

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

DESENVOLVIMENTO DE INDICADOR COLORIMÉTRICO DE TEMPO E TEMPERATURA PARA APLICAÇÃO EM EMBALAGENS INTELIGENTES

C. F. Casanova¹, M. A. de Souza², R. Colet³, R. M. Dallago, R. L. Cansian⁵, G. T. Backes⁶

1 - Departamento de Ciências Agrárias – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – CEP: 99709-910 – Erechim – RS – Brasil, Telefone: +55 (54) 3520-9000 – e-mail: (carolinecasanova@hotmail.com)

2 - Departamento de Ciências Agrárias – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – CEP: 99709-910 – Erechim – RS – Brasil, Telefone: +55 (54) 3520-9000 – e-mail: mariina.2010@hotmail.com)

3 - Departamento de Ciências Agrárias – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – CEP: 99709-910 – Erechim – RS – Brasil, Telefone: +55 (54) 3520-9000 – e-mail: (rosicler.colet@bol.com.br)

4 - Departamento de Ciências Agrárias – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – CEP: 99709-910 – Erechim – RS – Brasil, Telefone: +55 (54) 3520-9000 – e-mail: (dallago@uricer.edu.br)

5 - Departamento de Ciências Agrárias – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – CEP: 99709-910 – Erechim – RS – Brasil, Telefone: +55 (54) 3520-9000 – e-mail: (cansian@uricer.edu.br)

6 - Departamento de Ciências Agrárias – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – CEP: 99709-910 – Erechim – RS – Brasil, Telefone: +55 (54) 3520-9000 – e-mail: (gtoniazzi@uricer.edu.br)

RESUMO – Abusos de temperatura na cadeia de frio de diferentes produtos permitem que ocorra a proliferação de micro-organismos, causando prejuízos a saúde do consumidor. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um indicador enzimático de tempo-temperatura com alteração de cor sob abuso de temperatura. O sistema enzimático foi desenvolvido avaliando-se variações de pH e cor na hidrólise de tributirina em diferentes concentrações de lipase Calb, em presença de indicador colorimétrico de pH (azul de bromotimol, vermelho de metila e vermelho neutro). Foram realizados testes com diferentes concentrações de enzima até a obtenção da concentração de enzima ideal, a qual foi de 0,01 $\mu\text{L.L}^{-1}$. Identificou-se as alterações de cor e pH do indicador quando exposto a diferentes temperaturas, com redução progressiva no tempo de alteração da cor e do pH com o aumento da temperatura de armazenamento e redução drástica neste tempo, em armazenamento com abuso de temperatura (20 e 25 °C).

ABSTRACT – Abuses of temperature in the cold chain of different products allow the proliferation of microorganisms, causing damage to the health of the consumer. The objective of this work was to develop an enzymatic time-temperature indicator with color change under temperature abuse. The enzymatic system was developed by evaluating variations in pH and color in tributyrin hydrolysis at different concentrations of Calb lipase, in the presence of a colorimetric pH indicator (bromothymol blue, methyl red and neutral red). Tests were carried out with different enzyme concentrations until the ideal enzyme concentration was obtained, which was 0.01 $\mu\text{L.L}^{-1}$. The color and pH changes of the indicator were identified when exposed to different temperatures, with progressive reduction in the time of color change and pH with the increase of the storage temperature and drastic reduction in this time, in storage with temperature abuse (20 and 25 °C).

PALAVRAS-CHAVE: refrigeração; abuso de temperatura; conservação de alimentos.

KEYWORDS: refrigeration; temperature abuse; food preservation.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



1. INTRODUÇÃO

Os consumidores têm buscado por alimentos de qualidade a qual deve ser mantida entre a produção e o consumo (Robertson, 2013). Desta forma, as embalagens alimentícias ganharam novas funções. Além de conter e proteger passivamente o alimento assumem o papel de comunicação, marketing, conveniência e, também, de indicação de qualidade, contribuindo ativamente para a venda de um produto (Galic et al., 2011).

O controle da temperatura durante o armazenamento, transporte e distribuição de produtos muitas vezes é falho, apresentando condições diferentes das recomendadas pelo fabricante. 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).

Em função da temperatura ser considerada o principal fator que afeta a qualidade e segurança de produtos alimentícios perecíveis (Man, 2016; Kreyenschmidt et al., 2010), sistemas de embalagens, denominados “integradores de tempo e temperatura”, 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).

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 (Ellouze & Augustin, 2010; Vaikousi et al., 2009). O princípio de funcionamento de um indicador de tempo-temperatura 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).

Diversos mecanismos de funcionamento de um indicador de tempo-temperatura vêm sendo estudados com intuito de identificar combinações mais adequadas entre alimento e indicador. Dentre eles, podem-se destacar os protótipos enzimáticos, ou seja, os que utilizam reações enzimáticas como princípio de funcionamento. 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. 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 tricaprônica (tricaproína), tripelargonina, bis-3,5,5-trimetil hexalipato (THA), misturas de ésteres de álcoois polivalentes e ácidos orgânicos (Jaiswal et al., 2018; Mijanur Rahman et al., 2018; Reichert et al., 2006; Brizio & Prentice, 2015).

Entretanto, a literatura ainda carece de resultados demonstrando que os integradores de tempo e temperatura com durabilidade semelhante ao de produtos alimentícios refrigerados quando armazenados corretamente e que possam ser armazenados previamente à embalagem do produto sem sofrer alteração. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema enzimático colorimétrico de tempo e 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. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Desenvolvimento do indicador enzimático

A preparação do indicador enzimático colorimétrico foi realizada com uma enzima disponível comercialmente, lipase Calb L Novozym (lote LCN 02115) com atividade declarada de 5000 LU/g. O sistema reacional do indicador tempo e temperatura foi composto com 4 mMol.L⁻¹ de Tributirina, 0,1% Triton X-100, 2,5% de tampão (Na₂HPO₄ 0,2 Mol.L⁻¹, ácido cítrico 0,1 Mol.L⁻¹, 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) variando-se a concentração de enzima (20000; 15000; 10000; 5000; 1000; 500; 100; 250; 1; 0,1; 0,05; 0,01 e 0,005 μL.L⁻¹). Os experimentos foram realizados expondo o sistema reacional em condições de temperatura controlada à 5 °C, bem como em condições de abuso de temperatura à 25 °C. O tempo de acompanhamento para cada teste foi determinado pelas alterações de pH e o valor ΔE* de cada amostra.

A mudança de cromaticidade (valor ΔE^*) foi medida usando as coordenadas de cores do CieLab para descrever objetivamente a alteração irreversível da cor do indicador colorimétrico de tempo e temperatura por unidade de tempo em diferentes temperaturas constantes, e o valor ΔE^* foi expresso pela seguinte Equação 1.

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

Onde, L^* é a diferença na mudança de brilho (branco-preto) entre $t = 0$ e o tempo de medida. a^* é a diferença de vermelho-esverdeado e b^* é a diferença de amarelo-azulado (Francis, 1983).

Visando avaliar a influência das oscilações da temperatura do sistema reacional quando manipulado para verificação do pH e cor, o mesmo foi armazenado à 5 °C e exposto a temperatura ambiente (20 °C ± 2) ou em banho de gelo, por 1 a 2 minutos, em diferentes tempos de acompanhamento (até 480 horas). Para este ensaio e nos posteriores, foi utilizado 0,01 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de enzima.

2.2 Efeito da temperatura no comportamento cinético

O comportamento cinético do indicador enzimático colorimétrico de tempo e temperatura foi avaliado mantendo a concentração de enzima de 0,01 $\mu\text{L.L}^{-1}$ e expondo o sistema reacional a diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20 e 25 °C). Para cada temperatura testada, o tempo final de acompanhamento da amostra foi determinado pelas alterações de pH e cor.

2.3 Análise estatística







Todas as análises foram realizadas em triplicata e os gráficos foram construídos utilizando o programa Excel.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Indicador enzimático

Um indicador de tempo temperatura deve apresentar um sinal da resposta compreensível e perceptível com facilidade de leitura pelo público alvo, com conseqüente tradução da mensagem correta para todos (Taoukis, 2008). Neste sentido, foi estudado um sistema reacional de fácil visualização, onde após a adição da enzima no indicador enzimático pode ser observada a mudança de coloração em função da variação do pH pela hidrólise do substrato tributirina (Figura 1).

Figura 1 - Variação da coloração do indicador enzimático de tempo temperatura em relação à redução de pH.

pH					
7.65-7.50	7.50-7.35	7.35-7.20	7.20-7.05	7.05-6.90	6.90-6.85
					

Os resultados referentes a avaliação de diferentes concentrações de enzima acondicionadas a 5 e 25 °C demonstraram que o indicador enzimático com uma mesma concentração de enzima, submetida a diferentes condições de temperaturas, geram tempos reacionais distintos, sendo que quanto maior a temperatura a qual o indicador enzimático foi submetido, mais rápido ocorre a redução do pH e alteração do aspecto visual, em qualquer das concentrações testadas. Fenômeno este também observado por Wu et al. (2015), que desenvolveram um indicador enzimático de tempo temperatura de 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.

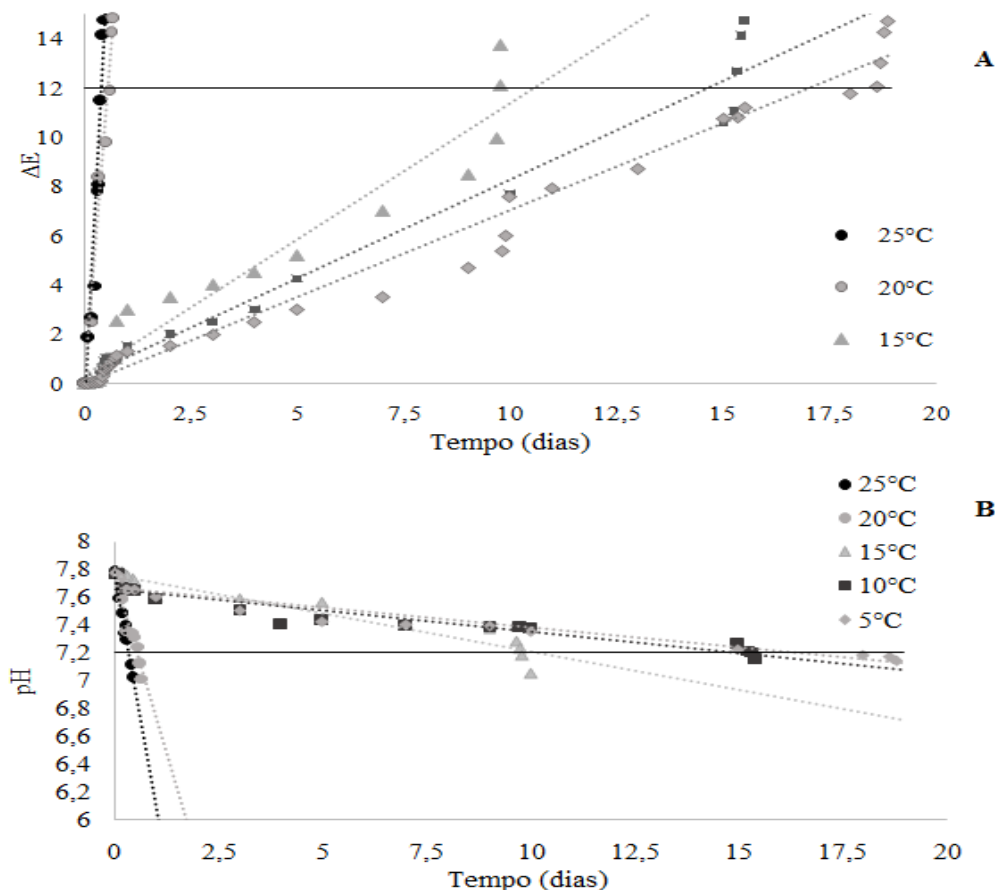
Em relação ao comportamento do indicador enzimático em relação à concentração de enzima, o sistema reacional contendo $20000 \mu\text{L.L}^{-1}$ de enzima apresentou alteração de pH de 7,80 para 5,27 e aspecto visual (verde para amarelo avermelhado) em 3 horas, já com $0,01 \mu\text{L.L}^{-1}$ a reação permaneceu por 9 dias sem alteração de cor e sem redução significativa de pH (7,75 - 7,21), quando mantida em temperatura de 5°C . A concentração inferior ($0,005 \mu\text{L.L}^{-1}$) foi insuficiente para provocar a reação de hidrólise do tributirina e conseqüente redução do pH e alteração da coloração. Desta forma a concentração de enzima definida para as etapas subsequentes foi de $0,01 \mu\text{L.L}^{-1}$.

A avaliação da influência das oscilações de temperatura do sistema reacional para leitura de pH e cor demonstrou que após 18 dias de reação, para as amostras de indicador enzimático mantidas em banho de gelo, o pH da amostra foi mantido acima de 7,20, efeito esse que não apresentou o mesmo comportamento quando a amostra foi conservada sem banho de gelo (pH de 5,90 em 18 dias), demonstrando que a exposição do sistema reacional à variações de temperatura mesmo por pouco tempo, provoca um efeito cumulativo e irreversível no resultado da reação (alteração da cor verde para amarelo).

3.2 Influência da temperatura sobre a cor do indicador enzimático

Após a definição da concentração enzimática ($0,01 \mu\text{L.L}^{-1}$) e condições de avaliação do indicador enzimático (banho de gelo), este foi armazenado em diferentes temperaturas, 5, 10, 15, 20 e 25°C , para determinar o comportamento cinético avaliando-se as mudanças no valor de ΔE^* e pH em função das temperaturas (Figura 2).

Figura 2 – Comportamento cinético do indicador de tempo e temperatura em função do ΔE^* (a) e pH (b) submetido a diferentes temperaturas.





As condições de temperaturas estudadas representam as condições empregadas na cadeia de distribuição de produtos frescos, desde o produtor até o consumidor final (Zhang et al., 2012; Limbo et al., 2010).

Na Figura 2 (a), $\Delta E = 12,0$ se refere à mudança perceptível de cor pelos consumidores, podendo ser observado uma redução progressiva no tempo de alteração da cor com o aumento da temperatura de armazenamento e redução drástica neste tempo, em armazenamento com abuso de temperatura (20 e 25 °C). Já na Figura 2 (b) o pH 7,2 indica o limite de variação do pH para manutenção da cor verde, com redução lenta de pH nas menores temperaturas de armazenamento e rápida redução quando armazenado entre 20 e 25 °C.

4. CONCLUSÕES

O indicador de tempo e temperatura enzimático colorimétrico desenvolvido com 0,01 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de enzima Calb L manteve-se estável durante aproximadamente 16 dias, armazenado a 5 °C. O indicador apresenta correlação entre aumento de temperatura e redução do tempo de estabilidade, mostrando-se aplicável em embalagens inteligentes de produtos refrigerados.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, CNPq, FAPERGS e URI pela concessão de bolsas e apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brizio, A. P. D. R., & Prentice, C. Development of an intelligent enzyme indicator for dynamic monitoring of the *shelf-life* of food products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 30, 208-217.
- Ellouze, M., & Augustin, J. C. (2010). Applicability of biological time temperature integrators as quality and safety indicators for meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 19-129.
- Francis, F. J. (1983). Colorimetry of food. pp. 105-124. In: *Physical Properties of Food*. Bagley EB (ed). AVI Publishing, Westport, UK.
- Galic, K., Sctetar, M., & Kurek, M. (2011). The benefits of processing and packaging e a review. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 127-137.
- Jaiswal, R. K., Mendiratta, S. K., Talukder, S., Soni, A. & Saini, B. L. (2018). Enzymatic time temperature indicators: A review. *The Pharma Innovation Journal*, 7, 10, 643-647.
- Kim, W., Park, E., & Hong, K. (2012). Development of a time-temperature integrator system using *Burkholderia cepacia* lipase. *Food Science and Biotechnology*, 21, 497-502.
- Kreyenschmidt, J., Christiansen, H. A., Hubner, V. R. & Petersen, B. (2010). A novel photochromic time-temperature indicator to support cold chain management. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 208-215.
- Limbo, S., Tori, L., Sinelli, N., Franzetti, L., & Casiraghi, E. (2010). Evaluation and predictive modeling of shelf life of minced beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaging at different temperatures. *Meat Science*, 84, 129-136.
- Mai, N. T. T., Gudjónsdóttir, M., Lauzon, H. L., Sveinsdóttir, K., Martinsdóttir, E., Audorff, H., et al. (2011). Continuous quality and shelf life monitoring of retail-packed fresh cod loins in comparison with conventional methods. *Food Control*, 22, 1000-1007.
- Man, C. M. D. (2016). 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.
- Mijanur R. A., Kim, D. H., Jang, H. D., Yang, J. H., & Lee, S. J. (2018). Preliminary Study on Biosensor-Type Time-Temperature Integrator for Intelligent Food Packaging. *Sensors* (Basel, Switzerland), 18(6), s1949.
- Reichert, H., Simmendinger, P., Bolle, T. (2006). Enzyme-based time temperature indicator. Ciba Specialty Chemicals Holding Inc. Patent n° WO2006015961 A2.
- Robertson, G.L. (2013). *Food packaging: principles and practice*. 3 ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, p.414-420.

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

Taoukis, P. S. (2008). *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.

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

Wu, D., Hou S., Chen, J., Sun, Y., Ye, X., Liu, D., Meng, R., & Wang, Y. (2015). Development and characterization of an enzymatic time-temperature indicator (TTI) based on *Aspergillus niger* lipase. *LWT - Food Science and Technology*, 60, 1100-1104.

Zhang, Q. Q., Han, Y. Q., Cao, J. X., Xu, X. L., Zhou, G. H., & Zhang, W. Y. (2012). The spoilage of air-packaged broiler meat during storage at normal and fluctuating storage temperatures. *Poultry Science*, 91, 208–214.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br