΔE	pH	Aspecto Visual
	L	a	b			
0	53,324 ± 0,003	-10,177 ± 0,002	8,214 ± 0,002	0,000	7,669	
5 dias	51,002 ± 0,001	-8,438 ± 0,001	11,313 ± 0,002	4,245	7,435	
10 dias	50,422 ± 0,001	-7,043 ± 0,002	14,582 ± 0,002	7,669	7,372	
15 dias	54,124 ± 0,001	-6,877 ± 0,003	18,227 ± 0,003	10,574	7,259	
15 dias 6 horas	52,840 ± 0,001	-6,636 ± 0,002	18,683 ± 0,001	11,063	7,217	
15 dias 8 horas	51,004 ± 0,001	-6,624 ± 0,001	20,157 ± 0,001	12,675	7,208	
15 dias 10 horas	50,193 ± 0,001	-6,514 ± 0,001	21,496 ± 0,002	14,130	7,153	
15 dias 12 horas	49,147 ± 0,002	-6,419 ± 0,002	21,843 ± 0,002	14,743	6,995	
15 dias 14 horas	48,926 ± 0,001	-6,126 ± 0,002	22,185 ± 0,001	15,198	6,983	

O resultado dos testes para temperatura de 10 ºC para os parâmetros L* e a* apresentaram comportamento semelhante quando comparados com a temperatura de 5 ºC. Os

valores obtidos para o parâmetro b* são positivos, apresentando comportamento semelhante ao longo do tempo de reação, onde é possível observar que existe ligação entre os valores obtidos e o tempo reacional, pois após transcorrido o tempo reacional de 15 dias + 10 horas (15,4 dias) ocorreu alteração da cor. Estes resultados demonstram que um pequeno aumento da temperatura, reduziu cerca de 3 dias o tempo necessário para o sistema reacional alterar a cor.

A Tabela 5 mostra os valores de pH, ΔE, parâmetros de cor L*, a*, b* e aspecto visual do sistema reacional, sob a condição de 15 ºC de temperatura, no decorrer do tempo reacional.

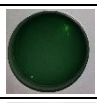
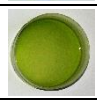
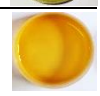
Tabela 5 – Parâmetros de cor L*, a*, b*, ΔE, valores de pH e aspecto visual da reação acondicionadas na temperatura de 15 ºC.

Tempo	Média			ΔE	pH	Aspecto Visual
	L	a	b			
0	53,626 ± 0,001	-10,421 ± 0,002	8,319 ± 0,002	0,000	7,783	
5 dias	48,975 ± 2,308	-9,003 ± 0,002	10,128 ± 0,002	5,187	7,561	
7 dias	52,684 ± 0,002	-8,285 ± 0,003	12,374 ± 0,002	4,679	7,412	
9 dias	51,874 ± 0,002	-7,573 ± 0,002	13,136 ± 0,002	5,864	7,373	
9 dias 8 horas	51,750 ± 0,001	-7,324 ± 0,002	13,577 ± 0,003	6,384	7,342	
9 dias 12 horas	51,248 ± 0,001	-7,117 ± 0,001	15,89 ± 0,002	8,598	7,325	
9 dias 16 horas	51,003 ± 0,001	-6,932 ± 0,003	17,267 ± 0,003	9,956	7,283	
9 dias 18 horas	50,984 ± 0,002	-6,778 ± 0,003	19,573 ± 0,002	12,120	7,231	
9 dias 19 horas	50,475 ± 0,003	-6,591 ± 0,002	21,163 ± 0,003	13,768	7,179	
9 dias 20 horas	49,287 ± 0,002	-6,327 ± 0,002	21,922 ± 0,003	14,854	7,072	
9 dias 21 horas	49,017 ± 0,001	-6,208 ± 0,002	22,014 ± 0,002	15,051	6,814	

Para a temperatura de 15 ºC os resultados dos testes para os parâmetros L* e a* apresentaram comportamento semelhante quando comparados com as temperaturas de 10 e 5 ºC. Para o parâmetro b* os valores obtidos também são positivos, porém o tempo necessário para alterar o aspecto visual, reduziu para 9 dias + 18 horas (9,8 dias) evidenciando o quanto a temperatura influência nas alterações de tempo reacional.

A Tabela 6 mostra os valores de pH, ΔE, parâmetros de cor L*, a*, b* e aspecto visual do sistema reacional, sob a condição de 20 ºC de temperatura, no decorrer do tempo reacional.

Tabela 6 – Parâmetros de cor L*, a*, b*, ΔE, valores de pH e aspecto visual da reação acondicionadas na temperatura de 20 ºC.

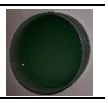
Tempo	Média			ΔE	pH	Aspecto Visual
	L	a	b			
0	53,475 ± 0,001	-10,215 ± 0,001	8,171 ± 0,001	0,000	7,679	
4 horas	52,593 ± 0,003	-9,271 ± 0,083	10,322 ± 0,576	2,511	7,581	
8 horas	52,220 ± 0,001	-7,248 ± 0,001	15,896 ± 0,001	8,370	7,353	
12 horas	52,004 ± 0,001	-7,113 ± 0,001	17,311 ± 0,002	9,764	7,318	
14 horas	51,431 ± 0,002	-6,994 ± 0,001	19,428 ± 0,001	11,886	7,247	
15 horas	50,334 ± 0,001	-6,724 ± 0,001	21,618 ± 0,002	14,239	7,124	
16 horas	49,221 ± 0,001	-6,313 ± 0,002	21,816 ± 0,002	14,816	7,017	
17 horas	48,862 ± 0,002	-6,127 ± 0,002	22,219 ± 0,002	15,341	6,882	
18 horas	48,524 ± 0,001	-5,981 ± 0,001	22,104 ± 0,003	15,381	6,265	

Para a amostra submetida a temperatura de 20 ºC, a alteração do aspecto visual se deu em menos de 1 dia de reação, com apenas 14 horas (0,6 dias), demonstrando a grande influência do abuso da temperatura no sistema reacional. Os resultados do parâmetro L*, assim como para as demais temperaturas testadas, não apresentou grandes alterações (Tabela 6). Os dados do parâmetro a* mostram valores negativos, já os resultados obtidos para o parâmetro b* são

positivos, tais resultados apresentam ligação com o tempo de armazenamento do indicador colorimétrico, bem como os resultados obtidos para o ΔE*, evidenciando assim a relação da alteração do aspecto visual com o aumento da temperatura ao longo do tempo reacional.

A Tabela 7 mostra os valores de pH, ΔE, parâmetros de cor L*, a*, b* e aspecto visual do sistema reacional, sob a condição de 25 ºC de temperatura, no decorrer do tempo reacional.

Tabela 7 – Parâmetros de cor L*, a*, b*, ΔE, valores de pH e aspecto visual da reação acondicionadas na temperatura de 25 ºC.

Tempo	Média			ΔE	pH	Aspecto Visual
	L	a	b			
0	53,496 ± 0,002	-10,309 ± 0,002	8,207 ± 0,002	0,000	7,682	
2 horas	52,986 ± 2,001	-9,249 ± 0,002	9,631 ± 0,002	1,847	7,597	
4 horas	52,659 ± 0,003	-9,187 ± 0,002	10,436 ± 0,002	2,632	7,482	
6 horas	52,514 ± 0,001	-8,536 ± 0,003	11,628 ± 0,002	3,976	7,391	
8 horas	52,105 ± 0,002	-7,450 ± 0,002	15,663 ± 0,004	8,106	7,346	
9 horas	51,318 ± 0,002	-7,286 ± 0,002	19,046 ± 0,003	11,461	7,289	
10 horas	50,282 ± 0,003	-6,834 ± 0,002	21,522 ± 0,002	14,131	7,112	
11 horas	49,167 ± 0,004	-6,294 ± 0,004	21,778 ± 0,001	14,800	7,021	
12 horas	48,959 ± 0,003	-6,115 ± 0,001	22,003 ± 0,002	15,116	6,739	
13 horas	48,438 ± 0,002	-5,994 ± 0,002	22,113 ± 0,001	15,414	6,182	

Os testes realizados para o sistema reacional com temperatura de 25 ºC ratificaram a grande influência da temperatura na alteração do aspecto visual, onde com apenas 9 horas (0,4 dias) de reação ocorre alteração do aspecto visual. O parâmetro L* o qual representa a

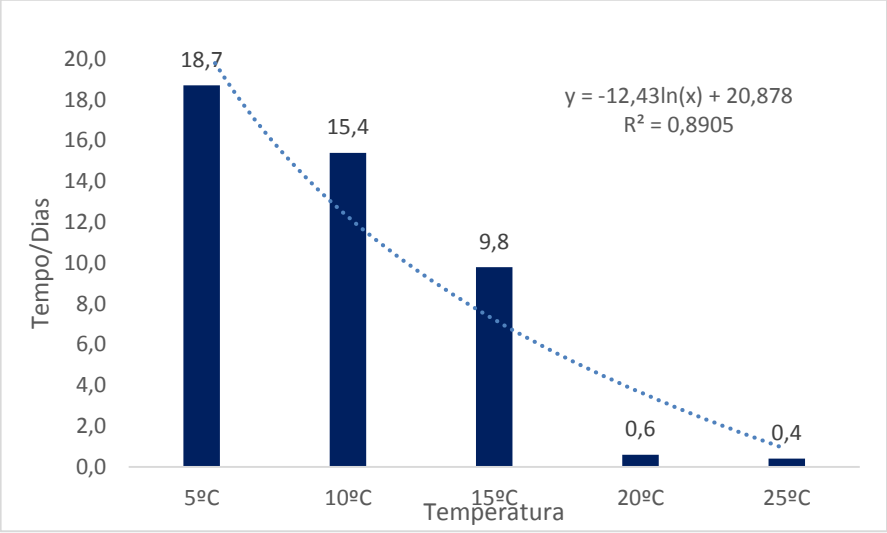
luminosidade da amostra apresentou baixa relação com o tempo de armazenamento do indicador colorimétrico, assim como para todas as demais temperaturas testadas.

Os dados do parâmetro a*, mostram valores negativos, os quais indicam a predominância da cor verde pela escala Cielab, tal resultado apresenta ligação com o tempo de armazenamento do indicador colorimétrico, comportamento esse que evidencia a alteração do aspecto visual.

Já, os valores obtidos para o parâmetro b* são positivos, o que indica a predominância da cor amarela em relação a azul. Ao longo do tempo de reação, é possível observar que existe relação entre os valores obtidos e o tempo, relação esta, também observada para o parâmetro ΔE* o qual aumentou com o tempo transcorrido na reação. Estes resultados podem indicar que temperatuas maiores de armazenamento podem levar a um amarelecimento do indicador colorimétrico, o qual poderia ser interpretado como abuso de temperatura pelo consumidor.

Os resultados dos testes realizados para sistema reacional com diferentes condições de temperaturas, demonstram a influência que a mesma exerce nas alterações do aspecto visual, a Figura 12 evidencia a relação entre a temperatura e tempo do sistema reacional para alteração do aspecto visual.

Figura 12 - Relação Tempo e Temperatura para alteração da cor do sistema reacional.



Fonte: Os autores (2018).

As variações apresentadas nos resultados da Figura 12 indicam uma boa capacidade de manutenção da cor verde durante o armazenamento na temperatura de 5 °C, portanto, boa funcionalidade do indicador colorimétrico, capaz de manter a cor por pelo menos 18 dias, ao mesmo tempo evidencia que quando exposto ao abuso de temperatura (20 e 25 ºC) a prevalência da cor verde se mantém apenas por algumas horas, podendo assim ser facilmente utilizado para

identificar possíveis negligências de alguns estabelecimentos quanto a falta de controle das temperaturas de expositores de alimentos refrigerados, sendo esta uma ferramenta que pode ser facilmente utilizada visando a segurança alimentar quando se trata de abuso de temperatura ao longo da cadeia de distribuição e armazenagem de produtos resfriados.

Limbo et al. (2010), destaca que 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. Neste sentido, destaca-se a importância de criar sistemas, os quais deixam claro para os consumidores, as condições de temperaturas as quais os produtos ficam armazenados, visto que após a etapa de transporte e distribuição, não se tem meios para o monitoramento, alertando os consumidores para possíveis alterações de qualidade ligadas a variações de temperaturas as quais os produtos foram expostos.

O valor obtido de ΔE*, calculado através do L*, a*, b* mensurados, evidenciou que houve uma mudança de cor significativa nos sistemas reacionais com o aumento gradativo da temperatura. Resultado este que deve corroborar com as alterações microbiológicas ao expor as amostras cárneas na condição de abuso de temperatura, conforme ressaltado por Taoukis (2008), o qual relata que na visão do consumidor, como não há uma correlação algorítmica 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.

As Tabelas 8 e 9 apresentam os resultados de pH e aspecto visual da avaliação da exposição do sistema reacional a abusos sequenciais de temperatura pela retirada deste da refrigeração (< 5,0 ºC) permanecendo em temperatura ambiente (20 ºC) por 1 e 5 minutos, respectivamente, e posterior devolução à refrigeração por duas horas.

Tabela 8 – Valores de pH e aspecto visual do sistema reacional exposto a abusos sequenciais de temperatura (20 ºC) por 5 minutos e posterior devolução à refrigeração por 2 horas.

Tempo (horas)	pH	Aspecto Visual	Tempo (horas)	pH	Aspecto Visual	Tempo (horas)	pH	Aspecto Visual
0	7,762		2	7,758		4	7,707	
6	7,681		8	7,629		10	7,612	

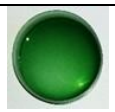
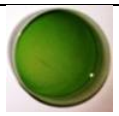
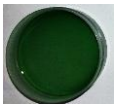
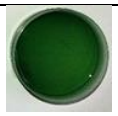
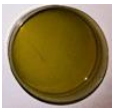
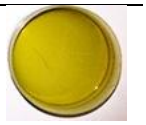
12	7,601		14	7,578		26	7,425	
28	7,404		30	7,393		32	7,367	
34	7,325		36	7,279		38	7,224	
40	7,162							

Tabela 9 – Valores de pH e aspecto visual do sistema reacional exposto a abusos sequenciais de temperatura (20 ºC) por 1 minuto e posterior devolução à refrigeração por 2 horas.

Tempo (horas)	pH	Aspecto Visual	Tempo (horas)	pH	Aspecto Visual	Tempo (horas)	pH	Aspecto Visual
0	7,709		2	7,693		4	7,689	
6	7,671		8	7,653		10	7,642	
12	7,625		14	7,613		26	7,591	
28	7,585		30	7,571		32	7,568	
34	7,549		36	7,541		38	7,535	
50	7,517		52	7,509		54	7,502	
56	7,494		58	7,488		60	7,475	

62	7,468		74	7,445		76	7,432	
78	7,418		80	7,405		82	7,387	
84	7,362		86	7,348		88	7,305	
90	7,217		92	7,152		94	6,876	

O sistema reacional manteve suas características de aspecto visual (verde) e pH acima de 7,2, por 90 e 38 horas, quando exposto sequencialmente à temperatura ambiente por 1 e 5 minutos, respectivamente.

Apesar da severa condição de abuso ao que o sistema reacional foi submetido, com exposição à temperatura ambiente por 1 e 5 minutos a cada 2 horas, o mesmo manteve-se estável por 3,7 e 1,6 dias, com 14 e 31 manipulações do sistema reacional, expondo á temperatura ambiente, respectivamente (Tabelas 8 e 9).

Considerando que o sistema reacional, quando mantido sob refrigeração, permaneceu estável por 18 dias e 17h (449h) (Tabela 3, e que há uma correlação inversa entre o número de manipulações e o tempo de estabilidade do sistema reacional, pode-se realizar até aproximadamente 3 manipulações sem observar-se alterações de pH e aspecto visual do mesmo pelo mesmo tempo (449h).

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 (BRIZIO; PRENTICE, 2014; MAI et al., 2011; ELLOUZE & AUGUSTIN, 2010; VAIKOUSI et al., 2009; TSIRONI et al., 2009). Neste contexto, fez-se o acompanhamento de diferentes combinações do sistema reacional a fim de aplicação dos mesmos nas superfícies das embalagens.

Os testes com o Sistema I (tampão/enzima/água) + (substrato/indicador) e o Sistema II (tampão/enzima/indicador/água) + (substrato) foram realizados mantendo os compostos ainda separados, conservados por 24 horas em temperatura controlada a 5 ºC, transcorrido esse período foi realizada a mistura entre os componentes, onde foi realizado cinética reacional, com

abuso de temperatura à 25 ºC, realizando avaliação visual da coloração e acompanhamento do tempo necessário para ocorrer a alteração do aspecto visual, sendo os resultados expostos nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 – Parâmetros de cor L*, a*, b*, ΔE, pH e aspecto visual do Sistema I (tampão/enzima/água) + (substrato/indicador) a 5 ºC antes da mistura e 25 ºC após mistura.

Tempo (horas)	Média			ΔE	pH	Aspecto Visual
	L	a	b			
0	53,417 ± 0,032	-10,660 ± 0,015	10,680 ± 0,015	0,000	7,842	
1	53,140 ± 0,035	-10,370 ± 0,010	10,780 ± 0,030	0,413	7,752	
2	52,793 ± 0,015	-9,750 ± 0,015	11,250 ± 0,012	1,242	7,713	
3	52,473 ± 0,015	-8,750 ± 0,021	12,390 ± 0,015	2,732	7,652	
4	52,157 ± 0,015	-8,140 ± 0,006	14,570 ± 0,006	4,803	7,617	
5	51,897 ± 0,021	-7,940 ± 0,015	16,230 ± 0,015	6,365	7,551	
6	51,547 ± 0,025	-7,480 ± 0,021	17,920 ± 0,012	8,126	7,429	
7	51,333 ± 0,006	-7,030 ± 0,010	19,140 ± 0,015	9,439	7,347	
8	50,650 ± 0,026	-6,690 ± 0,015	19,960 ± 0,010	10,466	7,251	
9	50,203 ± 0,012	-6,230 ± 0,015	20,670 ± 0,006	11,391	7,199	
10	49,317 ± 0,023	-5,900 ± 0,010	21,090 ± 0,017	12,159	7,032	

Os resultados dos testes realizados para o Sistema I demonstraram reprodutibilidade com os testes realizados para sistema reacional com exposição ao abuso da temperatura (25 ºC), ambos tiveram um tempo de reação de 9 horas (0,4 dias), tempo esse onde ocorre alteração do aspecto visual, apresentando baixos desvios entre os valores das triplicatas. Ao longo do tempo de reação, é possível observar que existe relação entre os valores obtidos para os parâmetros

a*/b* e o tempo reacional, relação esta, também observada para o parâmetro ΔE* o qual aumentou com o tempo transcorrido na reação para as amostras analisadas.

Tabela 11 – Parâmetros de cor L*, a*, b*, ΔE, pH e aspecto visual do Sistema II (tampão/enzima/indicador/água) + (substrato) a 5 ºC antes da mistura e 25 ºC após mistura.

Tempo	Média			ΔE	pH	Aspecto
horas	L	a	b			Visual
0	53,450 ± 0,010	-9,900 ± 0,010	14,990 ± 0,020	0,000	7,717	
1	53,170 ± 0,017	-9,160 ± 0,015	15,320 ± 0,015	0,857	7,672	
2	52,757 ± 0,021	-8,840 ± 0,006	15,780 ± 0,010	1,493	7,604	
3	52,120 ± 0,564	-8,410 ± 0,006	16,290 ± 0,020	2,383	7,572	
4	52,273 ± 0,006	-8,330 ± 0,012	16,530 ± 0,012	2,494	7,554	
5	52,043 ± 0,015	-8,160 ± 0,021	16,790 ± 0,006	2,872	7,504	
6	51,883 ± 0,015	-8,040 ± 0,006	17,550 ± 0,021	3,531	7,493	
7	51,523 ± 0,006	-7,940 ± 0,010	17,940 ± 0,006	4,032	7,418	
8	51,367 ± 0,012	-7,670 ± 0,006	18,870 ± 0,026	4,936	7,367	
9	51,197 ± 0,015	-7,520 ± 0,010	19,540 ± 0,015	5,608	7,348	
10	51,023 ± 0,006	-7,370 ± 0,000	19,350 ± 0,006	5,595	7,309	
48	49,360 ± 0,020	-6,647 ± 0,015	21,030 ± 0,006	7,987	7,113	

Os testes realizados para o Sistema II demonstraram resultados diferentes do sistema reacional testado com exposição do mesmo ao abuso da temperatura (25 ºC), onde no tempo de reação de 10 horas, os testes do Sistema II, não apresentaram alterações expressivas de pH em consequência também não alterou o aspecto visual, comprovando a ineficiência do sistema testado, tal fato explicado pois como o substrato ficou armazenado em um recipiente

independente, o mesmo não conseguiu reagir com os demais componentes após a mistura, devido ao seu baixo volume. Somente após transcorrido 48 horas de reação, é possível evidenciar alterações de pH e aspecto visual, comprovando assim a sua não aplicação prática.

Os testes com o Sistema III (tampão/enzima/água) + (substrato/indicador) e o Sistema IV (tampão/enzima/indicador/água) + (substrato) foram realizados mantendo os compostos ainda separados conservados por 24 horas em temperatura controlada a 25 ºC, a qual simula uma condição ambiente, a fim de avaliar se a reação sofreria alguma interferência da temperatura, antes da mistura. Transcorrido esse período foi realizada a mistura entre os componentes, onde foi realizada cinética reacional, com abuso de temperatura à 25 ºC, da mesma forma foi realizada avaliação visual da coloração bem como acompanhado o tempo necessário para ocorrer as alterações do aspecto visual, conforme Tabelas 12 e 13.

Tabela 12 – Parâmetros de cor L*, a*, b*, ΔE, pH e aspecto visual do Sistema III (tampão/enzima/água) + (substrato/indicador) a 25 ºC antes da mistura e 25 ºC após mistura.

Tempo	Média			ΔE	pH	Aspecto
horas	L	a	b			Visual
0	54,373 ± 0,015	-9,720 ± 0,015	8,880 ± 0,029	0,000	7,714	
1	53,493 ± 0,015	-9,690 ± 0,015	9,130 ± 0,006	0,915	7,688	
2	52,970 ± 0,005	-9,220 ± 0,025	10,120 ± 0,021	1,939	7,632	
3	52,643 ± 0,025	-8,930 ± 0,025	11,240 ± 0,021	3,031	7,604	
4	52,273 ± 0,015	-8,360 ± 0,021	14,760 ± 0,026	6,390	7,565	
5	52,103 ± 0,023	-8,030 ± 0,010	16,550 ± 0,025	8,175	7,521	
6	51,867 ± 0,015	-7,910 ± 0,015	18,130 ± 0,012	9,753	7,438	
7	51,437 ± 0,025	-7,370 ± 0,015	19,470 ± 0,006	11,238	7,393	
8	50,367 ± 0,015	-6,960 ± 0,031	20,150 ± 0,015	12,275	7,316	

9	49,497 ± 0,021	-6,580 ± 0,006	20,850 ± 0,023	13,301	7,263	
10	48,527 ± 0,021	-5,820 ± 0,021	21,120 ± 0,021	14,114	7,156	

Os testes realizados para o Sistema III, apresentaram resultados semelhantes dos testes realizados para o Sistema I. Demonstrando reprodutibilidade com os resultados do sistema reacional testado com exposição ao abuso da temperatura (25 ºC), onde todos apresentaram um tempo de reação de 9 horas (0,4 dias), tempo esse onde ocorre alteração do aspecto visual.

Os resultados apresentados nas Tabelas 10 e 12 demostram que as amostras, antes da mistura reacional, podem ser conservadas tanto em temperatura controlada (5 ºC), bem como em temperatura ambiente (25 ºC) por até 24 horas, pois ambos resultados apresentaram o mesmo comportamento ao longo do tempo de reação.

Tabela 13 – Parâmetros de cor L*, a*, b*, ΔE, pH e aspecto visual do Sistema IV (tampão/enzima/indicador/água) + (substrato) a 25 ºC antes da mistura e 25 ºC após mistura.

Tempo	Média			ΔE	pH	Aspecto
horas	L	a	b			Visual
0	53,767 ± 0,055	-10,740 ± 0,031	14,760 ± 0,025	0,000	7,721	
1	53,010 ± 0,017	-10,060 ± 0,063	14,860 ± 0,015	1,022	7,678	
2	52,817 ± 0,021	-10,150 ± 0,021	15,330 ± 0,006	1,255	7,629	
3	52,597 ± 0,012	-10,020 ± 0,012	16,110 ± 0,006	1,926	7,601	
4	52,360 ± 0,010	-9,870 ± 0,006	16,270 ± 0,021	2,240	7,583	
5	52,237 ± 0,012	-9,550 ± 0,015	16,690 ± 0,006	2,735	7,527	
6	51,997 ± 0,015	-9,100 ± 0,020	17,450 ± 0,030	3,614	7,512	
7	51,667 ± 0,015	-9,010 ± 0,020	17,870 ± 0,015	4,132	7,508	
8	51,480 ± 0,044	-8,810 ± 0,015	18,140 ± 0,021	4,514	7,471	

9	51,317 ± 0,006	-8,670 ± 0,006	18,370 ± 0,012	4,829	7,455	
10	51,257 ± 0,021	-8,460 ± 0,010	18,410 ± 0,021	4,982	7,436	
48	49,930 ± 0,010	-7,130 ± 0,015	19,550 ± 0,030	7,120	7,194	

Da mesma forma que o resultado dos testes realizados para o Sistema II, os testes realizados para o Sistema IV demonstraram resultado diferentes do sistema reacional testado com exposição do mesmo ao abuso da temperatura (25 ºC), onde no tempo de reação de 9 horas os resultados não apresentaram grandes alterações, sendo que após 10 horas de reação o aspecto visual e o pH continuaram não apresentando alterações, comprovando a ineficiência do sistema testado.

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. Neste sentido, foi avaliada a estabilidade do sistema reacional, para fins de aplicabilidade prática, os resultados dos testes evidenciam a ineficiência dos testes realizados para as amostras onde não ocorreu a homogeneização do substrato com os demais componentes da reação (sistemas II e IV), ao contrário dos resultados obtidos para os sistemas I e III, os quais demostraram eficiência tanto tem temperatura ambiente (25 ºC) quanto em temperatura controlada (5 ºC), antes da mistura reacional, das duas soluções (tampão/enzima/água) + (substrato/indicador), podendo assim ambos os sistemas serem utilizados como ferramenta no combate a condições de abusos de temperaturas, sofridas por alimentos.

As respostas de cor dos Sistemas I e III obtiveram boa reprodutibilidade durante o armazenamento nas temperaturas avaliadas, apresentando baixos desvios entre os valores das triplicatas para todos os parâmetros L*, a*, b* e ΔE. 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.

5.2 Avaliação Microbiológica de Abuso de Temperatura em Produtos

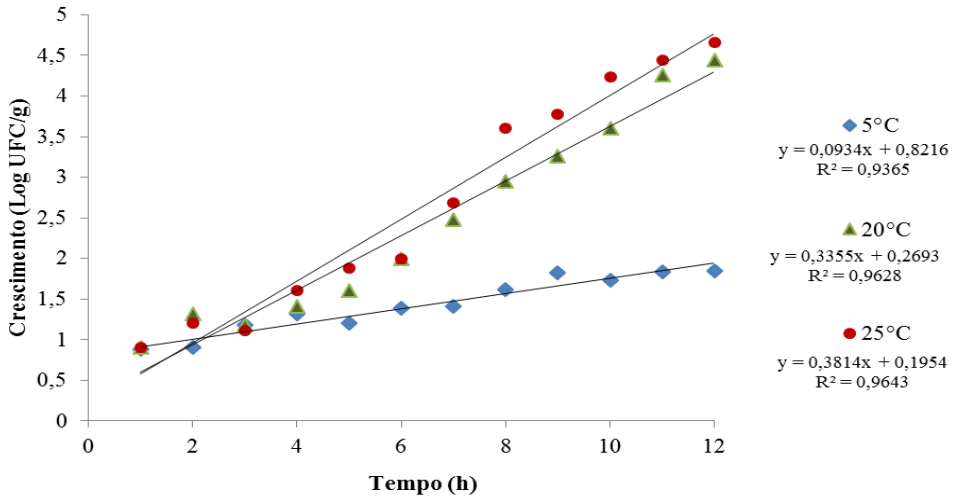
De acordo com Taoukis e Labuza (1989), indicadores inteligentes devem apresentar uma taxa de resposta com uma dependência térmica semelhante a dependência térmica da deterioração do produto ao qual será anexado, ou seja, alimento e indicador devem apresentar Energias de Ativação (Ea) semelhantes. Assim, a aplicabilidade de um ITT como indicador de qualidade requer o estudo da cinética do alimento e do sensor inteligente (TAOUKIS & LABUZA, 2003). Partindo desse princípio foram acompanhadas alterações microbiológicas do filé de peito resfriado, exposto a diferentes condições de abusos de temperaturas, a fim de correlacionar a alteração de coloração do indicador enzimático colorimétrico de tempo e temperatura com as alterações microbiológicas do produto.

5.2.1 Comportamento de *Salmonella choleraesuis* e *S. aureus* em filé de peito de frango

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 nas Figuras 13 e 14, onde são mostrados os resultados microbiológicos de enumeração de *S. choleraesuis* e *S. aureus* das amostras em filé de peito de frango analisadas.

As Figuras 13 e 14 apresentam o comportamento e crescimento de *S.choleraesuis* e *S. aureus* inoculados em filé de peito na concentração de 10^2 UFC/mL e incubados a 5, 20 e 25 ºC. Observa-se a diferença de comportamento no crescimento de *S.choleraesuis* nas diferentes condições de temperatura, sendo que o crescimento ficou praticamente constante até duas horas de incubação, caracterizando a fase de adaptação (Lag) do micro-organismo ao meio e as condições de temperatura. A elevação da temperatura para 25 °C acarretou no aumento de aproximadamente 4,78 Log de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) após 12 horas de exposição e na temperatura de 20 °C apresentando crescimento semelhante, 4,44 Log UFC. Enquanto que para as amostras conservadas a 5 ºC observa-se uma contagem de 1,90 Log UFC durante as 12 horas de avaliação.

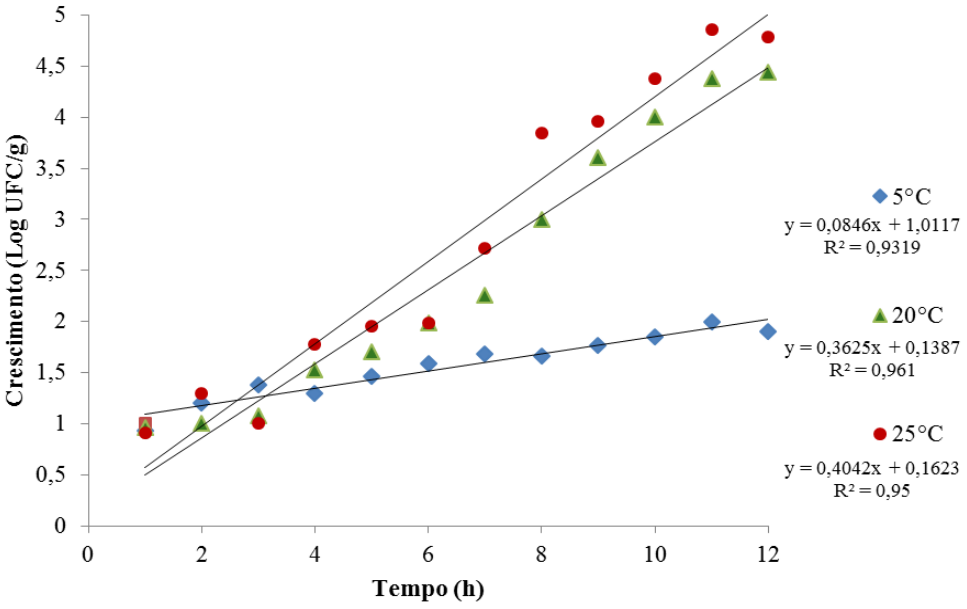
Figura 13 - Cinética de crescimento de *S. choleraesuis* em 5, 20 e 25 °C em filé de peito.



Fonte: Os autores (2017).

Ao analisar a Figura 14, observa-se a diferença de comportamento no crescimento de *S. Aureus* nas diferentes condições de temperatura, sendo que o crescimento ficou praticamente constante até duas horas de incubação, caracterizando a fase de adaptação (Lag) do micro-organismo ao meio e as condições de temperatura. Na temperatura de 25 °C verifica-se uma contagem de 4,66 Log de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) após 12 horas de exposição e 4,43 Log UFC a 20 °C. Para as amostras armazenadas a 5 ºC verifica-se uma contagem de 1,84 Log UFC durante 12 horas de incubação, crescimento esse bem inferior quando comparado com as demais temperaturas.

Figura 14 - Cinética de crescimento de *S. aureus* em 5, 20 e 25 °C em filé de peito.



Fonte: Os autores (2017).

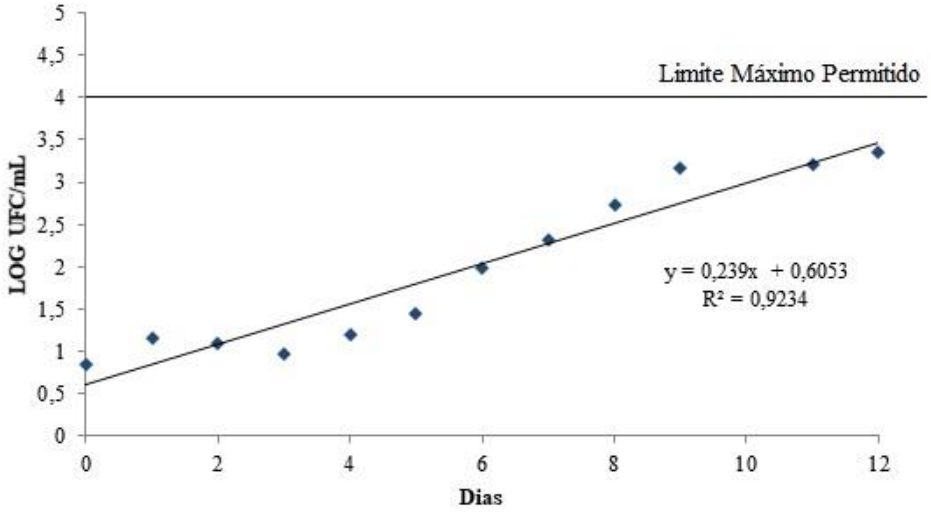
Ao analisar o comportamento das bactérias *S. choleraesuis* e *S. aureus* incubadas em caldo LB ou em filé de peito (Figuras 13 a 14), verifica-se que o aquecimento causado pelo desligamento por longos períodos, como noturnos ou finais de semana, de equipamentos de frio é um problema, pois torna favoráveis as condições para o desenvolvimento e reprodução de micro-organismos muitas vezes patogênicos, principalmente em dias quentes, com temperatura ambiente mais elevada.

Segundo Pereira et al. (2010), a cadeia do frio compreende todo processo de armazenamento, conservação, distribuição, transporte e manipulação dos produtos, tendo em vista o controle e manutenção adequada das baixas temperaturas necessárias para garantir a mesma. Qualquer falha pode comprometer a qualidade dos produtos, pois as velocidades das reações químicas, bioquímicas e microbiológicas estão diretamente relacionadas com a temperatura, ocasionando impacto nos produtos. Segundo Guedes (2008), o controle da temperatura é um parâmetro muito importante a ter em conta a plena manutenção e eficácia da cadeia de frio para a segurança alimentar, no entanto o parâmetro ou fator tempo também é muito importante para que um produto alimentar se mantenha seguro. O período de tempo a que um alimento poderá estar sujeito a temperaturas anômalas é de igual forma decisiva para a segurança dos produtos alimentares ou gêneros alimentícios refrigerados e/ou congelados.

Os *Staphylococcus* são micro-organismos que fazem parte da microflora da carne crua de aves (RUSSELL, 2008). Segundo Franco e Landgraf (2008) e Barbut (2002) são necessárias entre 10^5 (5 log10) e 10^6 (6 log10) UFC de *S. aureus* por grama de alimento para que a toxina seja formada em níveis capazes de provocar intoxicação. Considerando esta faixa, as amostras mantidas a temperaturas acima 20 e 25 ºC, por mais de 12 horas já poderiam representar risco à saúde do consumidor, caso a cepa fosse enterotoxigênica.

Os resultados das análises microbiológicas referente a contagem total de bactérias mostraram que o crescimento da microflora bacteriana em filé de peito de frango foi significativamente retardada nas amostras controle, incubadas a 5 ºC, conforme Figura 15.

Figura 15 - Cinética de crescimento de contagem total de bactérias em 5 ºC em filé de peito de frango.



Fonte: Os autores (2018).

O peito de frango desossado obteve uma vida útil de doze dias sob condições ideias de armazenamento, com temperatura controlada a 5 ºC, onde para produtos resfriados a temperatura de controle é de 0 à 4 ºC com tolerância de $\pm$ 1 ºC, conforme legislação vigente (Brasil, 1998), enquanto as amostras que sofreram abusos de temperatura deveriam ser consumidas nas primeiras 12 horas, depois disso, já representariam risco a saúde dos consumidos caso fossem consumidas, considerando que o limite máximo permitido para uma "contaminação segura" é 10^4 NMP/g para coliformes termotolerantes (ANVISA, 2001). Sendo assim, torna-se imprescindível 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.

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 abatedouro avaliado.

A Tabela 14 apresenta a correlação de Pearson entre o crescimento bacteriano em peito de frango refrigerado e o ΔE e pH do sistema colorimétrico reacional, ambos submetidos a 20 e 25 ºC.

Tabela 14 – Correlação de Pearson entre o crescimento de *S. aureus* e *S. choleraesuis* em peito de frango refrigerado e o ΔE e pH do sistema colorimétrico reacional, submetidos a 20 e 25 ºC.

	20 ºC		25 ºC	
	ΔE	pH	ΔE	pH
S. aureus	0,95	-0,92	0,98	-0,90
S. choleraesuis	0,94	-0,92	0,97	-0,88

Observou-se alta correlação positiva entre a variação da cor (ΔE) e o crescimento de *S. aureus* e *S. choleraesuis* em peito de frango refrigerado, quando submetido ao abuso de temperatura de 20 e 25 ºC e alta correlação negativa em relação à variação de pH nas mesmas condições. Este resultado corrobora a eficácia do sistema reacional em indicar aumento no crescimento microbiano em situações de abuso de temperatura de produtos refrigerados.

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, uma alternativa tecnológica, simples e de baixo custo para garantir a validade dinâmica de alimentos perecíveis pode ser o uso de embalagens inteligentes contendo um indicador enzimático colorimétrico aqui desenvolvido, a utilização do novo ITT pode favorecer os produtores de alimentos e entregar ao consumidor produtos com segurança garantida, já 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.

6. CONCLUSÃO

Os testes realizados para obtenção de um indicador de tempo e temperatura enzimático colorimétrico mostraram-se eficazes, visto que depois de avaliadas diferentes concentrações de enzima, foi obtido resultados satisfatórios para as amostras com 0,01 µL/L de enzima, sendo identificado também, que para o sucesso dos resultados, é de fundamental importância a conservação em banho de gelo no momento da verificação do pH para as amostras conservadas em temperatura controlada (5 ºC).

A temperatura exerce total influência na alteração do pH e aspecto visual das amostras, quando testadas diferentes condições de temperaturas, identificou-se que ocorrem alterações significativas quando a amostra é conservada à 5 ºC, onde o tempo para a amostra alterar o aspecto visual e pH é cerca de 18 dias, já quando a amostra é exposta a temperatura de 25 ºC a mesma teve as alterações visuais de cor e pH com um tempo de 9 horas.

A fim de aplicação prática, foi obtido reprodutibilidade nos testes realizados para obtenção do sistema enzimático colorimétrico, onde quando conservadas as soluções que compõem o sensor (tampão/enzima /água) + (substrato/indicador), tanto em temperatura controlada (5 ºC) ou temperatura ambiente (25 ºC) antes da mistura, obtém-se os mesmos resultados do sistema reacional testado, quando após misturado obteve alterações do pH e aspecto visual com 9 horas, ao expor as amostras ao abuso de temperatura 25 ºC, comprovando a aplicabilidade do sistema quando conservado em recipientes distintos.

As alterações microbiológicas para *S. choleraesuis* e *S. aureus* em peito de frango refrigerado foram diretamente proporcionais às alterações visuais de cor e inversamente proporcionais aos valores de pH do sistema reacional quando as amostras foram submetidas ao abuso da temperatura (20 e 25 ºC).

Contrário aos resultados das amostras que sofreram abusos de temperaturas, para a amostra de controle, onde, quando conservada em condições favoráveis de temperatura (5 ºC), atendendo a legislação vigente, o crescimento microbiológico mostrou-se estável, mesmo passando 12 dias de análise, para contagem total de bactérias.

Corroborando com as alterações microbiológicas, visuais do aspecto de cor e pH, pode se direcionar a aplicabilidade do sensor, onde o mesmo pode ser utilizado para expor abusos de temperaturas, as quais os produtos (cortes de frangos resfriados) são expostos ao longo da cadeia de distribuição e armazenamento, antes de chegar ao consumidor final, com isso, espera-se conferir benefícios efetivos à conservação de alimentos perecíveis, o que favorecerá a prática de venda e distribuição de produtos seguros.

7. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros:

- ✓ Avaliar a vida útil do sistema reacional (tampão/enzima /água) + (substrato/indicador), expondo o mesmo a diferentes *shelf lifes*, antes da mistura dos componentes (1 mês, 3 meses, 6 meses e 1 ano).
- ✓ Desenvolver uma embalagem para aplicação prática do sistema reacional enzimático colorimétrico.
- ✓ Avaliar a cinética reacional de cor e pH do sistema enzimático colorimétrico, quando exposto a condições reais de abusos de temperaturas.
- ✓ Avaliar diferentes concentrações de enzima, objetivando a aplicabilidade do sistema reacional para outros tipos de produtos.
- ✓ Desenvolver um sensor removível da embalagem do produto no caixa do mercado, para evitar reclamações de mau acondicionamento doméstico do produto.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Resolução – RDC nº 19 de 30 de abril de 1999. *Anexo – Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimentos com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem*, 1999.

ANVISA. Resolução – RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. *Anexo – Regulamento Técnico sobre os padrões Microbiológicos para Alimentos*, 2001.

ARENAS, A. M. Z. *Filme biodegradável à base de fécula de mandioca como potencial indicador de mudança de pH.* 2012. 131 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

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

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

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

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

BERNARDES; O. L.; BEVILAQUA, J. V.; LEAL, M. C. M. R.; FREIRE, D.M.G.; LAGNONE, M. A. P. Biodisel fuel production by the trans esterification reaction of soybean oil using immobilized lipase, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 32, p. 136-140, 2007.

BLIX, A. S., ELNER, R. & KJEKSHUS, J.K. *Cardiac output and its distribution through capillaries and A-V shunts in diving seals*. Acta Physiol. Scand, 1997.

BORRÉ, M. H.; AGITO, N. *Operadores Logísticos Frigorificados*. Grupo de Estudos Logísticos. Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

BRAGA, L, R.; PERES, L. Novas tendências em embalagens para alimentos: revisão. *Boletim Ceppa*, Curitiba, v.28, nº 1. p.69-84, 2010.

BRASIL, Vigilância Sanitária. Portaria nº 210 de 10 de novembro de 1998. *Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves,* Diário Oficial, Brasília, Seção 1, p.29, 1998.

BRASIL, Ministério da Agricultura. *Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Linguiças Frescas.* Diário Oficial, Brasília, Seção 1, nº 419, p.7-12, 2000.

BRASIL, Vigilância Sanitária. Portaria nº1004 de 11 de dezembro de 1998. *Atribuição de função dos aditivos e seus limites máximos de uso para a Categoria – Carnes e Produtos Cárneos,* 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução nº 91, de 11 de maio de 2001. *Critérios gerais e classificação de materiais para embalagens e equipamentos em contato com alimentos.* Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 22 de junho de 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimentos – MAPA. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao. Acesso em 13 de janeiro de 2014.

BRECHT M., ROTH, A., & SAKMANN, B. Dynamic receptive fields of reconstructed pyramidal cells in layers 3 and 2 of rat somatosensory barrel cortex. *Journal Physiol*, v. 553, p. 243–265, 2013.

BRIZIO, A. P. D. R. *Embalagens ativas e inteligentes: Tecnologias emergentes para o controle dinâmico da qualidade de alimentos.* Rio Grande: Ed. da FURG, 102, 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.

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

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.

CHOI, D.Y., JUNG, S. W., KIM, T. J., & LEE, S. J. A prototype of time temperature characterization of a new amylase type time-temperature indicator. *Food Control*. v.19, p.315-319, 2014.

DAINELLI, D. *Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns*. Trends in Food Science & Technology. Cambridge, Supl 1, v.19, p.103-112, 2008.

DE JONG, A.R., BROUMANS, H., SLAGHEK, T. VAN VEEN, J., RIJK, R., &VAN ZANDVOORT, M. Active and intelligent packaging for food: Isit the future? *Food Additives and Contaminants*, v. 22, p. 975-979, 2005.

DIAS, J. *A importância da segurança alimentar*. Jornal Hipersuper, Disponível em: <http://www.hipersuperpt/2007/06/01/aimportânciadaseguranacalimentar/>. Acesso em 11 de fevereiro de 2007.

DJENANE, D., L. MARTINEZ, D. BLANCO, J. YANGUELA, J. A. BELTRAN & P. RONCALES. Effect of lactic acid bacteria on extention of shelf life and growth of *Listeria monocytogenes* in beef stored in CO2- rich atmosphere. Brazilian Journal of Microbiology, v.36, p.405-412, 2005.

ESFAHANI, S. S., EMTIAZI, G., & RABBANI, M. Preparation of a microbial time-temperature indicator by using the vegetative form of *Bacillus amyloliquefaciens* for monitoring the quality of chilled food products. *Applied Food Biotechnology*, v.4, p.79–84, 2017.

ELLOUZE, M. & J.C. AUGUSTIN. 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.

ERCOLINI, D., F. RUSSO, E. TORRIERI, P. MASI & F. VILLANI. Changes in the spoilage related microbiota of beef during storage under different packaging conditions. *Applied and Enviromental Microbiology*, v. 72, p. 4663-4671, 2006.

FELLOWS, P.J. *Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e Práticas.* Porto Alegre: Artmed. 2006.

FOLEY, J. D; DAM, A. V.; FEINER, S.K.; HUGHES, J.F. *Computer Graphics Principles and Practice*. 2 ed. Addison-Wesley – 1990.

FORSYTHE, S.J. *Microbiologia da segurança alimentar*. Porto Alegre: Artmed, p.424, 2002.

FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; COLOGNA, N.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Microbial analysis of raw cows' milk used for cheese making: 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 (2013), Acesso em junho de 2015.

GALIC, K., SCETAR, M., & KUREK, M. The benefits of processing and packaging e a review. *Trends in Food Science & Technology*, v.22, p.127-137, 2011.

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.

GUEDES, R. Manutenção da cadeia de frio nos produtos ultracongelados. *Segurança e Qualidade Alimentar*, nº 5, p.54,2008.

HONG, S. I.; PARK, W. S. Use of color indicators as na active packaging system for evaluating kimchi fermentation. *Journal of Food Engineering*, v.46, p.67-72, 2000.

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

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

IRKIN R.; ESMER, O. K.; DEGIRMENCIOGLU.N & DEGIRMENCIOGLU. The Influence of packaging conditions on some microbial properties of minced beef meat at 4 °C storage. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, v.17, nº 5, p.655-663, 2011.

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

JAY, J. M. *Microbiologia de alimentos*. (6ª 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 Electronics in Agriculture*, p.145-154, 2009.

JÚNIOR, E. A. D. S.; PANETTA, J. C. Deterioração das carnes: eficiência e limitação das provas de gás sulfídrico e amônia. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v.6, nº 21, p.5-7, 1992.

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

KIM, W., PARK, E., & HONG, K. Development of a time-temperature integrator system using *Burkholderia cepacia* lipase. *Food Science and Biotechnology*, v.21, p.497-502, 2012.

KOUTSOUMANIS, K. Predictive Modeling of the Shelf Life of Fish under no isothermal Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, n° 4, p.1821–1829, 2001.

KOUTSOUMANIS, K., M.C. GIANNAKOUROU, P.S. TAOUKIS, & G.J. NYCHAS, Application of shelf life decision system (SLDS) to marine cultured fish quality. *In J Food Microbial*., v.73, p.375-82, 2002.

KOUTSOUMANIS, K.P; STAMATIOU, A. P. SKANDAMIS & G. J. E. NYCHAS, Development of a microbial model combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat and validation of the model under dynamic temperature conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, p.124-134, 2006.

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.

KRUIJF, N. VAN BEEST, M., RIJK, R., SIPILAINEN-MALM, T., LOSADAS, P.P., MEULENAER, B. Active and intelligent packaging: applications and regulatory aspects. *Food Additives and Contaminants*, v.19, p.144-162, 2002.

LABUZA, T. P. & TAOUKIS, P. S. Applicability of Time - Temperature Indicators as Food Quality Monitors Under Non-isothermal Conditions. *Journal Food Science and Technology*, v.54, p.783-788, 1989.

LABUZA, T. P. & TAOUKIS, P. S. Reliability of Time-Temperature Indicators as Food Quality monitors Under No isothermal Conditions**.** *Journal of Food Science*, v.54, p.789-782, 1989.

LABUZA, T. P. An Introduction to Active Packaging for Foods. *Food Technology*, v.50, nº 1, p.68-71, 1996.

LAGUERRE, O., DERENS, E., & PALAGOS, B. Study of domestic refrigerator temperature and analysis of factors affecting temperature: a French survey. *International Journal of Refrigeration*, v.25, p.653–659, 2002.

LAHTEENMAKI. L. &URALA, N., ARVOLA, A. Strength of health-related claims and their perceived advantage. *International Journal of Food Science and Technology*, v.38, p.815-826, 2003.

LANGONE, M. A.; DE ABREU, M. E.; REZENDE, M. J.; SANT'ANNA, JR. G. L. Enzymatic synthesis of medium chain mono glycerides in a solvent-free system. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 100, p. 987-996, 2002.

LATOU, E.; MEXIS, S.F.; BADEKA, A.V.; KONTAKOS S.; KONTOMINAS M.G. Combined effect of chitosan and modified atmosphere packaging for shelf life extension of chicken breast fillets. *LWT - Food Science and Technology*, v. 55, p. 263-268, 2014.

LIKAR, K.; JEVSNIK, M. Cold chain maintaining in food trade. *Food Control*, v.17, nº 2, p.108-113, 2006.

LIMBO, S.; TORI, L.; SINELLI, N.; FRANZETTI, L.; CASIRAGHI, E. Evaluation and reductive 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.

MAI, N. T. T., GUDJÓNSDÓTTIR, M., LAUZON, H. L., SVEINSDÓTTIR, K., MARTINSDÓTTIR, E., AUDORFF, H., et al. 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.

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.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO (Brasil). Circular nº. 668 de 19 de setembro de 2006. *Diretrizes para preparação de Plano de APPCC (HACCP) para o processo de abate de aves*. Brasília: p.3, 2006.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO (Brasil). Circular normativa. 9 de 8 de abril de 2009. *Instruir os procedimentos de controle de Listeria monocytogenes em produto de origem animal prontos para o consumo*. Brasília: 2009.

MARTINO, P. *A importância da cadeia de frio na conservação das carnes.* Disponível em: http://www.carnecomciencia.com.br/cadeia-de-frio/. Acesso em março de 2018.

MDIC. Ministério do Desenvolvimento Indústria e comércio exterior, secretaria de comércio exterior. PORTARIA Nº 23, DE 14 DE JULHO DE 2011 (Publicada no D.O.U. de 19/07/2011). 2011.

MAN, C. M. D. Development of a predictive model for spoilage of cooked cured meat products and its validation under constant and dynamic temperature storage conditions. Journal of Food Science, 71, M157–M167. 2016.

MATARAGASA, M., BIKOULIB, V. C., KORREB, M., STERIOTIB, A., SKANDAMISB, P. N. Development of a microbial Time Temperature Indicator for monitoring the shelf life of meat. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. v.52, p.89–99, 2019.

MENDOZA, F. & J.M. AGUILERA. Application of image analysis for classification of ripening bananas. *Journal of Food Science*, v.69, p.471-477, 2004.

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.

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, 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, p.466–470, 2007.

PAVELKOVÁ, A. Intelligent packaging as device for monitoring of risk factors in food. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, v.2, p.282–292, 2012.

PAVELKOVÁ, A. Time temperature indicators as devices intelligent packaging. *Acta Universitatis Agricultura e et Silvicultura e Mendeliana e Brunensis*. Brno. v.61, nº 1, p.245-251, 2013.

PEREIRA, V., DORIA, E., JUNIOR, B., SILVEIRA, V., FILHO, L. Avaliação de temperaturas em câmaras frigoríficas de transporte urbano de alimentos refrigerados e congelados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.30, nº 1, p.158-165, 2010.

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.

REAY, G. A. & SHEWAN, J. M. The spoilage of fish and its preservation by chilling. *Advance. Food Res*. v.2, p.343, 1949.

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*. 3ª ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, p.414-420, 2013.

ROONEY, M.L. *Active Food Packaging.* Chapman and Hall, London, UK., 1995.

ROSS, E. *Em ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. New York: VCR, p.127,1989.

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.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. FERNANDES, M. A embalagem plástica e a conservação de produtos cárneos. *Alimentos & Tecnologia*, v.5, nº 30, p.86-92, 2001.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; CANAVESI, E. *Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis.* Campinas: CETEA/ITAL. p.213, 2001.

SHARMA, G. (Ed). *Digital Color Imaging:* Handbook. Webster, New York: CRC Press, 2003.

SHERLOCK, M. & T.P. LABUZA. Consumer Perceptions of Consumer Time-Temperature Indicators for Use on Refrigerated Dairy Foods. *Journal of Dairy Science*, v.75, p.3167-3176, 1992.

SHEVELL, S. K. (Ed). *The Science of Color.* Oxford: Elsevier, 2003.

SHEWAN, J. M. *The Microbiology of Seawater Fish.* In pp. 487-560, figs. 1-21. Borgstrom, G. Fish as Food. Volume I. Production, Biochemistry, and Microbiology. Academic Press, New York and London. 1961.

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

SINGH, R.K.; SINGH, N. *Quality of packaged. Foods. Innovations in Food Packaging*, ISBN: 0-12-311632-5, p.24-40, 2005.

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.

SOUZA, A. C.; DITCHFIELD, C.; TADINI, C. C. Biodegradable films based on biopolymers for food industries. In: PASSOS, M. L.; RIBERO. C. P. (Ed.). *Innovation in food engineering: new techniques and products*. Boca Raton: CRC Press, p.511-537, 2010.

TAOUKIS, P. S., & LABUZA, T. P. *Time–temperature indicators (TTIs).* In R. Ahvenainen (Ed.), Novel food packaging techniques. Cambridge: Wood head. 2003.

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

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*. P.B. Joseph Kerry, John Wiley & Sons, Ltd: England. p.61-74, 2008.

TAOUKIS, P.S., F. BIN, & T.P. LABUZA, Time-Temperature Indicators. *Food Technology*, v.45, p.70-82, 1997.

TAOUKIS, P.S., *Modelling the use of time-temperature indicators in distribution and stock rotation*, in *Food Process Modelling*, M.L.A.T.M.H. L. M. M. Tijskens, B. M. Nicolai, Woodhead Publishing Limited: Cambridge. p.402-428, 2001.

TAOUKIS, P.S., T.P. LABUZA, & R.C. FRANCIS. Time-Temperature Indicators as Food Quality Monitors. *Food Packaging Technology*, v.1113, p.51-63, 1991.

TAOUKIS, P.S., K. KOUTSOUMANIS, & G.J.E. NYCHAS. 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.

TSIRONI, T., E. GOGOU, E. VELLIOU, & P.S. TAOUKIS. 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, p.108-115, 2009.

TSIRONI, T., GIANNOGLOU, M., PLATAKOU, E., & TAOUKIS, P. S. Evaluation of Time Temperature Integrators for shelf-life monitoring of frozen seafood under real cold chain conditions. *Food Packaging and Shelf Life*, v.10, p.46–53, 2016.

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

UBABEF - União Brasileira de Avicultura. Disponível em:<http://www.abef.com.br/ubabefnovo/frango>. Acesso em 22 de maio de 2012.

UBABEF, União Brasileira de Avicultura de Exportação de Frango Revista Nacional da Carne, ISSN 1413-4837, p.37-38, 2013.

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

UBABEF: União Brasileira de Avicultura – Relatório Anual 2014/2015. Disponível em: http://abpa-br.com.br/files/RelatorioAnual_UBABEF_2015_DIGITAL.pdf. Acesso em 09 de março de 2016.

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

VAIKOUSI, H.I., C.G. BILIADERIS, & K.P. KOUTSOUMANIS. *Development of a Microbial.* 2008.

VAINIONPÄÄ, J. SMOLANDER, M, ALAKOMI, H-L, RITVANEN, T, RAJAMAKI, ROKKA, M & AHVENAINEN, R. Comparison of different analytical methods in the monitoring of the quality of modified atmosphere packaged broiler chicken cuts using principle components analysis. *Journal Food Engineering*, v.65, p.273-280, 2004.

VEIGA-SANTOS, P.; DITCHFIELD, D.; TADINI, C. Development and evaluation of a novel pH indicator biodegradable film based on cassava starch. *Journal of Applied Polymer Science*, v.120, nº 2, p.1069-1079, 2011.

VERDADE, P. S. *Estudo de um TTI fotocrómico para aplicação em alimentos refrigerados.* (Dissertation, Masters in Biochemistry and Food Chemistry) Portugal: University of Aveiro, 2010.

VITASAB International, Check Point Basic Principles. Disponível em: http://www.vitsab.com/Basics.htm. Acesso em junho de 2006.

VITSAB. Disponível em: www.vitsab.com, acessado em junho 2015.

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*, Essex, v.100, nº 3, p.427-434, 2010.

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.

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.

WYSZEKI, G., STILES, W.S. *Color Science: concepts and methods quantitative data and formulae*. 2ª ed. Nova Iorque: J. Wiley & Sons, Inc., p.951, 2000.

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

YOSHIDA, C. M. P. Chitosan bio based and intelligent films: Monitoring pH variations. *LWT – Food Science and Technology*, v.55, nº 1, p.83-89, 2014.

ZHAO, Y. WELLS, J.H., MCMILLIN. Applications of dynamic modified atmosphere packaging system for fresh red meats: review. *J. Muscle foods*, v.5, p.299-328, 1994.

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*, v.91, p.208–214, 2012.

ZHANG, X., SUN, G., XIAO, X., LIU, Y., & ZHENG, X. Application of microbial TTIs as smart label for food quality: Response mechanism, application and research trends. *Trends in Food Science and Technology*, v.51, p.12–23, 2016.