

PQI 2000 – Trabalho de Conclusão de Curso

Determinação da Cinética de Inativação Térmica dos Indicadores de Fosfatase, Peroxidase e Lactoperoxidase em Tratamentos Térmicos Descontínuos

Agosto / 2010

Aluno: André Shiguedo Yamashita
Orientador: Jorge A. W. Gut

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida e à FAPESP pelo apoio na realização dos ensaios.

RESUMO

Este trabalho visa verificar a viabilidade de utilização de indicadores enzimáticos na avaliação de tratamentos térmicos de pasteurização. Para isto, foi proposto representar a cinética de inativação destes indicadores por um modelo de dois componentes, com inativação de primeira ordem. Os parâmetros deste modelo, z_1 e $D_{1,Tref}$ e z_2 e $D_{2,Tref}$, devem ser ajustados para cada indicador proposto. O ajuste é feito por minimização do erro quadrático entre valores de atividade residual dos indicadores, após passar por tratamento térmico descontínuo, medidos experimentalmente com método reflectométrico e valores de erro quadrático calculados segundo o modelo proposto, à partir das curvas de temperatura registradas durante o tratamento térmico. Após a etapa de ajuste dos parâmetros, os modelos obtidos devem ser validados, ou seja, o padrão de espalhamento observado nos gráficos de atividade residual calculada e experimental nos ensaios de ajuste deve se repetir no ensaio de validação, realizado em regime descontínuo, com aquecimento lento. Inicialmente, foram realizados testes de modo a definir o melhor material a ser usado nos ensaios de ajuste e validação. A partir destes testes, definiu-se o termopar a ser usado nos ensaios, os recipientes tipo embalagem plástica para ensaios de ajuste e tipo tubo pirex para ensaios de validação, o veículo dos indicadores como solução de tampão fosfato pH 6,6, força iônica 50 mM. Os indicadores ALP (Fosfatase), POD (Peroxidase) e LPO (Lactoperoxidase) foram ajustados, entretanto o indicador LPO foi descartado antes da fase de validação, pois apresenta alto custo, alta dispersão no gráfico de atividade residual experimental x atividade experimental calculada, o indicador POD foi descartado na etapa de validação pois apresenta distribuição dos pontos no gráfico de atividade residual experimental x atividade residual calculada diferente quando comparado à etapa de ajuste. O indicador ALP tem potencial de utilização, pois passou na etapa de validação. Seu custo é de U\$ 0,04 por litro de solução, desconsiderando o custo do solvente (tampão).

Conteúdo

AGRADECIMENTOS	
RESUMO	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos do Trabalho	2
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Equacionamento do Tratamento Térmico	4
2.1.1 Cinética	4
2.1.2 Influência da Temperatura na Constante Cinética	4
2.1.3 Efeito do Perfil Tempo x Temperatura	5
2.2 Métodos de Avaliação de um Tratamento Térmico	6
2.2.1 Método <i>in situ</i>	6
2.2.2 Método Matemático	6
2.2.3 Integradores Tempo Temperatura	7
2.3 Características dos TTIs	7
2.3.1 Equacionamento da cinética de um TTI	7
2.3.2 Classificação dos TTIs	9
2.4 Processos de Tratamento Térmico para Leite	11
2.4.1 Pasteurização	12
2.4.2 Esterilização	12
2.4.3 Considerações Sobre o Impacto dos Tratamentos Térmicos	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 Sistema de aquisição de temperatura	14
3.2 Escolha do Veículo dos indicadores	15
3.3 Indicadores Utilizados	15
3.3.1 Indicador peroxidase	16
3.3.2 Indicador fosfatase	16
3.3.3 Indicador lactoperoxidase	16
3.4 Determinação da atividade experimental	16
3.5 Recipiente usado para as amostras	17
3.5.1 Tubos de vidro	18
3.5.2 Tubos em U	18
3.5.3 Embalagens plásticas	18
3.6 Banho térmico	18

3.7 Tratamento térmico descontínuo	19
3.8 Ensaio descontínuo lento	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Sistemas de aquisição de temperatura	22
4.2 Calibração dos Termopares.....	23
4.3 Veículo dos Indicadores	23
4.4 Recipiente	24
4.5 Tratamento Térmico	26
4.5.1 Indicador de peroxidase	27
4.5.2 Indicador de fosfatase	30
4.5.3 Indicador de lactoperoxidase.....	35
4.6 Tratamento Térmico Descontínuo Lento.....	38
4.6.1 Indicador de fosfatase	38
4.6.2 Indicador de peroxidase	41
5. CONCLUSÕES	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
7. ANEXO 1.....	50

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: DIAGRAMA GERAL DE CLASSIFICAÇÃO DE TTIS (VAN LOEY, ET AL. 1996)	10
FIGURA 2: SISTEMAS DE AQUISIÇÃO USADOS. A) NI-DAQ LIGADO A UM PC, B) TERMÔMETRO DIGITAL TH-060, C) SENSOR DO SISTEMA DAQ, D) SENSOR DO SISTEMA TH-060	15
FIGURA 3: USO DO SISTEMA REFLECTOQUANT PARA QUANTIFICAÇÃO DE LPO: A) REFLETÔMETRO COM RESULTADO DE ATIVIDADE E ALGUMAS TIRAS USADAS; B) REAGENTES E TIRAS ANTES E APÓS USO.....	17
FIGURA 4: RECIPIENTES TESTADOS COM SENSOR DE TEMPERATURA POSICIONADO. A) TUBO DE VIDRO, B) TUBO EM U, C) EMBALAGEM PLÁSTICA.....	18
FIGURA 5: TESTE DE AQUECIMENTO PARA TUBOS EM U. SISTEMA TH.....	19
FIGURA 6: TEMPO DE RESPOSTA DOS SISTEMAS DE AQUISIÇÃO.....	22
FIGURA 7: CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS TERMOPARES.....	23
FIGURA 8: ATIVIDADE DA ALP EM DIFERENTES AMOSTRAS AO LONGO DOS DIAS DE ARMAZENAMENTO A 5 °C	24
FIGURA 9: TESTES DE AQUECIMENTO COM 60 S DE MERTGULHO. SISTEMA TH, 3 ML DE ÁGUA, DIFERENTES RECIPIENTES	25
FIGURA 10: TESTES DE AQUECIMENTO COM 30 S DE MERTGULHO. SISTEMA TH, 3 ML DE ÁGUA, EMBALAGENS PLÁSTICAS ABERTAS E SELADAS	26
FIGURA 11: EMBALAGEM DE PLÁSTICO SELADA.....	26
FIGURA 12: EXEMPLO DE CURVAS DE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO DO INDICADOR DE PEROXIDASE. T=60°C, DIFERENTES T	27
FIGURA 13: PARIDADE DO AJUSTE DOS DADOS EXPERIMENTAIS E CALCULADOS	29
FIGURA 14: GRÁFICO DA CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DO INDICADOR DE PEROXIDASE, DE ACORDO COM O MODELO CINÉTICO AJUSTADO	30
FIGURA 15: CONFIGURAÇÃO DA BANCADA PARA ENSAIO DESCONTÍNUO DO INDICADOR ALP ..	31
FIGURA 16: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE RESIDUAL EXPERIMENTAL. TIRAS EM REAÇÃO ..	32
FIGURA 17: TIRAS USADAS.....	32
FIGURA 18: PARIDADE DAS ATIVIDADES RESIDUAIS CALCULADAS E EXPERIMENTAIS DO INDICADOR FOSFATASE	34
FIGURA 19: CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DO INDICADOR DE FOSFATASE, DE ACORDO COM O MODELO CINÉTICO AJUSTADO	35
FIGURA 20: PARIDADE DAS ATIVIDADES RESIDUAIS CALCULADAS E EXPERIMENTAIS DO INDICADOR LACTOPEROXIDASE	37
FIGURA 21: CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DO INDICADOR DE LACTOPEROXIDASE, DE ACORDO COM O MODELO CINÉTICO AJUSTADO	38
FIGURA 22: TRATAMENTO TÉRMICO DESCONTINUO LENTO	39
FIGURA 23: PARIDADE DO INDICADOR DE ALP EM ENSAIO DESCONTÍNUO LENTO	40
FIGURA 24: DESVIO DA ATIVIDADE RESIDUAL CALCULADA PARA O INDICADOR DE ALP EM ENSAIO DESCONTÍNUO LENTO	40
FIGURA 25: PARIDADE DO INDICADOR DE POD EM ENSAIO DESCONTÍNUO LENTO, ENSAIO REALIZADO EM DEZ/2009	43
FIGURA 26: PARIDADE DO INDICADOR DE POD EM ENSAIO DESCONTÍNUO LENTO, ENSAIO REALIZADO EM JUL/2010.....	44
FIGURA 27: RESUMO DOS RESULTADOS DO AJUSTE DE PARÂMETROS CINÉTICOS PARA OS TRÊS INDICADORES ESTUDADOS	46
FIGURA 28: COMPARAÇÃO DAS CINÉTICAS DE INATIVAÇÃO DOS TRÊS INDICADORES, DE ACORDO COM OS MODELOS CINÉTICOS AJUSTADOS, EM 85°C	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: FUNÇÕES DE RESPOSTA DO TTI SEGUNDO A ORDEM DE REAÇÃO (HENDRICKX ET AL, 1992)	8
TABELA 2: TEMPOS DE TRATAMENTO TÉRMICO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DA ATIVIDADE RESIDUAL DA ENZIMA LPO.....	20
TABELA 3: CONDIÇÕES PARA ENSAIO DESCONTÍNUO LENTO.....	21
TABELA 4: CONDIÇÕES DE ENSAIO DO INDICADOR DE PEROXIDASE.....	27
TABELA 5: A/AO EXPERIMENTAL E CALCULADO PARA OS DIFERENTES ENSAIOS DO INDICADOR PEROXIDASE.....	28
TABELA 6: PARÂMETROS AJUSTADOS PARA INDICADOR DE PEROXIDASE.....	29
TABELA 7: A/AO EXPERIMENTAL E CALCULADO PARA OS DIFERENTES ENSAIOS DO INDICADOR FOSFATASE.....	33
TABELA 8: PARÂMETROS CINÉTICOS AJUSTADOS DO INDICADOR FOSFATASE.....	34
TABELA 9: ATIVIDADES RESIDUAIS EXPERIMENTAIS E CALCULADAS DO INDICADOR DE LACTOPEROXIDASE EM DIFERENTES CONDIÇÕES.....	36
TABELA 10: PARÂMETROS DA CINÉTICA DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DO INDICADOR DE LACTOPEROXIDASE.....	36
TABELA 11: RESULTADOS DO ENSAIO DESCONTÍNUO LENTO PARA O INDICADOR DE ALP.....	41
TABELA 12: RESULTADOS DO ENSAIO DESCONTÍNUO LENTO PARA O INDICADOR DE POD, ENSAIO REALIZADO EM DEZ/2009.....	42
TABELA 13: RESULTADOS DO ENSAIO DESCONTÍNUO LENTO PARA O INDICADOR DE POD, ENSAIO REALIZADO EM JUL/2010.....	43
TABELA 14: RESUMO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DOS TRÊS INDICADORES.....	47

1. INTRODUÇÃO

Os métodos de conservação usados em alimentos vêm se tornando cada vez mais complexos. Este fato decorre por vários motivos: (1) os consumidores estão cada vez mais exigentes quanto à qualidade e segurança do produto final, (2) os produtores buscam processos cada vez mais eficientes e (3) órgãos de que regulam a qualidade de alimentos comercializados vêm se tornando cada vez mais exigentes.

Devido à quantidade crescente de exigências na qualidade e segurança dos produtos finais, os processos empregados no tratamento dos alimentos também estão evoluindo. Atualmente, processos como tratamentos térmicos descontínuos em autoclave rotativa, trocadores com unidades assépticas, unidades de processamento mínimo, aquecimento ôhmico, aquecimento por microondas e combinações de vários tipos de tratamento como calor e pressão alta são cada vez mais comuns (Dinnela C., et al, 2004).

Para que as novas tecnologias sejam implementadas e possam ser usadas de uma forma economicamente viável, atendendo as especificações dos órgãos de controle de qualidade e principalmente as exigências do consumidor, esses processos devem poder ser avaliados, preferencialmente de forma fácil e rápida.

A avaliação de um tratamento térmico passa pela determinação do impacto que o mesmo tem nos fatores de qualidade (propriedades físicas, cor, sabor, teor nutricional) e/ou nos fatores de segurança (microorganismos patogênicos, deterioradores e seus esporos) do alimento em questão.

Para tal avaliação, há três ferramentas: métodos *in situ*, métodos matemáticos e avaliação por indicadores.

A avaliação de tratamentos térmicos pelo método *in situ* envolve a medida direta de um parâmetro específico, antes e depois do processo. Embora este método forneça uma resposta precisa, já que a medida tomada é diretamente a variação do atributo alvo, ela pode ser cara e demorada. Além do mais, muitas vezes as ferramentas analíticas utilizadas não tem a precisão necessária para realizar as medidas necessárias (Claeys, et al, 2002).

A avaliação dos tratamentos térmicos pelo método matemático consiste na determinação do impacto do tratamento a partir de dados cinéticos dos atributos de segurança ou qualidade monitorados e do perfil de temperatura do processo. Tal perfil pode ser obtido pelo acompanhamento direto da temperatura, por exemplo, pela introdução de um termopar no alimento, mas, muitas vezes é obtido de forma indireta, pelo modelamento matemático do processo (Claeys, et al).

Dependendo do processo, é impossível o acompanhamento direto da temperatura com as técnicas usadas atualmente. A modelagem matemática do perfil de temperatura é feita por softwares especializados, entretanto, são necessários alguns parâmetros de entrada para o cálculo, como propriedades físico-químicas do produto e características da transferência de energia e massa. Inicialmente as técnicas de modelamento matemático eram bastante limitadas, pois partiam das definições teóricas e, portanto, não podiam ser usadas para prever situações diferentes da qual os dados foram obtidos (Claeys, et al, 2002).

Visando contornar esta deficiência, foram criados os modelos empíricos para a predição do impacto do tratamento térmico, mas este também estava limitado pela qualidade e precisão dos parâmetros de entrada. Além do mais, tais modelos não são indicados para modelar a convecção natural em alimentos líquidos sem agitação e tendem a superdimensionar o tratamento térmico (Hendrickx *et al.*, 1995).

As limitações intrínsecas dos métodos anteriores impulsionaram o desenvolvimento do terceiro método para avaliação de tratamentos térmicos: o uso de indicadores. Estes indicadores devem cumprir uma série de requisitos, podem ter natureza diversa e princípios de atuação variados. Serão tratados como Time-Temperature Integrators, ou Integradores Tempo-Temperatura (TTI).

O tratamento térmico de alimentos é dividido basicamente em duas categorias, de acordo com o impacto causado pelo mesmo. São elas (1) pasteurização e (2) esterilização. Seu objetivo é destruir ou pelo menos impedir o crescimento de microorganismos patogênicos e deterioradores e seus esporos. A carga final de microorganismos no alimento depende, além do tipo e eficiência do tratamento térmico empregado, da carga inicial de microorganismos e do tempo de armazenamento.

Na pasteurização, costuma-se utilizar um tratamento térmico mais brando e outra medida para controle biológico, como a acidificação do meio, refrigeração, adição de inibidores ao meio ou a diminuição da atividade de água. Este processo tem como objetivo principal eliminar microorganismos vegetativos e garantir uma vida de prateleira relativamente curta em condições especiais de armazenamento.

Já nos tratamentos de esterilização, o objetivo principal é eliminar microorganismos vegetativos e também seus esporos, que tem resistência térmica muito maior. Estes processos costumam ser realizados em temperaturas maiores e em intervalos de tempo menores.

Sendo o leite um meio bastante nutritivo, constituído de 81,3% de água, 4,2% de gordura, 4,6% de lactose 3,25% de proteínas e 0,65% de minerais (Claeys, *et al.*, 2002), torna-se necessário que o mesmo passe por um tratamento térmico para que possa ser consumido com segurança.

1.1 Objetivos do Trabalho

Este trabalho tem como objetivo ajustar e validar a cinética de inativação de três indicadores enzimáticos, segundo o modelo de inativação de primeira ordem com dois componentes, descrito pela Equação 4 (MURASAKI-ALIBERTI, N.C., *et al.*, 2009).

O ajuste do modelo foi feito usando medidas de atividade residual enzimática usando método reflectométrico. Durante o tratamento térmico das amostras, o perfil de temperatura das mesmas foi registrado por termopar digital, e os dados foram usados para o cálculo da letalidade de cada tratamento. Este valor foi usado para o cálculo da atividade residual calculada de cada tratamento.

Os parâmetros do modelo foram ajustados minimizando o erro quadrático entre os valores de atividade residual experimentais e calculados. Ensaios de validação foram realizados para verificar a adequação do ajuste dos parâmetros.

Para que a parte experimental pudesse ser realizada, foi necessária uma etapa preparatória onde os instrumentos e materiais a serem usados nos ensaios foram testados e avaliados. Esta etapa preparatória também está descrita neste trabalho.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Equacionamento do Tratamento Térmico

Para determinar o impacto de um tratamento térmico em um atributo de qualidade ou de segurança do alimento ou no TTI usa-se uma série de equações que relacionam a cinética de alteração desses atributos com o tratamento térmico em si.

2.1.1 Cinética

É comum usar o modelo de cinética de primeira ordem para morte de microorganismos e destruição de nutrientes. Este modelo pode ser apresentado pela Equação 1:

$$N = N_0 \exp(-kt) \quad (1.a)$$

onde N é a carga do atributo no tempo t, N_0 é a carga inicial do atributo analisado e k é a constante cinética da reação, com unidade de tempo^{-1} . Entretanto, nas áreas da engenharia de alimentos e farmacêutica, é comum adotar os parâmetros D_T , tempo de redução decimal, invés de k. Este parâmetro representa o tempo em um processo isotérmico à temperatura T que reduz a carga do atributo em 90%.

$$D_T = \frac{\ln(10)}{k} \quad (1.b)$$

$$N = N_0 10^{\frac{F_T}{D_T}} \quad (1.c)$$

Na Eq. (1.c), F_T é o tempo necessário de tratamento à temperatura T para reduzir a carga do atributo em questão de N a N_0 . Desvios na cinética de primeira ordem podem ocorrer, em casos de acoplamento de microorganismos, heterogeneidade, resistências térmicas diferentes, ativações e inativações simultâneas (fatores de segurança) presença de isoenzimas e impurezas (fatores de qualidade). Neste caso, os desvios são tratados por modelos de primeira ordem simultâneos e independentes (Hendrickx *et al.*, 1995).

2.1.2 Influência da Temperatura na Constante Cinética

A constante cinética k pode ser afetada por diversos fatores: pH, composição do meio, atividade de água ou temperatura. Embora cada um destes fatores exerça um tipo de influência que deve ser considerado para avaliação precisa da constante cinética de inativação, em tratamentos térmicos, que são o foco deste estudo, todos os outros fatores fora a temperatura são mantidos constantes. Existem duas abordagens utilizadas para representar a influência da temperatura na constante cinética: (1) modelo de Bigelow ou (2) modelo de Arrhenius.

O modelo de Bigelow, ou da letalidade (TDT, Thermal Death Time) introduz o parâmetro z, que dá a variação necessária na temperatura absoluta para uma redução de 90% no valor de D_T , segundo a Equação 2.a.

$$D_T = D_{T_{ref}} 10^{\frac{T_{Ref}-T}{z}} \quad (2.a)$$

Já o modelo de Arrhenius relaciona dois valores de k diferentes com o inverso da temperatura, medida em Kelvin, segundo a equação 2.b.

$$k_T = k_{T_{ref}} \exp \left[\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T} \right) \right] \quad (2.b)$$

onde k_T $k_{T_{ref}}$ são as constantes cinéticas na temperatura T e na temperatura de referência T_{ref} , E_a é a energia de ativação e R é a constante universal dos gases (R=8,314 J/mol K).

Ambas as equações podem ser reduzidas a uma equação genérica

$$\ln(k) = C_1 + C_2 T^m \quad (2.c)$$

onde C_1 e C_2 são constantes e m é 1 para o modelo TDT e -1 para o modelo de Arrhenius.

Pode-se então definir uma relação entre z e E_a

$$z = \frac{\ln(10)RTT_{ref}}{E_a} \quad (2.d)$$

A partir da Equação (2.d) conclui-se que a relação entre z e E_a não é linear e depende da temperatura T, portanto também não é constante para um tratamento térmico não isotérmico.

A escolha do modelo a ser utilizado depende dos dados cinéticos previamente disponíveis na literatura. É muito mais comum, para microorganismos e nutrientes estarem disponíveis os valores D e z, enquanto para reações químicas, é mais comum encontrar valores de k e E_a .

2.1.3 Efeito do Perfil Tempo x Temperatura

O cálculo do tempo equivalente de um processo isotérmico a uma temperatura de referência para um atributo qualquer em um processo não-isotérmico com perfil de temperatura T(t) é:

$$zF_{T_{ref}} = \int_0^t L dt = \int_0^t 10^{\frac{T-T_{ref}}{z}} dt \quad (3.a)$$

onde L é o fator de letalidade do processo e $zF_{T_{ref}}$ é o tempo de tratamento equivalente à T_{ref} que fornece o mesmo impacto térmico no atributo com o valor z nas condições do tratamento real.

$$E_a F_{T_{ref}} = \int_0^t L dt = \int_0^t 10^{\left(\frac{E_a}{2.303R}\right)\left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T}\right)} dt \quad (3.b)$$

As equações 3 a e b limitam-se a calcular o tempo de tratamento em um ponto único do espaço, ou seja, válido para T uniforme no espaço. Caso seja necessário o valor do tempo de tratamento em diferentes pontos do produto, para o cálculo do impacto mássico médio, por exemplo, deve-se calcular o tempo de tratamento em vários pontos e integrar no espaço.

Neste trabalho, o ajuste dos dados obtidos será feito com o modelo de Bigelow, admitindo cinética de primeira ordem na inativação das enzimas e admitindo o modelo de dois componentes, sendo α a fração de isoenzima mais resistente ao tratamento térmico. Este modelo pode ser representado pela equação:

$$AR = \alpha \cdot \left[\text{alog} \left(\frac{\int_0^{\infty} \text{alog} \left(\frac{T_{ref} - T}{z_1} \right) dt}{D_{1,ref}} \right) \right] + (1 - \alpha) \cdot \left[\text{alog} \left(\frac{\int_0^{\infty} \text{alog} \left(\frac{T_{ref} - T}{z_2} \right) dt}{D_{2,ref}} \right) \right] \quad (4)$$

onde AR é a atividade residual da enzima, α a fração de isoenzima resistente, z_1 e $D_{1,Tref}$ e z_2 e $D_{2,Tref}$ os parâmetros cinéticos (MURASAKI-ALIBERTI, N.C. et al, 2009).

2.2 Métodos de Avaliação de um Tratamento Térmico

Métodos visando a avaliação de tratamentos térmicos são divididos em três categorias: avaliação *in situ*, avaliação por modelagem matemática e avaliação com indicadores. Cada um desses métodos tem suas vantagens e desvantagens, entretanto, o uso de indicadores vem ganhando grande destaque de aplicação em processos mais elaborados, onde os métodos *in situ* e matemático não podem ser aplicados.

2.2.1 Método *in situ*

Consiste na medida direta do atributo alvo antes e depois do processo térmico. Pode ser usado para diversos tipos de atributo, como avaliação de conteúdo nutricional, avaliação sensorial, avaliação de coloração e análise de risco para carga microbiana.

Apesar do resultado obtido com esta análise fornecer o valor do atributo desejado diretamente, de forma precisa, o método tem algumas limitações. A medida dos parâmetros de qualidade pode estar além dos limites de detecção dos instrumentos convencionais, exigindo instrumentos específicos de custo elevado. Dependendo do atributo tratado, o tamanho da amostra necessária pode ser grande de mais, tornando a análise inviável.

Técnicas de determinação de população de microorganismos geralmente são demoradas e caras, tornando o processo inviável para checagens de rotina (Hendrickx et al., 1995).

2.2.2 Método Matemático

Tendo a disposição os parâmetros cinéticos do atributo a ser analisado, que podem ser retirados da literatura ou determinados para as condições específicas por meio de ajuste matemático e o perfil tempo x temperatura que o alimento é submetido durante o processamento térmico, o impacto causado pelo mesmo no atributo alvo pode ser calculado usando, por exemplo, a Equação (3.a).

Entretanto, muitas vezes não é viável fazer o acompanhamento da temperatura durante o processo térmico. Nestas situações, costuma-se reconstituir o perfil à partir de propriedades do alimento, características do escoamento e propriedades do meio de aquecimento. Alguns parâmetros que podem ser citados são: condutividade térmica, capacidade térmica, fator de aquecimento, fator de lag, viscosidade, coeficiente de troca térmica, velocidade de escoamento, fluídos de aquecimento e resfriamento.

A falta de precisão na estimativa dos parâmetros limita a aplicação deste método.

2.2.3 Integradores Tempo Temperatura

Integradores Tempo Temperatura, ou TTIs, são indicadores que quantificam o impacto de um tratamento térmico sobre algum outro atributo, ao serem submetidos ao mesmo processo que o atributo em questão. Pode fornecer resultados qualitativos ou quantitativos por sofrerem uma alteração irreversível e mensurável durante ou após o tratamento térmico.

Processos que envolvem outras variações fora a temperatura, como variações na pressão ou em outro parâmetro de processo, requerem indicadores especiais, já que a aplicação de um único TTI não quantificaria o processo de maneira eficiente. Neste caso, costuma-se usar TTIs múltiplos ou ainda integradores especiais que respondem a outras variações de processo, como variações na pressão, por exemplo.

2.3 Características dos TTIs

Uma definição geral para TTI é: dispositivo físico, químico ou biológico que sofre uma mudança irreversível quando submetido a um tratamento térmico que pode ser quantificada e relacionada com as mudanças do atributo alvo, quando submetido ao mesmo tratamento térmico. (Van Loey *et al.*, 1996)

Para que um microorganismo, enzima, substância química ou outro indicador se qualifique para ser utilizado como o TTI de um processo térmico, deve atender uma série de exigências: (1) sua utilização deve ser fácil e rápida, (2) deve quantificar o impacto térmico em um parâmetro de qualidade ou segurança de um alimento, (3) deve ser fácil de recuperar, se for colocado em contato com o alimento, (4) deve fornecer uma leitura precisa e amigável e (5) deve atender alguns requisitos matemáticos, discutidos no próximo item.

2.3.1 Equacionamento da cinética de um TTI

Para que um TTI possa ser utilizado para quantificar o tratamento térmico em um atributo de qualidade ou segurança do alimento, a seguinte condição deve ser verificada:

$$(\text{z}F_{Tref})_{alvo} = (\text{z}F_{Tref})_{TTI} \quad (5.a)$$

onde $(\text{z}F_{Tref})_{alvo}$ é o tempo de tratamento a uma temperatura de referência para o atributo com certo z e $(\text{z}F_{Tref})_{TTI}$ é o tempo de tratamento para o TTI com seu z à uma temperatura de referência.

Considerando que a cinética do TTI apresente ordem n:

$$-\frac{dX}{dt} = k_x X^n \quad (5.b)$$

onde X é a atividade ou concentração do TTI em certo tempo t e k_x é a constante cinética da reação. Integrando (5.b) obtemos uma equação do tipo

$$f(X) = k_x t \quad (5.c)$$

onde f(X) é a resposta de TTI e varia de acordo com a ordem de reação n segundo a Tabela 1.

Tabela 1: Funções de resposta do TTI segundo a ordem de reação (Hendrickx et al, 1992).

Ordem da reação, n	Forma da resposta, f(X)
0	$X_0 - X$
1	$\ln(\frac{X_0}{X})$
n	$\frac{1}{n-1} (X^{1-n} - X_0^{1-n})$

Quando o TTI é submetido a um tratamento térmico temos:

$$f(X) = \int_0^t k_x dt \quad (5.d)$$

Como k_x se relaciona com a energia de ativação do modelo de Arrhenius segundo a equação (2.b), podemos combinar (2.b) e (5.d):

$$(zF_{Tref})_x = \frac{f(X)}{k_{x,Tref}} = \int_0^t \exp\left[\frac{E_{a,x}}{R}\left(\frac{1}{T_{Tref}} - \frac{1}{T}\right)\right] dt \quad (5.e)$$

Aplicando o mesmo equacionamento para um parâmetro de qualidade ou segurança, denotado pelo subscrito y, temos:

$$(zF_{Tref})_y = \frac{f(X)}{k_{y,Tref}} = \int_0^t \exp\left[\frac{E_{a,y}}{R}\left(\frac{1}{T_{Tref}} - \frac{1}{T}\right)\right] dt \quad (5.f)$$

E, portanto, conclui-se que só será observada a condição desejada para a equação (5.a), para uma situação onde $T \neq T_{Ref}$, quando

$$E_{a,x} = E_{a,y} \quad (5.g)$$

Um equacionamento semelhante pode ser feito para o modelo de D e z (Hendrickx et al, 1995), levando a:

$$z_x = z_y \quad (5.h)$$

Ou seja,

$$z_{TTI} = z_{alvo} \quad (5.i)$$

Não existem restrições matemáticas para o valor da constante cinética da reação (D ou k), entretanto, seu valor deve ser suficiente para que se garanta uma resposta mensurável no valor da atividade do indicador para a faixa de tempo e temperatura trabalhada. Este fato está relacionado com a estabilidade térmica do TTI.

Apesar da restrição matemática dada pelas Equações (5.i) e (5.g), algumas vezes são usados TTIs com valores z ligeiramente diferentes dos atributos alvo. Neste caso deve-se tomar cuidado com a interpretação dos resultados e principalmente com a extrapolação, para uso das constantes cinéticas D e k em faixas de temperatura nas quais estas não foram obtidas.

Se um atributo tiver um valor z tal que não exista nenhum TTI viável com o mesmo valor, usa-se preferencialmente TTIs com z maior que o do atributo alvo, para não existir o risco de subdimensionar o processo. Quanto menor for a diferença entre a temperatura do tratamento térmico e a temperatura de referência, maior é a tolerância da diferença entre os valores z do atributo alvo e do TTI. (Van Loey et al, 1996).

Algumas técnicas podem ser usadas para manipular valores de z e D dos TTIs como imobilização em matriz de polímero, alteração na concentração de alguma substância do meio ou mudança no pH. Tais técnicas vêm sendo bastante estudadas para viabilizar a aplicação de TTIs existentes em diferentes processos (Dinnella et al, 2004).

2.3.2 Classificação dos TTIs

TTIs podem ser classificados com base em diversos fatores: (1) princípio de atuação, (2) tipo de resposta, (3) origem, (4) aplicação e (5) localização. As principais categorias de classificação estão resumidas na Figura 1.

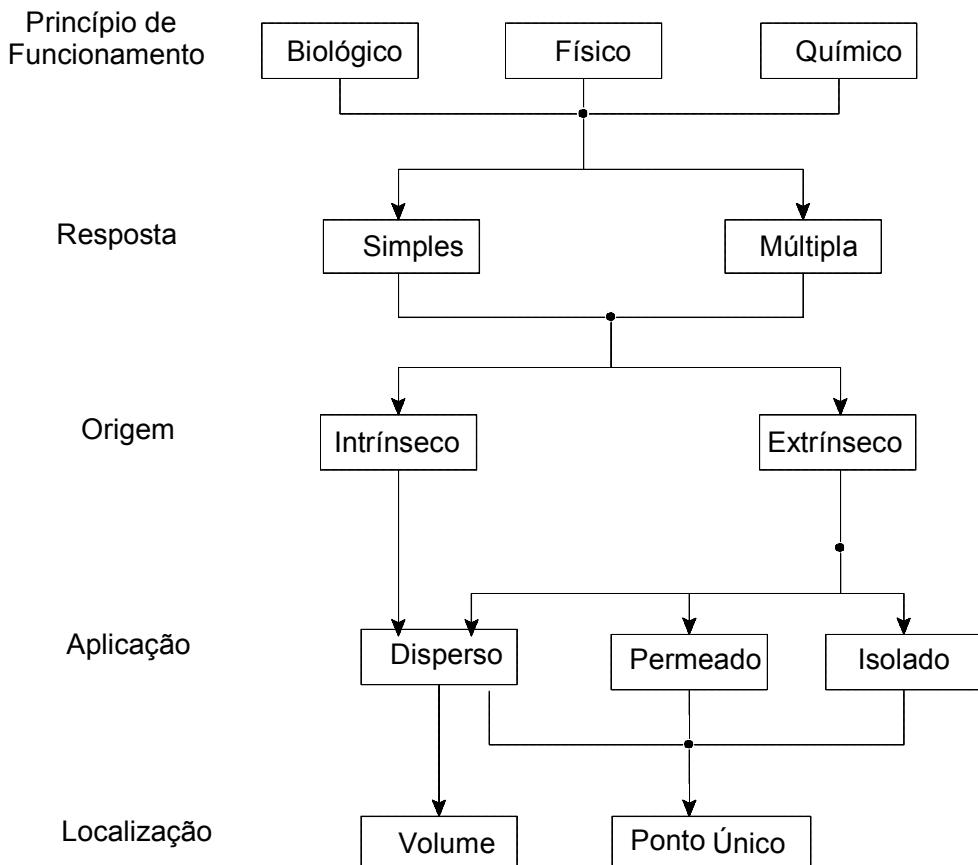


Figura 1: Diagrama geral de classificação de TTIs (Van Loey, et al. 1996).

1. Princípio de atuação: divide os TTI em (i) biológicos, (ii) químicos e (iii) físicos. TTIs biológicos são divididos ainda em microbiológicos e enzimáticos.

Processos que envolvem TTI microbiológicos são amplamente utilizados na indústria de alimentos, principalmente para avaliar processos de esterilização. Geralmente apresentam valor de z próximo ao atributo alvo, devido à semelhança. Os testes a serem realizados podem ser do tipo (1) redução de contagem, que fornece uma estimativa qualitativa e (2) mortos-sobreviventes, que consegue apenas dizer se o processo foi suficiente para o tratamento desejado ou não. Ambos os métodos são geralmente demorados, necessitam de técnicas analíticas avançadas, aparelhos de medição sensíveis e há o risco de recontaminação.

Processos enzimáticos apresentam várias vantagens. Tem execução relativamente mais fácil, o resultado pode ser usado para uma avaliação quantitativa do tratamento térmico, o uso de técnicas de engenharia genética e imobilização permitem manipular o valor de z . Muitas enzimas são termoresistentes ao ponto de serem usadas como indicadores em processos de pasteurização e esterilização, são relativamente baratas e fáceis de preparar. Já existem técnicas para medição de atividade enzimática e entalpia de reação que permitem uma medição rápida e precisa.

TTIs químicos são baseados apenas em respostas químicas. Técnicas analíticas de medida de concentração de certo componente permitem boa precisão e fácil manuseio. Entretanto,

poucas cinéticas de reação foram determinadas com energia de ativação próxima a de atributos de qualidade e nenhuma foi determinada para atributos de segurança (Van Loey *et al*, 1996).

TTIs físicos apresentam mecanismo de funcionamento diverso. Podem se basear, por exemplo, na medida da difusão de certo íon por uma membrana semipermeável (Van Loey *et al*, 1996).

2. Tipo de Resposta: divididos em TTIs de resposta única, onde os valores z do atributo e do TTI são iguais e, portanto, a alteração observada no TTI devido ao tratamento térmico é diretamente correlacionada com o que ocorre no atributo alvo ou de multi-resposta, onde outros fatores são necessários para correlacionar a variação do TTI com a variação do atributo alvo. Um caso interessante de aplicação é o uso de múltiplos TTIs para quantificar o impacto de um tratamento térmico em conjunto com uma variação brusca de pressão, por exemplo.

3. Origem: TTIs podem ser classificados em intrínsecos (naturais do alimento) ou extrínsecos (adicionado ao alimento) quanto a origem.

4. Aplicação: TTIs são divididos em três categorias segundo a aplicação: disperso, permeável e isolado.

TTIs dispersos são aqueles em contato direto com alimento. É necessária a calibração destes para cada aplicação, visto que o meio influencia bastante a resposta do TTI. Todos os TTIs do tipo intrínseco são dispersos.

TTIs permeáveis são aqueles que possibilitam alguma troca de material entre o alimento e o indicador, são encapsulados com algum material ou membrana que permite passagem de fluido. São facilmente identificáveis e podem ser recuperados. Também necessitam de calibração para cada processo, visto que também há contato com o meio.

TTIs isolados são aqueles encapsulados em um material inerte e isolante. Este material não deve ser um limitante para a troca térmica durante o tratamento já que o indicador deve ser submetido ao mesmo impacto térmico que o alimento. Neste tipo de aplicação não há a necessidade de calibração para variações de meios.

Os carregadores de TTIs permeáveis e isolados devem ser projetados de tal forma que não atrapalhem o fluxo do processo, devem passar pelo mesmo tempo de residência que o alimento e devem ter características físicas semelhantes às do alimento. (Van Loey *et al*, 1996)

5. Posicionamento: quanto ao posicionamento, os TTIs são classificados em volumétricos e pontuais. TTIs pontuais devem ser preferencialmente colocados no ponto crítico de processamento do alimento, ou seja, no ponto de aquecimento mais lento.

2.4 Processos de Tratamento Térmico para Leite

Os processos de tratamento térmico para leite são divididos basicamente em duas categorias: (1) tratamentos de pasteurização e (2) tratamentos de esterilização. Cada um deles tem um objetivo diferente e é conduzido em condições diferentes.

Entretanto, o objetivo geral de todo o tratamento térmico ou processo de conservação realizado em alimentos é eliminar microorganismos patogênicos e deteriorados de modo a

garantir o consumo seguro do produto, dadas as condições de armazenamento e prazo de validade, determinados de acordo com cada tipo de processo.

2.4.1 Pasteurização

Tratamentos térmicos de pasteurização em leite são conduzidos em condições mais brandas. Como consequência, o produto final tem menor vida de prateleira, deve ser armazenado sob refrigeração, mas apresenta valor nutricional superior, quando comparado ao produto do processo de esterilização.

Um valor típico de F_0 para tratamentos de pasteurização é 15s, considerando uma temperatura de referência de 85°C e um microorganismo com $z=10^{\circ}\text{C}$ (Claeys W.I., et al, 2002). Processos de pasteurização devem reduzir a quantidade de microorganismos patogênicos vegetativos a um nível seguro para o consumo.

No passado, o microorganismo *Mycobacterium tuberculosis* era o atributo de segurança alvo base dos processos de pasteurização. Atualmente, o atributo de segurança usado é o microorganismo *Coxiella burnetti*. Entretanto, é difícil encontrar dados cinéticos para esses dois microorganismos na literatura, então se costuma usar os dados do *Listeria monocytogenes*, que apresenta uma resistência térmica semelhante a dos microorganismos anteriores (Claeys et al, 2004).

Dentre as técnicas existentes para pasteurização esta a pasteurização HTST, do inglês High Temperature Short Time. Neste tratamento o leite passa por um processo térmico a 85-90°C por 15-20 segundos. Tais condições não são suficientes para destruição de esporos e enzimas deterioradoras de origem bacteriana (Claeys et al, 2002).

No Brasil, encontra-se leite pasteurizado pelo processo HTST de diversas marcas. Este produto deve ser armazenado sob refrigeração e o prazo de validade é de uma semana.

2.4.2 Esterilização

Processos de esterilização são aqueles com F_0 maior que três minutos. O atributo de segurança alvo desses processos é a inativação de esporos do microorganismo *Clostridium botulinum*, um dos agentes de contaminação mais perigosos nos processos alimentícios.

Este processo visa a destruição de todos os microorganismos, garantindo um produto comercialmente estéril, com maior tempo de prateleira e viabilidade de armazenamento sem refrigeração. Entretanto, observa-se acentuada perda de vitamina B1 e lisina, descoloração e desnaturação das proteínas do soro do leite.

Mesmo com a intensidade de um tratamento térmico de esterilização, alguns componentes indesejáveis estão presentes no produto final. Lípases e proteinases produzidas pela bactéria *Pseudomonas* spp. têm resistência ao calor muito alta e são responsáveis pela degradação do produto final, após o tratamento térmico (Claeys et al, 2004).

Dentre os diferentes processos de esterilização, o mais utilizado é o tratamento UHT, do inglês Ultra High Temperature. Neste tratamento, o leite é submetido a temperaturas de 135°C, por um segundo.

2.4.3 Considerações Sobre o Impacto dos Tratamentos Térmicos

A escolha do tratamento térmico ideal para um produto envolve o compromisso entre fatores de segurança e qualidade, assim como fatores financeiros. Principalmente três partes estão envolvidas na determinação e projeto do tratamento térmico.

Os consumidores estão cada vez mais exigentes quanto à qualidade do produto, considerando tanto o teor nutricional como os aspectos organolépticos como sabor, textura e aparência do produto final.

Órgãos de saúde pública como o FDA (Food and Drugs Administration) nos Estados Unidos ou o ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento no Brasil vem tornando as leis para segurança alimentícias cada vez mais severas.

Os produtores de leite, seja por processos de pasteurização ou por processos de esterilização buscam os processos mais econômicos e eficientes, visando ter maiores lucros com sua produção.

Levando em consideração cada um dos fatores citados a cima, assim como seu peso no processo, cabe aos engenheiros desenvolverem novos meios ou otimizarem os existentes para atender o compromisso entre qualidade, preço e segurança. Além de desenvolver e implantar os processos, também cabe aos engenheiros verificar se eles operam nas condições especificadas.

Tendo em vista a limitação dos métodos de avaliação *in situ* e de modelamento matemático para a avaliação de trocadores de calor e processos térmicos, surge a necessidade do aperfeiçoamento do uso de indicadores especiais, os TTIs, de modo que a verificação dos processos possa ser feita de forma rápida e eficiente e assim, as exigências dos consumidores, órgãos públicos e produtores possas ser atendidas no projeto do processo térmico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho tem como objetivo avaliar a cinética de inativação de três indicadores enzimáticos comerciais, em solução tampão de fosfato com pH ajustado para 6.6. Para isto, ensaios em tratamento térmico descontínuo serão realizados com amostras de cada um dos indicadores em tempos e temperaturas determinados.

O conjunto de dados obtido para cada indicador será usado para o ajuste numérico da equação (4), calculando os parâmetros α , Z_1 e $D_{1,Ref}$ e Z_2 e $D_{2,Ref}$ para cada indicador. O ajuste da equação (4) será feito pela minimização do erro quadrático entre os valores de atividade residual obtidas experimentalmente (AR_{exp}), por um método reflectométrico e valores de atividade residual calculados pela própria equação (AR_{calc}), partindo de uma estimativa inicial dos parâmetros.

Antes de iniciar os ensaios descontínuos, algumas verificações devem ser feitas para os materiais a serem utilizados. Devem-se ter todas as informações necessárias: (1) do carregador do indicador, no caso um meio líquido onde os indicadores possam ser dissolvidos, (2) da precisão dos equipamentos de medição utilizados, como termopares e termômetros, (3) das características do banho térmico, (4) das características dos indicadores, como por exemplo, sua atividade inicial e a diluição necessária para atingir uma atividade inicial que possa ser usada nos ensaios, assim como a viabilidade de armazenamento de soluções de tampão e indicador já prontas, (5) do recipiente usado nos ensaios descontínuos e como sua presença afeta a troca térmica entre o banho e o indicador.

Com os dados experimentais, compostos pela AR_{exp} e pelas curvas de tempo x temperatura em cada condição de tratamento térmico programada, pode-se fazer o ajuste dos parâmetros da equação (4) usando a ferramenta Solver do Microsoft Excel. A análise dos resultados é feita com gráficos de paridade e de atividade residual pelo tempo.

Estas últimas ferramentas nos permitem avaliar se o indicador em questão pode ser utilizado para prever o impacto de processamentos térmicos e as faixas de validade da previsão.

3.1 Sistema de aquisição de temperatura

No Laboratório de Engenharia de Alimentos, LEA, da Escola Politécnica, dois sistemas de aquisição de temperatura estão disponíveis: (1) DAQ e (2) TH. Estes sistemas foram testados para que fosse possível determinar quais dos dois era mais apropriado para uso no monitoramento da temperatura das amostras de indicador nos ensaios descontínuos.

DAQ: sistema National Instruments (EUA) DAQ AT E conectado a PC com software desenvolvido em linguagem LabView. Capacidade para 10 sensores de temperatura. Sensor termopar tipo K, formato de sonda com 8 cm de comprimento e diâmetro de 3 mm. Ver figuras 2a e 2c.

TH: termômetro digital Instrutherm (Brazil) TH-060 com data-logger interno. Capacidade de dois sensores de temperatura. Sensor: termopar tipo K, ponta exposta. Ver figuras 2b e 2d.

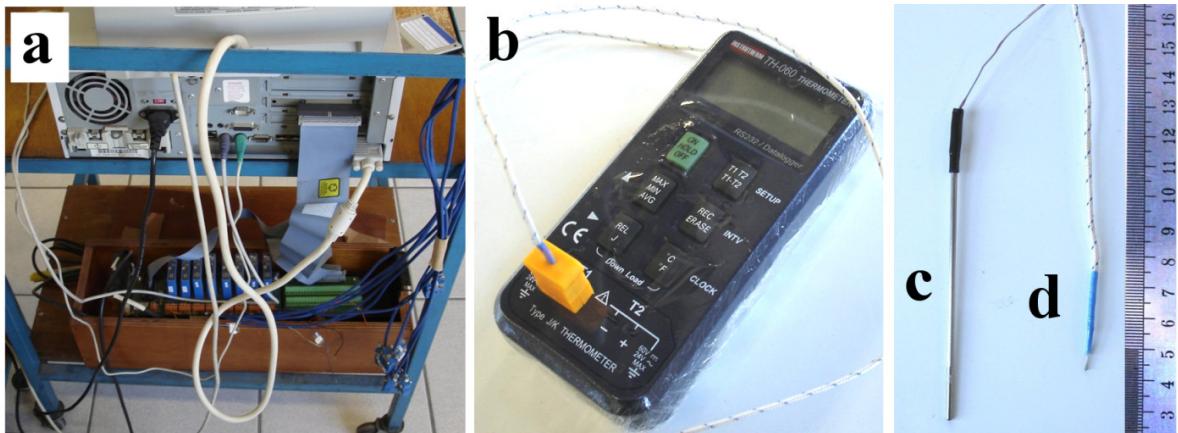


Figura 2: sistemas de aquisição usados. a) NI-DAQ ligado a um PC, b) Termômetro digital TH-060, c) sensor do sistema DAQ, d) sensor do sistema TH-060

Para verificar qual dos dois aparelhos apresenta o tempo de resposta mais rápido, os termopares foram submetidos a variações bruscas de temperatura, sendo mergulhados em banhos de água quente e, após a temperatura medida se estabilizar, em banhos de água com gelo.

Com os dados obtidos de temperatura pelo tempo, foram construídos gráficos que permitiram optar por um medidor com tempo de resposta mais rápido. Foi escolhido aquele cujo resultado fosse mais próximo do comportamento ideal.

Para a calibração dos termopares, foi usado um banho térmico ajustável para manter a temperatura constante e foram escolhidas 10 temperaturas diferentes, entre 0° a 100°. Um termômetro de mercúrio certificado foi usado como referência.

Com os dados obtidos, foram traçados gráficos de temperatura real x temperatura medida e as curvas de calibração dos termopares do instrumento de medida de temperaturas foram obtidas por ajuste linear.

As equações foram usadas para corrigir os valores de temperatura medidos durante os ensaios descontínuos.

3.2 Escolha do Veículo dos indicadores

Para que a atividade inicial e residual dos indicadores possa ser medida, esses devem estar em solução aquosa. Foram testados três meios para o indicador: leite UHT (Parmalat), leite em pó reconstituído (Itambé) 13% em água destilada e tampão fosfato.

Nos três casos, o pH do tampão fosfato (força 50 mM, preparado a partir de fosfatos mono- e di-básico de sódio) foi ajustado para 6,6 (Hayes, 1987).

3.3 Indicadores Utilizados

Neste trabalho, buscou-se ajustar os parâmetros da equação (4) para três indicadores: de fosfatase, de lactoperoxidase e de peroxidase. Esses indicadores consistem na dissolução de uma enzima reconstituída, de origem comercial, em um veículo apropriado.

3.3.1 Indicador peroxidase

Para a solução de estoque, foi diluído pó liofilizado de peroxidase de raiz forte (POD, EC 1.11.1.7, Sigma-Aldrich cód.P6782) em água destilada para obter a concentração de 100 mg/L e congelado a -30°C em alíquotas de 1,0 mL. Para a utilização nos ensaios, uma alíquota estoque foi diluída em tampão fosfato (pH 6,6, força 50 mM, preparado a partir de fosfatos mono- e di-básico de sódio) para obter a concentração de 1,0 mg/L e conservado a 5°C.

3.3.2 Indicador fosfatase

Para solução de estoque, foi diluído pó liofilizado de fosfatase alcalina de mucosa intestinal bovina (ALP, EC 3.1.3.1, Sigma-Aldrich cód.P7640) em tampão fosfato (pH 6,6, força 50 mM) para obter concentração de 250 mg/L e conservado a +5 °C. Para o uso, o estoque foi diluído em tampão fosfato para obter concentração de 0,38 mg/L (uma gota para 40 mL de tampão) e conservado a +5 °C.

3.3.3 Indicador lactoperoxidase

Para a solução estoque, foi diluído pó liofilizado de lactoperoxidase do leite bovino (LPO, EC 232-688-6, Sigma-Aldrich cód.L8257) em água destilada para obter a concentração de 833 mg/L e conservado a -30°C. Para o uso, alíquotas do estoque foram descongeladas e diluídas em tampão fosfato (pH 6,6, força 50 mM) para obter uma concentração de 20,8 mg/L e conservado a +5°C.

3.4 Determinação da atividade experimental

A atividade residual dos indicadores foi medida por método reflectométrico, usando o aparelho RQflex (Merck). Para a medição da atividade, é usado um kit com reagentes e tiras especiais. Cada tipo de enzima tem seu kit e procedimento específicos, mas o aparelho que faz as medidas pode ser usado para diferentes enzimas.

Foram usados os kits para determinação de Fosfatase alcalina em leite e Lactoperoxidase em leite. Como o aparelho de medidas e os kits adquiridos foram calibrados para medir a atividade de enzimas em leite, valores relativos de atividade foram adotados, para a comparação com os resultados teóricos. A atividade residual medida, ou experimental, é dada pela equação (6)

$$AR_{exp} = \frac{A - A_{branco}}{A_0 - A_{branco}} \quad (6)$$

onde A_{branco} é a atividade registrada por uma tira apenas com tampão fosfato, usado como fundo de escala, A_0 é a atividade inicial do indicador, antes do tratamento térmico e A é a atividade depois do processo térmico.

Devido a falta de reprodutibilidade intrínseca da medida da atividade, foram feitas medidas em triplicata de A_0 para cada conjunto de ensaio e medidas em triplicata de A_{branco} para cada kit adquirido.

A Figura 3.a mostra o RQflex e algumas tiras usadas. A Figura 3.b mostra os reagentes usados na determinação da atividade do indicador LPO, uma tira nova e uma tira usada.

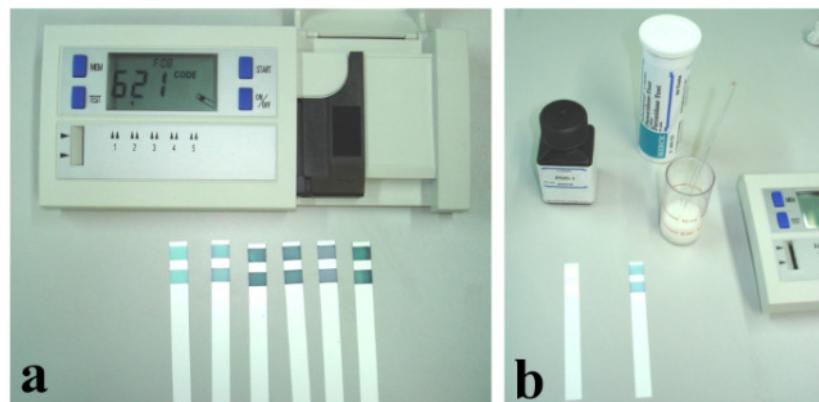


Figura 3: Uso do sistema Reflectoquant para quantificação de LPO: a) refletômetro com resultado de atividade e algumas tiras usadas; b) reagentes e tiras antes e após uso.

Os procedimentos para determinação da atividade enzimática pelo método reflectométrico foram descritos pelo fabricante dos kits. Os procedimentos foram seguidos adaptados para uso com os indicadores propostos. Especificações de tempo e temperatura foram seguidas para que os resultados pudessem ser significativos e reprodutíveis.

Os procedimentos detalhados podem ser encontrados no Anexo 1.

3.5 Recipiente usado para as amostras

Uma característica fundamental do recipiente é não interferir significantemente no transporte de energia. Com este objetivo em mente, foram testados três tipos de recipiente: (1) tubos de ensaio de vidro com tampa, (2) tubos de vidro em 'U' e (3) embalagens plásticas. Pode-se ver os diferentes recipientes na figura 4. Os recipientes serão usados no tratamento descontínuo das amostras.

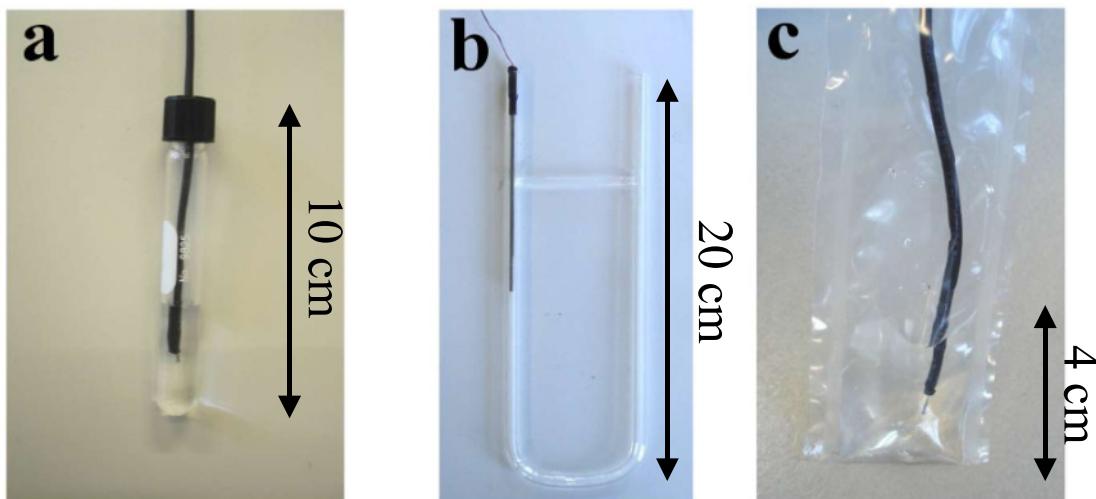


Figura 4: Recipientes testados com sensor de temperatura posicionado. a) tubo de vidro, b) tubo em U, c) embalagem plástica

3.5.1 Tubos de vidro

Os tubos de vidro usado são do tipo Pirex, com 10 cm de comprimento e área externa de 12 cm^2 . Os tubos tem uma tampa de plástico de cerca de 1,5 cm. Foi feito um furo nas tampas para que o termopar dos aparelhos de medição de temperatura pudessem ser usados.

3.5.2 Tubos em U

Os tubos em U foram feitos por encomenda. Possuem 20 cm de altura e área externa de 45 cm^2 .

3.5.3 Embalagens plásticas

As embalagens plásticas são feitas de polietileno. Têm 18 cm^2 de área externa e quando preenchidas, o nível de líquido chega a 4 cm. Os termopares podiam ser colocados no ponto de aquecimento mais lento, assim como nos tubos de vidro.

3.6 Banho térmico

Os ensaios descontínuos foram feitos em banho térmico da Fanem Unitemp e béquer de plástico com água e gelo. Na figura 5 pode-se ver a configuração de um ensaio no banho térmico, com tubos em U e sistema de aquisição de temperaturas TH.

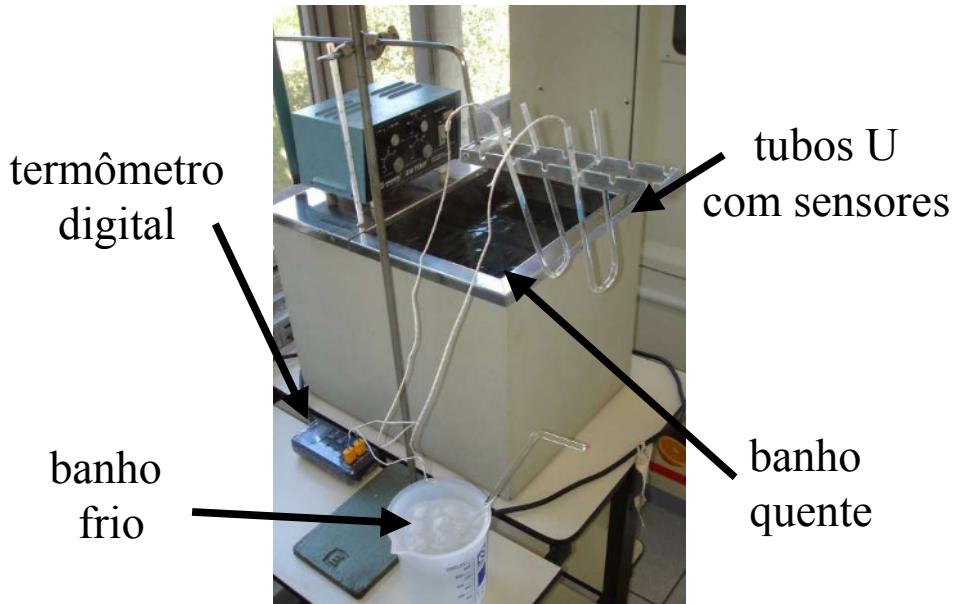


Figura 5: Teste de aquecimento para tubos em U. Sistema TH.

3.7 Tratamento térmico descontínuo

Para que os parâmetros da Equação (4) pudessem ser ajustados para cada indicador, valores de AR experimentais (medidos pelo método reflectométrico) e teóricos (calculados pela equação 4, com estimativa inicial dos parâmetros) devem ser comparados e o erro quadrático da diferença dos valores, obtidos na mesma condição, devem ser minimizados.

As escolhas para as condições iniciais dos ensaios (tempo e temperatura) foram baseados em dados de literatura (Claeys *et al.*, 2002). Com os parâmetros $D_{71^{\circ}C} = 38,6\text{min}$, $z=4,3^{\circ}\text{C}$ e $\alpha=0$ para a LPO de leite bovino, foram calculados valores de AR segundo a Equação (4). A Tabela 2 mostra os tempos necessários para atingir certa atividade residual, a uma dada temperatura.

Tabela 2: Tempos de tratamento térmico em função da temperatura e da atividade residual da enzima LPO

T	D(min)	A/A_0								
		0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
50.0	1895.52	1.45	3.06	4.89	7.01	9.51	12.57	16.52	22.08	31.59
52.5	639.78	29.27	62.00	99.10	141.93	192.59	254.59	334.53	447.19	639.78
55.0	215.94	9.88	20.93	33.45	47.91	65.00	85.93	112.91	150.93	215.94
57.5	72.88	3.33	7.06	11.29	16.17	21.94	29.00	38.11	50.94	72.88
60.0	24.60	1.13	2.38	3.81	5.46	7.41	9.79	12.86	17.19	24.60
62.5	8.30	0.38	0.80	1.29	1.84	2.50	3.30	4.34	5.80	8.30
65.0	2.80	7.69	16.30	26.05	37.30	50.62	66.91	87.92	117.53	168.15
67.5	0.95	2.60	5.50	8.79	12.59	17.08	22.58	29.68	39.67	56.75
70.0	0.32	0.88	1.86	2.97	4.25	5.77	7.62	10.02	13.39	19.16
72.5	0.11	0.30	0.63	1.00	1.43	1.95	2.57	3.38	4.52	6.47
75.0	0.04	0.10	0.21	0.34	0.48	0.66	0.87	1.14	1.53	2.18
80.0	0.00	0.01	0.02	0.04	0.06	0.07	0.10	0.13	0.17	0.25
85.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.03

As células em verde indicam condições viáveis para serem ensaiadas em laboratório. Com a realização dos primeiros ensaios, foi-se ganhando maior conhecimento sobre o comportamento dos indicadores. As outras condições foram determinadas de acordo com nossa necessidade e com uma previsão de qual atividade residual iria resultar.

A montagem dos ensaios de tratamento térmico descontínuo seguiu o padrão mostrado na Figura 5. Em cada ensaio, eram testados vários pares de tempo de imersão no banho quente e temperatura do banho, para um mesmo indicador. Antes do ensaio, era medida a atividade inicial A_0 do indicador, em triplicata.

Após a montagem do equipamento, segundo a Figura 5, os ensaios eram conduzidos. Foram realizados ensaios em bateladas de dois pares tempo-temperatura por vez. Normalmente havia mais de dois tempos para uma dada temperatura, então todos os ensaios de tempos a uma mesma temperatura eram realizados antes de mudar o set-point da temperatura do banho.

As amostras dos ensaios realizados eram armazenadas em água com gelo, até que todos os tempos de uma mesma temperatura fossem ensaiados. O perfil de tempo vs. temperatura era registrado pelo aparelho de aquisição de dados. Quando se passava para uma nova temperatura, eram medidas as atividades residuais A das amostras da temperatura anterior, em triplicata.

Os dados de temperatura eram descarregados em um computador para posterior cálculo da atividade residual experimental, partindo de uma estimativa inicial dos parâmetros da Equação (4), baseada em dados de literatura ou em valor calculado em ensaios anteriores.

Normalmente eram feitas de 12 a 15 ensaios em um dia, devido ao tempo gasto no tratamento térmico (estabilização da temperatura do banho na temperatura desejada) e das

medidas das atividades pelo método reflectométrico. Os resultados de atividade experimental e teórica eram comparados em uma tabela de Excel.

O ajuste dos parâmetros da Equação (4) foi feito usando a ferramenta Solver do Microsoft Excel, minimizando a soma da diferença entre valores experimentais e teóricos. Os resultados do ajuste foram apresentados em gráficos de paridade. Com os parâmetros ajustados, foram construídos gráficos de cinética dos indicadores, que ajudam a avaliar se este pode ou não ser empregado na avaliação de um processo térmico.

3.8 Ensaio descontínuo lento

Diferentemente dos ensaios anteriores, onde a embalagem plástica foi usada como recipiente para o tampão e o indicador, nos ensaios descontínuos lentos foram usados os tubos de vidro. Como a proposta deste tipo de ensaio é verificar como o indicador se comporta em variações lentas de temperatura, o recipiente que exerce a maior resistência na troca térmica é o mais adequado.

O procedimento adotado nos ensaios foi semelhante ao procedimento adotado anteriormente. Primeiramente preparou-se a solução tampão e as soluções de indicadores, caso precisassem ser descongeladas. No dia do ensaio, o banho térmico foi preparado com set-point na menor temperatura a ser analisada.

Nos ensaios descontínuos lentos, foram realizados 10 pontos diferentes, em duplicata, totalizando 20 medições. As temperaturas e tempos foram pré-determinadas segundo a Tabela 3.

Tabela 3: Condições para ensaio descontínuo lento.

Temperatura (°C)	65	70	75	80	85
1min	65C1M	70C1M	75C1M	80C1M	85C1M
2min	65C2M	70C2M	75C2M	80C2M	85C1M

A variação de temperatura foi registrada com o sistema TH. Após cada condição, os recipientes foram retirados do banho térmico e mergulhados no recipiente com água e gelo, até que todas as condições fossem realizadas. A atividade em cada condição foi medida pelo método reflectométrico.

O ensaio descontínuo lento tem como objetivo validar o ajuste feito pelos ensaios normais. Desta forma, para que o ajuste dos parâmetros cinéticos dos indicadores seja satisfatório, os resultados obtidos no ensaio descontínuo devem coincidir com os resultados obtidos no ensaio descontínuo lento, ou seja, usando os parâmetros cinéticos obtidos nos ensaios normais, o gráfico de atividade residual calculada x atividade residual experimental dos ensaios normal e descontínuo lento devem apresentar a mesma tendência.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sistemas de aquisição de temperatura

Os testes para o sistema de aquisição de temperaturas foram realizados como descritos no item 3.1 deste trabalho. Foi definida a variável temperatura adimensionalizada como a razão entre a temperatura no instante t pela temperatura máxima alcançada no experimento. Foi plotado no gráfico da Figura 6 a temperatura adimensionalizada pelo tempo para diferentes três ensaios diferentes do sistema TH, com temperatura do banho em 60°C (curvas verdes) e ensaios em três temperaturas diferentes, 71°C, 76°C e 80°C, onde foram registradas as temperaturas de aquecimento e resfriamento, para o sistema DAG (curvas roxas).

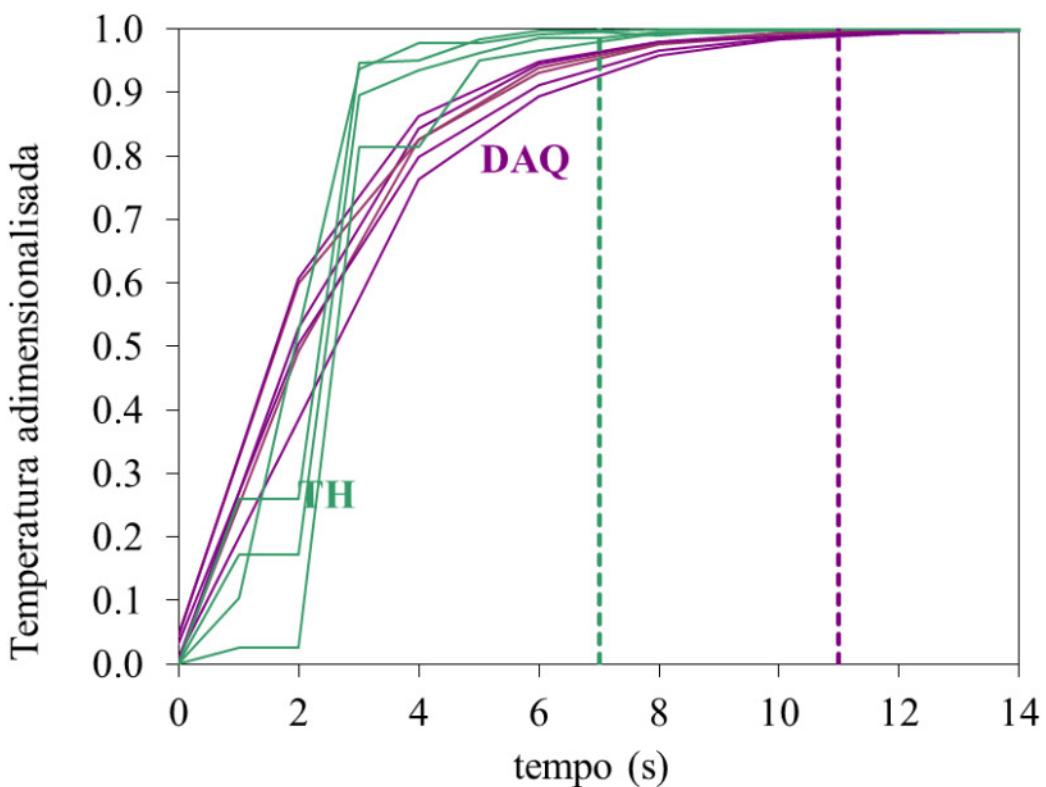


Figura 6: Tempo de resposta dos sistemas de aquisição.

Pode-se ver, pelo gráfico, que o sistema TH alcança a temperatura do banho em aproximadamente sete segundos (linha pontilhada verde) enquanto o sistema DAQ alcança a temperatura do banho em aproximadamente 11 segundos (linha pontilhada roxa). Além disso, o formato das curvas do sistema TH indica uma resposta mais rápida, já que apresentam uma variação mais brusca na temperatura adimensionalizada, quando comparadas com as curvas do sistema DAQ, que são mais suaves.

A partir destes resultados, optou-se por usar o sistema TH como sistema de aquisição de dados nos ensaios descontínuos. Quanto menor o tempo de resposta do medidor, melhor serão os resultados finais.

4.2 Calibração dos Termopares

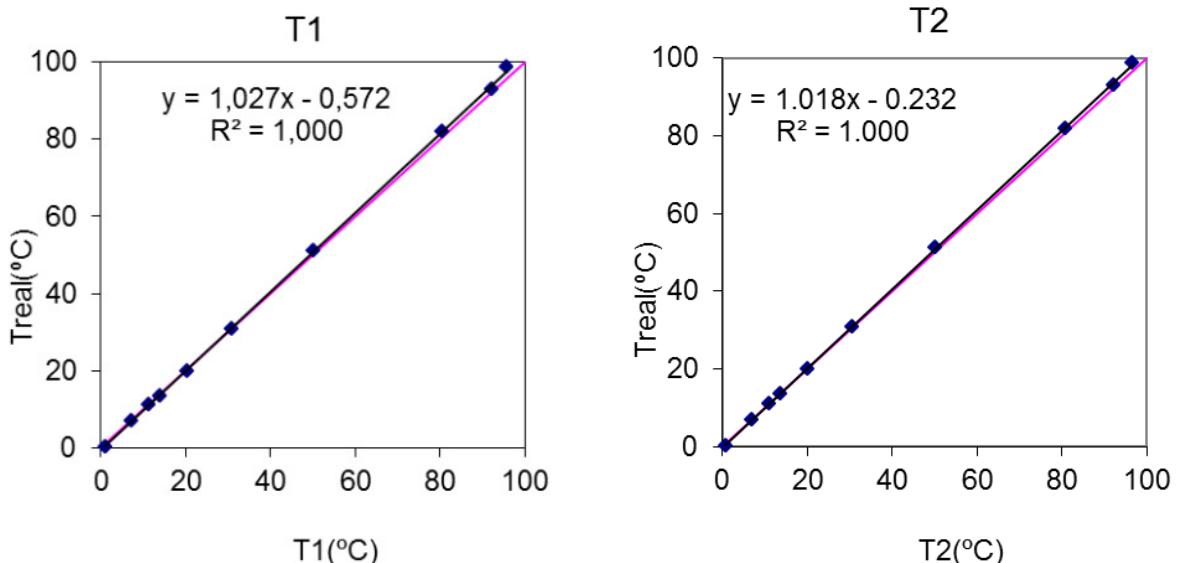


Figura 7: Curvas de calibração dos termopares.

A calibração dos termopares foi realizada segundo o item 3.2 deste trabalho. A Figura 7 mostra os gráficos de temperatura real, medida pelo termômetro de mercúrio certificado, pela temperatura lida nos dois termopares do aparelho TH.

As equações obtidas por regressão linear nos dados obtidos foram usadas para corrigir as temperaturas medidas nos ensaios descontínuos.

4.3 Veículo dos Indicadores

Em um primeiro momento, Optou-se por utilizar leite UHT comercial (Parmalat) como novo veículo das enzimas. Este teve seu pH ajustado para 6.60 ± 0.03 e, para cada lote, foram feitas a medida de sólidos totais, determinada de acordo com norma 429/IV de ANVISA (2005) e a medida da densidade, com pipeta de 5 mL e balança analítica (Chyo Balance Corp., Japão).

Foram obtidos os seguintes valores:

$$\rho = 1,02 \pm 0,03 \text{ g/cm}^3$$

$$\%_{\text{sólidos}} = 11,5\%$$

Verificou-se que o uso de leite UHT como veículo não era viável, já que a atividade do indicador ALP não estabilizava ao longo do tempo. A Figura 8 mostra um gráfico da atividade, em U/L pelo tempo, para quatro amostras de ALP em diferentes concentrações de indicador, diluídas em leite UHT.

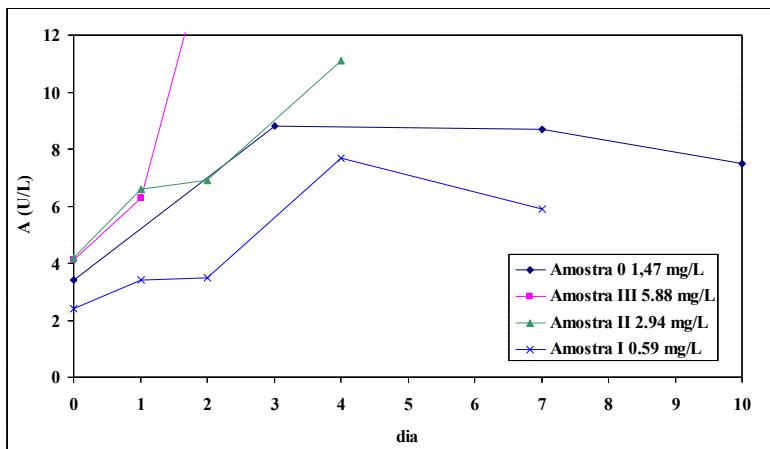


Figura 8: Atividade da ALP em diferentes amostras ao longo dos dias de armazenamento a 5 °C

Pode-se observar que para as amostras I, II e III, mesmo após vários dias, a medida de atividade não estabilizava. Para a amostra 0, pode-se dizer que a partir do terceiro dia, o valor da atividade medida apresenta um valor estável.

O fato do leite UHT, após aberto, apresentar um prazo de validade relativamente curto (cerca de sete dias, armazenado sob refrigeração), também compromete sua aplicação como veículo eficiente.

Foi testado então o uso de leite em pó (Itambé) reconstituído, com pH padronizado para 6.60 ± 0.03 (Hayes, 1987). O aparelho usado na medição do pH foi o pHStat (Radiometer Copenhagen, Dinamarca). Observou-se que resíduos do leite em pó, que não foram completamente diluídos interferiam na análise de LPO pelo Reflectoquant, deixando pontos escuros nas tiras, inviabilizando sua aplicação como veículo dos indicadores.

Decidiu-se então testar o uso de solução de tampão fosfato, pH 6,6, força iônica 50 mM como veículo dos indicadores. O tampão fosfato foi preparado com os reagentes fosfato monobásico de sódio ($NaH_2PO_4 \cdot 1H_2O$) e fosfato di-básico de sódio ($Na_2H PO_4 \cdot 7H_2O$). Foram preparadas soluções de um litro de tampão sempre que necessário. O tampão fosfato atende a todas as necessidades de um bom veículo: não deteriora, estabiliza a atividade do indicador, é barato e fácil de ser produzido e padronizado.

4.4 Recipiente

Foram testados três recipientes diferentes, como descritos no item 3.5 deste trabalho. A figura 8 mostra um gráfico da temperatura pelo tempo, registradas pelo sistema TH nos três recipientes, embalagem plástica (linha verde), tubo em U (linha rosa) e tubo de vidro (linha preta) para um ensaio realizado em banho térmico com temperatura de set point em 70°C. Os recipientes ficaram mergulhados no banho por 60 segundos.

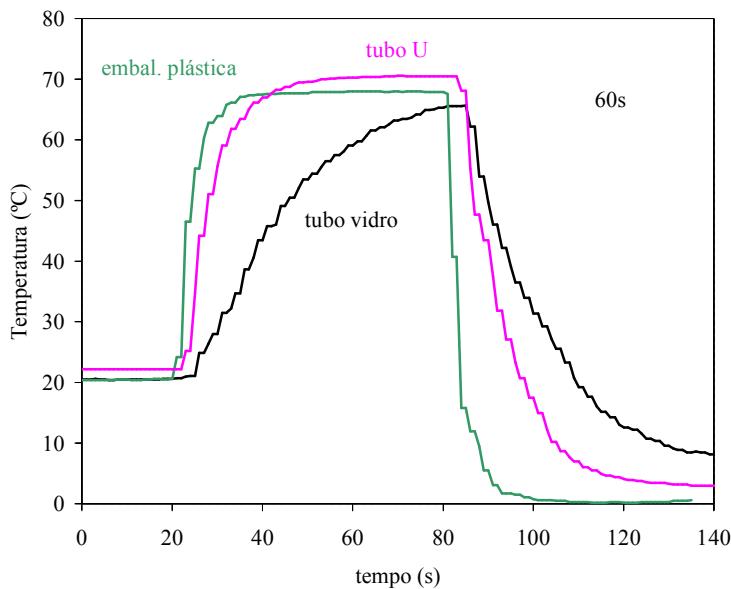


Figura 9: Testes de aquecimento com 60 s de mergulho. Sistema TH, 3 mL de água, diferentes recipientes.

Observando o gráfico, pode-se concluir que a resposta do tubo de vidro é muito lenta. Durante os 60 s, a temperatura do banho não foi atingida. Portanto, adotar este recipiente para os ensaios descontínuos comprometeria o resultado dos mesmos, já que muitos pontos tem tempo menor que 60 s.

Comparando as curvas registradas com o tubo em U e a embalagem plástica, pode-se verificar que o tempo de resposta para a variação na temperatura apresentada pela embalagem plástica é cerca de 2 s menor que o tempo de resposta do tubo em U. Observa-se também que a curva de aquecimento da embalagem plástica é mais pronunciada que a do tubo em U, o que implica em uma resposta mais rápida.

Quando comparado ao tubo em U, a embalagem plástica apresenta uma série de vantagens como: menos frágil, descartável, mais barato.

A Figura 10 mostra um gráfico comparando o tempo de resposta de embalagens plásticas seladas (segundo Figura 11) e abertas.

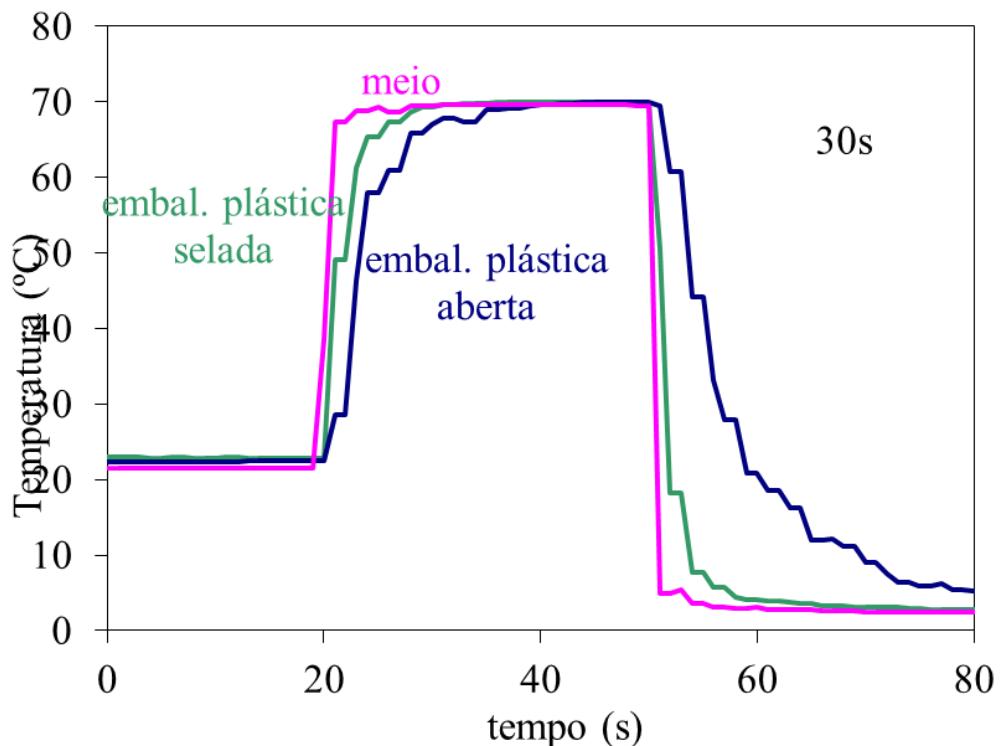


Figura 10: Testes de aquecimento com 30 s de mergulho. Sistema TH, 3 mL de água, embalagens plásticas abertas e seladas.



Figura 11: Embalagem de plástico selada.

Pelo gráfico, observa-se que o tempo de resposta da embalagem selada é menor, quando comparado a embalagem aberta, mas esta melhora não é significativa ao ponto de compensar o trabalho proveniente do uso de embalagens com esta configuração. Seria muito mais difícil a colocação do termopar e o volume de amostra para cada ensaio deveria ser maior.

4.5 Tratamento Térmico

Nos itens seguintes são apresentados os dados obtidos nos ensaios de tratamento térmico descontínuo em diferentes pares de tempo e temperatura para os três indicadores. Como já descrito no item 3.7 deste trabalho, os ensaios foram feitos em bateladas de 12 a 15 pontos em um dia, sempre para um mesmo indicador em condições diversas de tempo e temperatura.

4.5.1 Indicador de peroxidase

Os ensaios descontínuos em indicador de peroxidase (POD) foram conduzidos para os tempos e temperaturas da Tabela 4. A variação de temperatura pelo tempo foi registrada pelo instrumento TH, em cada amostra. A temperatura lida foi corrigida para a temperatura real, usando as equações de calibração dos termopares. O gráfico da Figura 12 mostra o comportamento dessas curvas. Os dados foram tratados no Microsoft Excel.

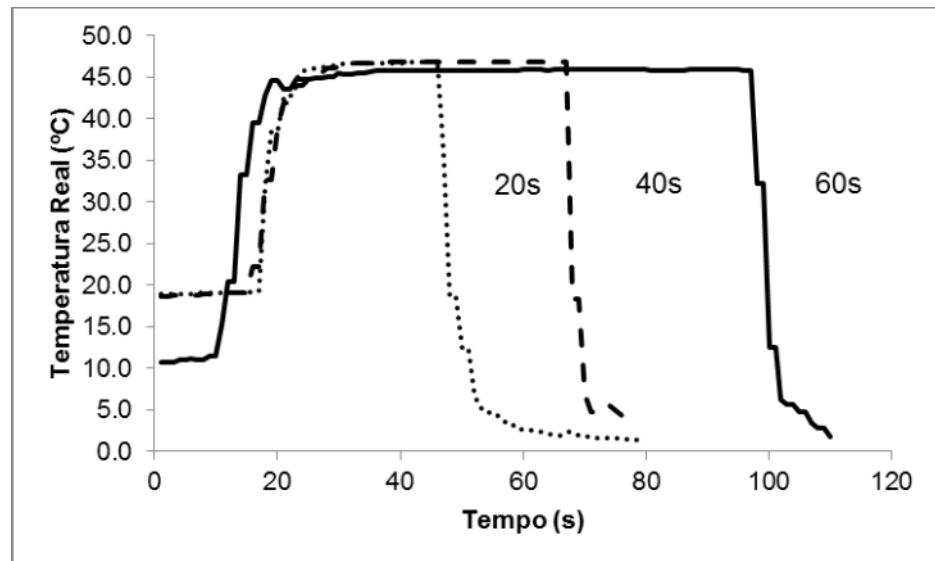


Figura 12: Exemplo de curvas de aquecimento e resfriamento do indicador de peroxidase. $T=60^{\circ}\text{C}$, diferentes t .

Tabela 4: Condições de ensaio do indicador de peroxidase.

Condições de ensaio do indicador POD			
45C20s	65C90s	75C90s	85C60s
45C40s	65C5min	75C2min	85C90s
45C60s	70C15s	75C5min	85C2min
50C20s	70C20s	75C10min	85C5min
50C40s	70C30s	75C15min	90C5s
50C60s	70C40s	80C5s	90C10s
50C80s	70C1min	80C10s	90C15s
55C20s	70C2min	80C15s	90C20s
55C40s	70C3min	80C30s	90C60s
55C80s	70C5min	80C2min	90C90s
60C20s	70C8min	80C4min	95C10s
60C40s	75C15s	80C7min	95C20s
60C60s	75C25s	85C5s	95C30s
60C80s	75C35s	85C15s	95C40s
65C30s	75C50s	85C30s	95C60s
65C50s	75C60s	85C45s	95C90s

O tempo equivalente de tratamento isotérmico à T_{Tref} , zF_{Tref} , Equação (3.a) foi calculado usando o método dos trapézios. A atividade residual teórica foi calculada com uma estimativa inicial dos parâmetros da Equação 4. Os resultados teóricos foram comparados com os resultados experimentais, das medidas pelo método reflectométrico. A somatória do quadrado das diferenças das medidas foi minimizada com a ferramenta Solver.

A Tabela 5 mostra os valores de atividade residual experimentais e os calculados, após o ajuste. A Tabela 6 mostra os parâmetros da Equação 4 que minimizaram o erro.

Tabela 5: A/Ao experimental e calculado para os diferentes ensaios do indicador peroxidase.

Ensaio	A/Ao exp	A/Ao calc	Ensaio	A/Ao exp	A/Ao calc
45C20s	0,91	1,00	75C90s	0,50	0,40
45C40s	0,86	1,00	75C2min	0,59	0,42
45C60s	0,88	1,00	75C5min	0,35	0,26
50C20s	0,87	1,00	75C10min	0,12	0,16
50C40s	0,79	1,00	75C15min	0,08	0,15
50C60s	0,78	1,00	80C5s	0,84	0,73
50C80s	0,81	1,00	80C10s	0,66	0,56
55C20s	0,86	1,00	80C15s	0,48	0,48
55C40s	0,83	1,00	80C30s	0,39	0,36
55C80s	0,84	0,99	80C2min	0,24	0,26
60C20s	0,82	0,99	80C4min	0,15	0,19
60C40s	0,72	0,99	80C7min	0,10	0,11
60C60s	0,84	0,98	85C5s	0,73	0,80
60C80s	0,64	0,98	85C15s	0,37	0,32
65C30s	0,77	0,99	85C30s	0,30	0,30
65C50s	0,80	0,96	85C45s	0,24	0,28
65C90s	0,89	0,92	85C60s	0,28	0,26
65C5min	1,00	0,76	85C90s	0,16	0,24
70C15s	1,00	0,95	85C2min	0,13	0,19
70C20s	0,85	0,94	85C5min	0,07	0,17
70C30s	0,61	0,93	90C5s	0,35	0,33
70C40s	0,85	0,89	90C10s	0,30	0,30
70C1min	0,64	0,82	90C15s	0,22	0,29
70C2min	0,53	0,70	90C20s	0,18	0,27
70C3min	0,62	0,56	90C60s	0,11	0,19
70C5min	0,69	0,49	90C90s	0,19	0,12
70C8min	0,44	0,35	95C10s	0,30	0,26
75C15s	0,84	0,85	95C20s	0,27	0,23
75C25s	0,62	0,74	95C30s	0,19	0,17
75C35s	0,51	0,69	95C40s	0,12	0,14
75C50s	0,46	0,57	95C60s	0,11	0,10
75C60s	0,54	0,54	95C90s	0,22	0,06

Tabela 6: Parâmetros ajustados para indicador de peroxidase.

Parâmetro	Valor
α	0,35
z_1 ($^{\circ}\text{C}$)	16,3
z_2 ($^{\circ}\text{C}$)	8,2
$D_{1,Tref}$ (s)	866
$D_{2,Tref}$ (s)	28,8
T_{Tref} ($^{\circ}\text{C}$)	80,0

Com os dados da Tabela 5, foi plotado o gráfico na Figura 13. Este gráfico mostra a paridade entre as atividades residuais experimentais e calculadas. Quanto mais afastados os resultados estiverem da linha de 45° que passa pela diagonal do gráfico, maior será a diferença entre os valores.

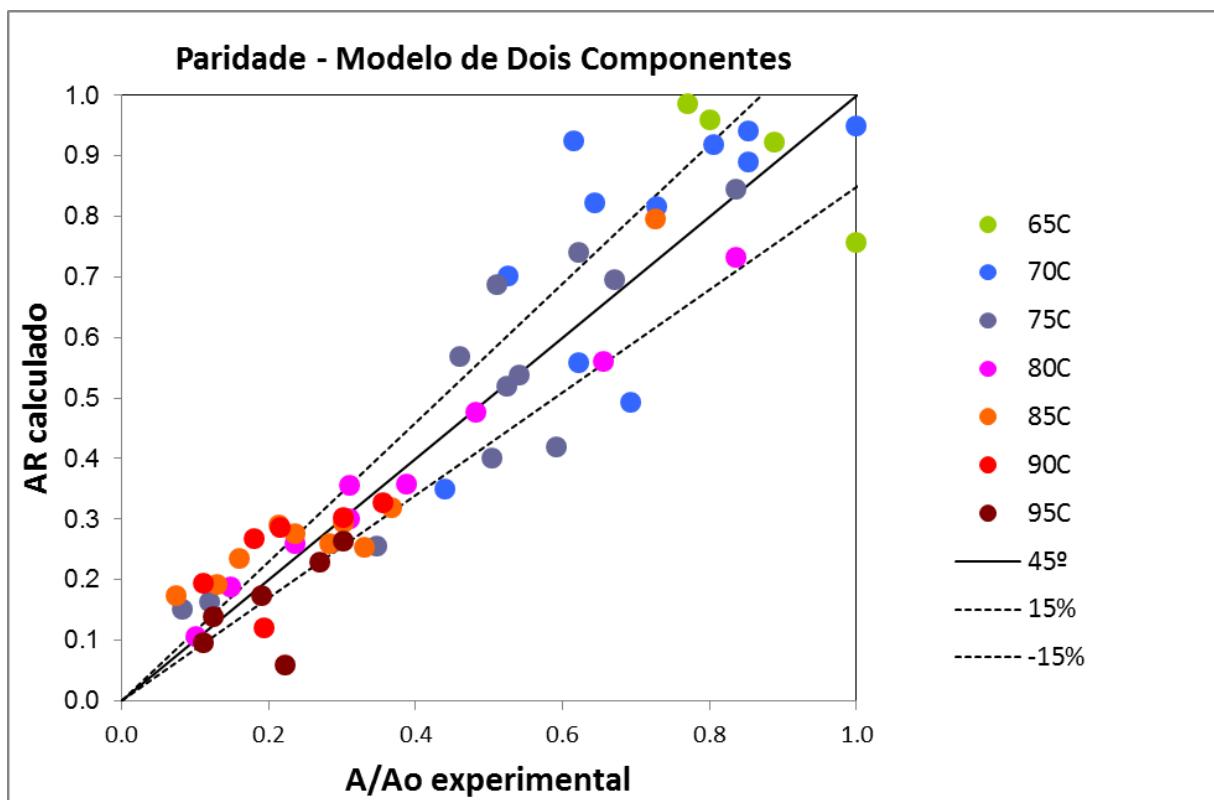


Figura 13: Paridade do ajuste dos dados experimentais e calculados.

Observa-se um bom ajuste, mas com uma dispersão considerável dos resultados.

Em posse dos parâmetros cinéticos do modelo de primeira ordem e dois componentes para o indicador de peroxidase pode-se plotar o gráfico da cinética do indicador. Este gráfico relaciona a atividade residual pelo tempo, em diferentes temperaturas. Este gráfico nos permite tomar decisões mais concretas quanto a aplicação do indicador de peroxidase como TTIs de processos de pasteurização.

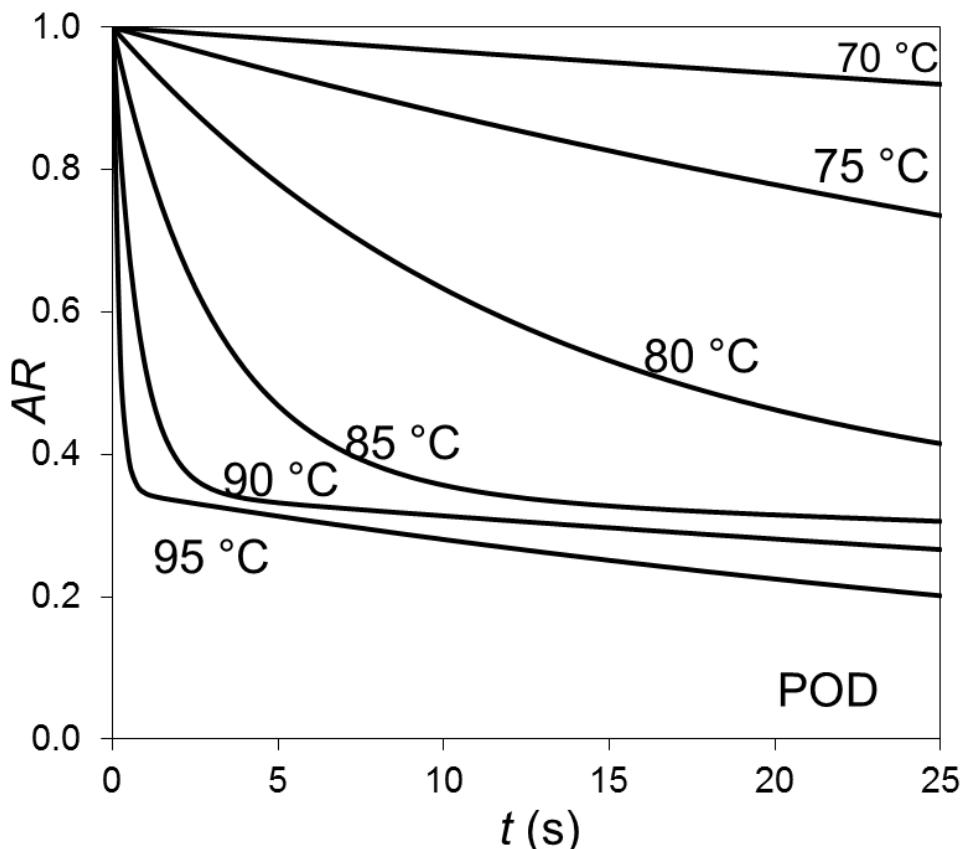


Figura 14: Gráfico da cinética de inativação do indicador de peroxidase, de acordo com o modelo cinético ajustado.

O gráfico de cinética foi construído usando os parâmetros ajustados e a Equação (4). Observa-se que para temperaturas menores (70°C e 75°C), a resposta do indicador não é muito boa, sua sensibilidade é baixa e os resultados obtidos podem ser facilmente confundidos. Portanto não é indicado o uso deste indicador nestas temperaturas.

Na temperatura de 85°C, o comportamento do indicador é razoável, fornecendo resposta identificável para tratamentos de até cerca de 8 segundos que representa uma inativação de 60%. Nas temperaturas mais altas (90°C e 95°C), o indicador só consegue quantificar tratamentos de até 4 segundos. À partir deste tempo, as respostas ficam indiferenciáveis.

Alem das conclusões a cima, analisando o gráfico, verifica-se que a atividade residual mínima do indicador de peroxidase não passa de 0,3 em temperaturas inferiores a 85°C e levam muito tempo para 0,2, sendo este valor atingido apenas com um tratamento térmico de 25 segundos a 95°C. Este resultado evidencia grande resistência térmica do indicador peroxidase e prejudica sua utilização na avaliação de processos de pasteurização, onde a temperatura alcançada não é muito alta.

4.5.2 Indicador de fosfatase

Os ensaios descontínuos para ajuste dos parâmetros cinéticos do indicador de fosfatase (ALP) foram realizados em temperaturas de 60°C a 85°C, em tempos de 5s a 10min. A Figura 15 mostra a configuração da bancada de laboratório para realização dos ensaios.



Figura 15: Configuração da bancada para ensaio descontínuo do indicador ALP.

A Figura 16 mostra uma das etapas do processo de medição da atividade residual do indicador pelo método reflectométrico. Nesta etapa, as tiras já mergulhadas na amostra e nos reagentes do kit devem ficar mergulhadas no banho térmico indiretamente (a cuba de plástico esta vazia, não há contato direto entre a tira e a água do banho), de modo a manter a temperatura constante.



Figura 16: Determinação da atividade residual experimental. Tiras em reação.

Após o tempo especificado ser atingido, as tiras são retiradas das cubas no banho térmico e imediatamente levadas para o aparelho de leitura, o RQflex. A Figura 17 mostra como as tiras utilizadas ficam, após o tempo de reação.

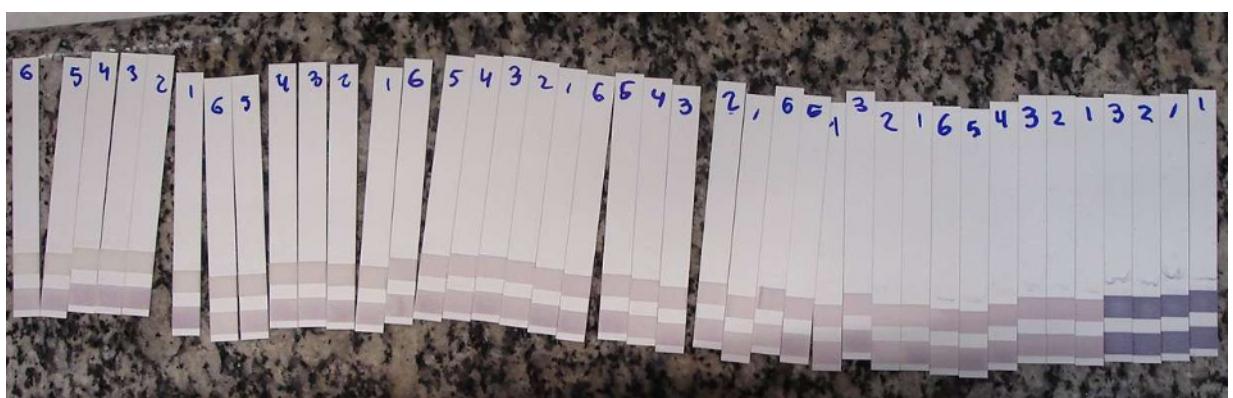


Figura 17: Tiras usadas.

Os resultados teóricos e experimentais da atividade residual e as condições ensaiadas podem ser vistas na Tabela 7. A Tabela 8 mostra os parâmetros cinéticos obtidos após o ajuste.

A entrada LO nas três ultimas linhas da Tabela 6, na atividade residual experimental indica que a atividade residual não pode ser detectada pelo aparelho, por estar fora da escala de medição.

Tabela 7: A/Ao experimental e calculado para os diferentes ensaios do indicador fosfatase.

Ensaio	A/Ao exp	A/Ao calc	Ensaio	A/Ao exp	A/Ao calc
60C30s	0,72	0,96	70C4min(2)	0,30	0,44
60C1min	0,74	0,94	70C6min	0,43	0,40
60C1min(2)	0,57	0,92	70C9min	0,32	0,34
60C2min	0,82	0,90	70C10min	0,24	0,26
60C2min(2)	0,60	0,86	75C5s	0,59	0,58
60C3min	1,00	0,81	75C10s	0,54	0,55
60C3min(2)	0,71	0,80	75C20s	0,58	0,54
60C4min	0,70	0,75	75C30s	0,37	0,53
60C5min	0,82	0,73	75C40s	0,60	0,49
60C6min	0,64	0,70	75C1min	0,49	0,46
60C7min	0,66	0,63	75C2min	0,36	0,33
60C7min(2)	0,59	0,66	75C3min	0,32	0,24
60C10min	0,80	0,68	75C4min	0,26	0,14
65C20s	1,00	0,91	75C5min	0,21	0,19
65C30s	0,50	0,84	75C6min	0,14	0,07
65C40s	0,89	0,87	80C5s	0,41	0,51
65C1min	0,54	0,72	80C10s	0,36	0,44
65C1min(2)	0,67	0,71	80C15s	0,32	0,39
65C2min	0,73	0,62	80C20s	0,23	0,35
65C3min	0,69	0,58	80C20s(2)	0,24	0,27
65C4min	0,79	0,56	80C25s	0,22	0,26
65C4min(2)	0,44	0,55	80C30s	0,29	0,30
65C7min	0,55	0,53	80C35s	0,17	0,21
65C10min	0,41	0,51	80C40s	0,20	0,22
70C5s	0,61	0,89	80C1min	0,13	0,15
70C10s	0,63	0,71	80C1.5min	0,19	0,07
70C20s	0,60	0,64	80C1.5min(2)	0,09	0,00
70C30s	0,55	0,59	85C5s	0,19	0,24
70C40s	0,62	0,57	85C10s	0,13	0,13
70C1min	0,49	0,55	85C15s	0,13	0,09
70C2min	0,61	0,52	85C20s	0,10	0,04
70C3min	0,35	0,46	85C20s(2)	0,11	0,05
70C4min	0,37	0,46	85C25s	0,12	0,03
70C4min(2)	0,30	0,44	85C30s	LO	0,01
70C6min	0,43	0,40	85C35s	LO	0,01
			85C40s	LO	0,00

Tabela 8: Parâmetros cinéticos ajustados do indicador fosfatase.

Parâmetro	Valor
α	0,59
z_1 ($^{\circ}\text{C}$)	7,57
z_2 ($^{\circ}\text{C}$)	6,57
$D_{1,Tref}$ (s)	477,9
$D_{2,Tref}$ (s)	3,83
T_{Tref} ($^{\circ}\text{C}$)	75

Com os dados das Tabelas 7 e 8, gráficos de paridade e cinética de inativação podem ser plotados. Estes podem ser encontrados nas Figuras 18 e 19, respectivamente.

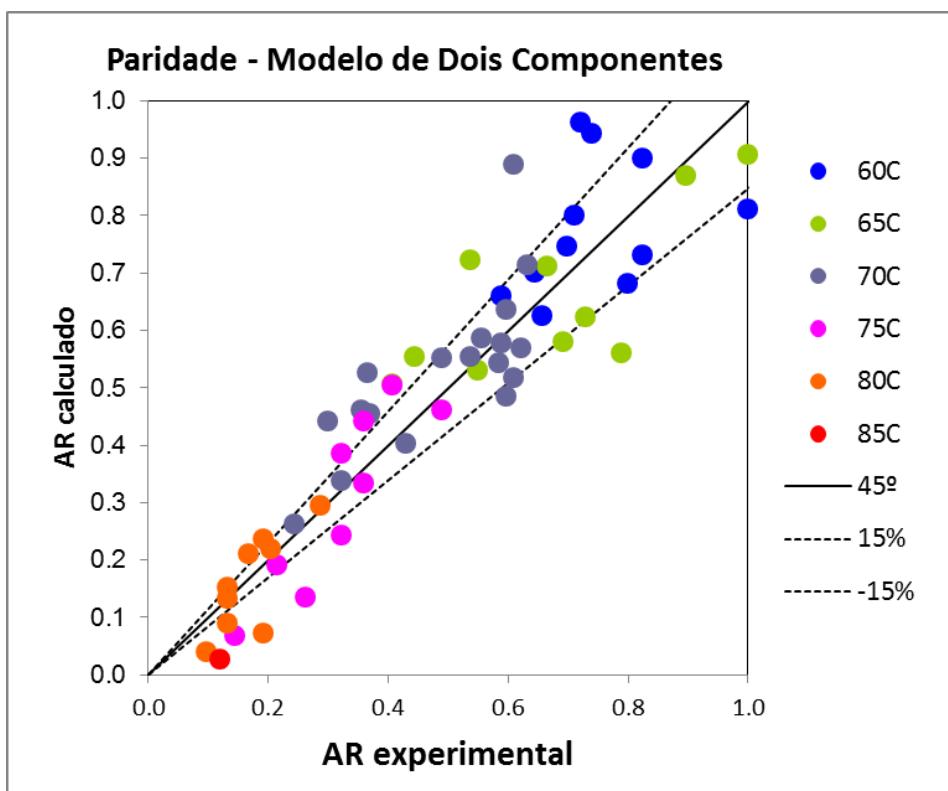


Figura 18: Paridade das atividades residuais calculadas e experimentais do indicador fosfatase.

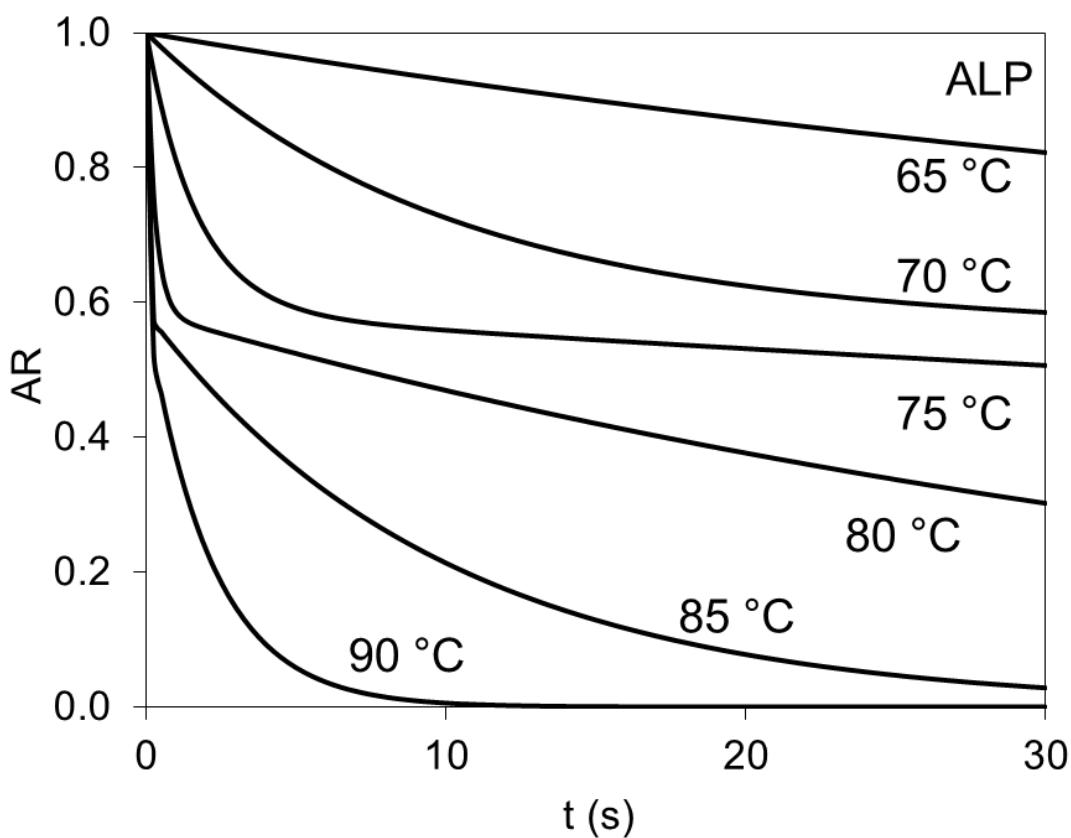


Figura 19: Cinética de inativação do indicador de fosfatase, de acordo com o modelo cinético ajustado.

Observando a Figura 18, pode-se deduzir que o indicador de fosfatase também apresenta dispersão considerável, em todas as faixas de atividade residual.

Em temperaturas mais altas, como em 90°C, o indicador de fosfatase pode ser utilizado para quantificar um tratamento térmico até 10s. Após este tempo, a resposta dada pelo indicador só garante que a atividade residual do mesmo atingiu o valor mínimo. Em 85°C, o indicador ainda apresenta uma resposta boa para o intervalo de tempo usado.

Este indicador pode ser utilizado para avaliar tratamentos térmicos de pasteurização, nas faixas de temperatura a cima de 85°C.

4.5.3 Indicador de lactoperoxidase

Os ensaios descontínuos no indicador de lactoperoxidase foram realizados entre 60°C e 80°C. Os tempos usados variaram de 5s a 10min. A Tabela 9 mostra as atividades residuais experimentais e calculadas, para cada condição de ensaio. A Tabela 10 mostra os parâmetros cinéticos ajustados.

Tabela 9: Atividades residuais experimentais e calculadas do indicador de lactoperoxidase em diferentes condições.

Ensaio	A/Ao exp	A/Ao calc	Ensaio	A/Ao exp	A/Ao calc
60C5min*	1,00	0,84	70C1min(2)	0,32	0,33
60C8min	0,60	0,79	70C90s	0,30	0,26
60C10min	0,68	0,74	70C90s(2)	0,31	0,17
62,5C5min	0,81	0,77	70C2min	0,19	0,08
62,5C10min	0,75	0,65	70C3min	0,00	0,03
65C45s	0,58	0,89	70C5min	0,00	0,00
65C1min	0,45	0,90	72,5C10s	0,61	0,84
65C1min(2)*	1,00	0,90	72,5C20s	0,46	0,40
65C2min	0,75	0,77	72,5C30s	0,30	0,32
65C3min	0,97	0,76	72,5C40s	0,21	0,13
65C3min(2)	0,90	0,77	72,5C50s	0,14	0,09
65C4min	0,65	0,67	72,5C60s	0,12	0,07
65C5min	0,42	0,50	75C5s*	1,00	0,78
65C6min	0,55	0,62	75C10s	0,29	0,36
65C8min	0,57	0,47	75C10s(2)	0,51	0,23
67,5C1min	0,82	0,86	75C15s	0,26	0,24
67,5C3min	0,98	0,68	75C15s(2)	0,25	0,16
67,5C5min	0,26	0,40	75C20s	0,24	0,24
67,5C7min	0,41	0,32	75C20s(2)	0,11	0,16
67,5C8min	0,17	0,26	75C25s	0,19	0,14
67,5C10min	0,23	0,18	75C30s	0,07	0,08
70C10s	0,87	0,90	75C30s(2)	0,05	0,04
70C15s	0,61	0,87	75C1min	0,00	0,02
70C20s	0,82	0,66	75C5min	0,00	0,00
70C25s*	1,00	0,75	77,5C5s	0,14	0,35
70C30s	0,47	0,85	77,5C10s	0,15	0,21
70C30s(2)	0,72	0,62	80C5s	0,00	0,14
70C35s	0,37	0,65	80C10s	0,00	0,10
70C45s	0,54	0,60	80C30s	0,00	0,00
70C1min	0,44	0,51	80C3min	0,00	0,00

As linhas identificadas por * na Tabela 9 indicam condições em que se observou sobre ativação do indicador, ou seja, a atividade residual experimental deu um valor maior que 1.

Tabela 10: Parâmetros da cinética de inativação térmica do indicador de lactoperoxidase.

Parâmetro	Valor
α	0,67
z_1 ($^{\circ}\text{C}$)	2,74
z_2 ($^{\circ}\text{C}$)	12,07
$D_{1,Tref}$ (s)	173,2
$D_{2,Tref}$ (s)	110,2
T_{Tref} ($^{\circ}\text{C}$)	70

Com os dados apresentados nas Tabelas 9 e 10 pode-se plotar os gráficos de paridade e cinética de inativação térmica para o indicador de lactoperoxidase, mostrados nas figuras 20 e 21, respectivamente.

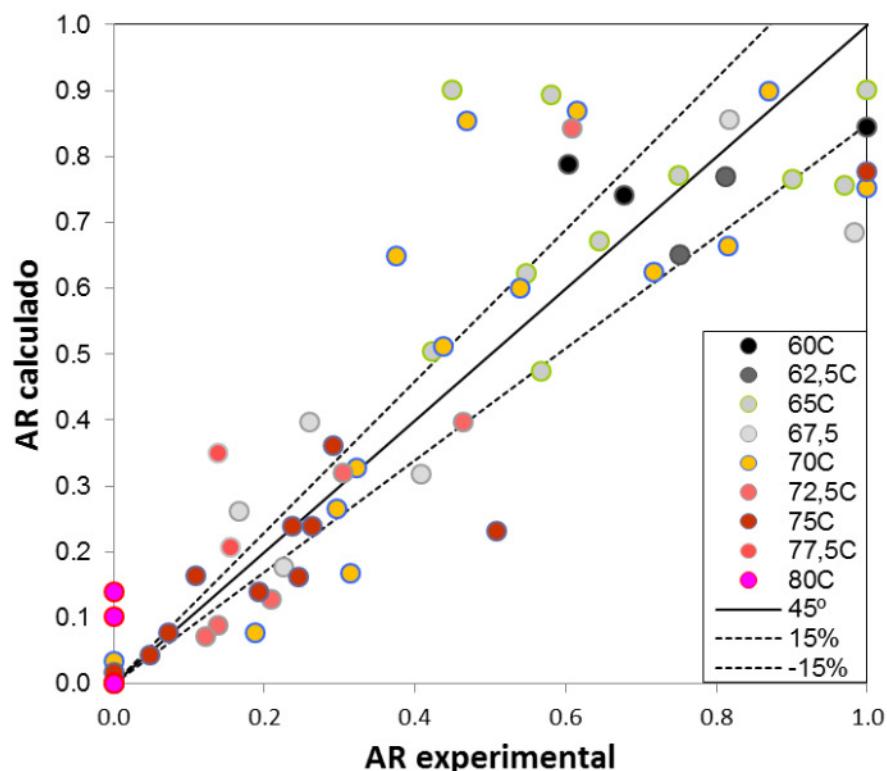


Figura 20: Paridade das atividades residuais calculadas e experimentais do indicador lactoperoxidase.

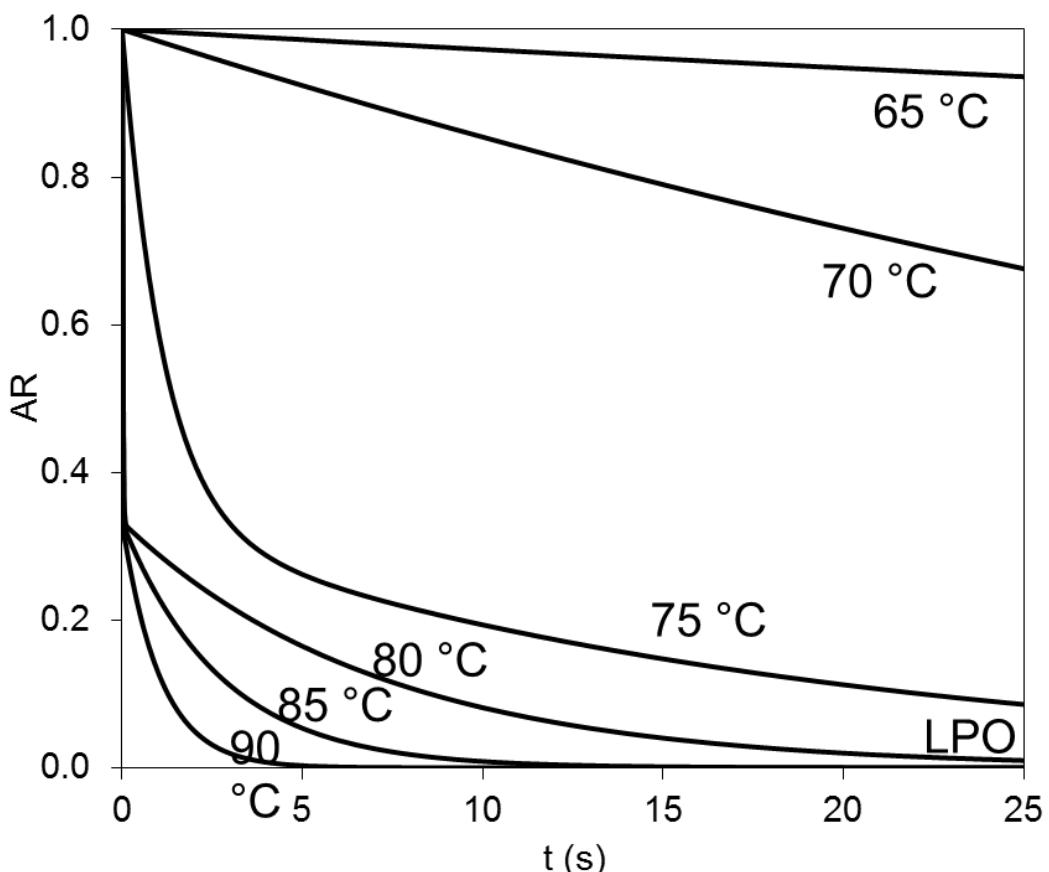


Figura 21: Cinética de inativação do indicador de lactoperoxidase, de acordo com o modelo cinético ajustado.

Conclui-se, pela Figura 21, que os pontos neste gráfico estão mais dispersos, quando comparado as gráficos de paridade dos dois outros indicadores. Principalmente nas temperaturas 65°C, 67,5°C e 70°C.

De acordo com a Figura 22, em temperaturas baixas, como 65°C e 70°C, a atividade residual do indicador apresenta valores muito altos, para intervalos de tempo de até 25s. A 75°C, a atividade residual do indicador também não atinge um valor baixo o suficiente, para viabilizar sua aplicação na avaliação de um processo térmico.

Em 80°C, para tratamentos térmicos de mais de cerca de 13s, o indicador perde a sensibilidade, não podendo ser usado de forma satisfatória. Em temperaturas mais altas, de 85°C e 90°C, o indicador apresenta um bom comportamento, tendo sua atividade residual tendendo a zero em tratamentos térmicos de 12s e 5s respectivamente.

4.6 Tratamento Térmico Descontínuo Lento

4.6.1 Indicador de fosfatase

O ensaio descontínuo lento para a ALP foi realizado conforme a descrição no item 5.8. A Figura 22 mostra o perfil de temperatura registrado para as condições de 65°C, 1 minuto; 70°, 2 minutos; 80°C, 1 minuto e 85°C, 2 minutos. Observa-se que tanto a fase de resfriamento quanto a fase de aquecimento são bem maiores, quando comparado à Figura 12, que mostra o perfil de temperatura de ensaios descontínuos realizados na embalagem plástica.

A Tabela 11 mostra os resultados obtidos no tratamento descontínuo lento, incluindo as atividades residuais medidas, atividades residuais calculadas, o erro quadrático, valor absoluto do desvio, desvio e erro percentual entre as atividades residuais de cada medida.

As Figuras 23 e 24 foram obtidas a partir dos dados da Tabela 11. Observa-se que a dispersão dos pontos se dá de forma aleatória, indicando que o erro contido no ajuste é proveniente de erro experimental, devido ao método reflectométrico.

Observando as Figuras 18 e 23, verifica-se que ambos os gráficos, tanto na condição de ajuste quanto no ensaio descontínuo lento, tem a mesma tendência, predominando a distribuição aleatória dos pontos em relação à linha de 45 graus.

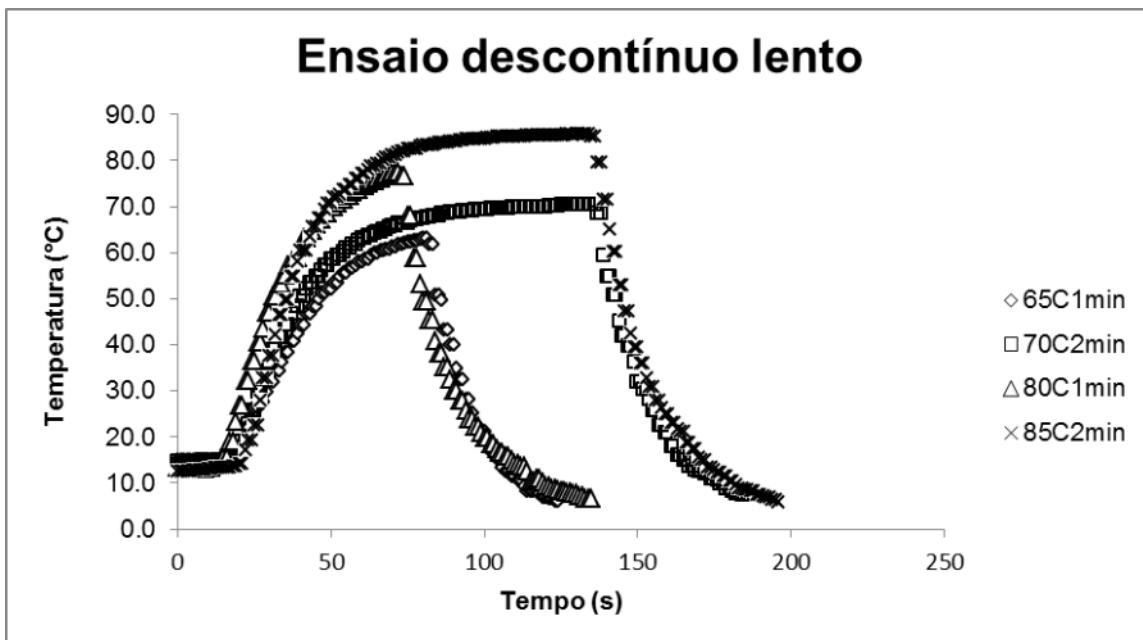


Figura 22: Tratamento térmico descontínuo lento.

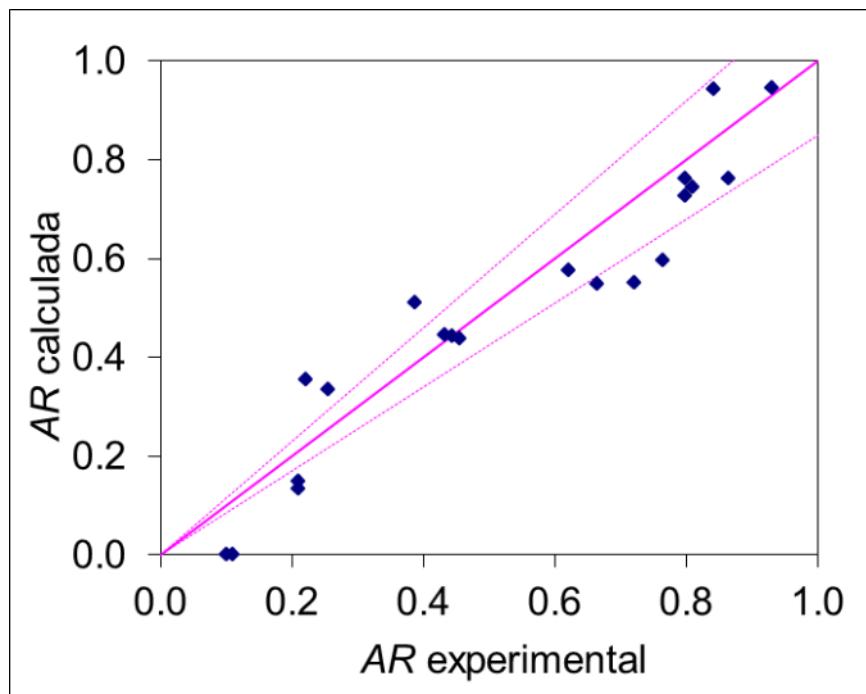


Figura 23: Paridade do indicador de ALP em ensaio descontínuo lento.

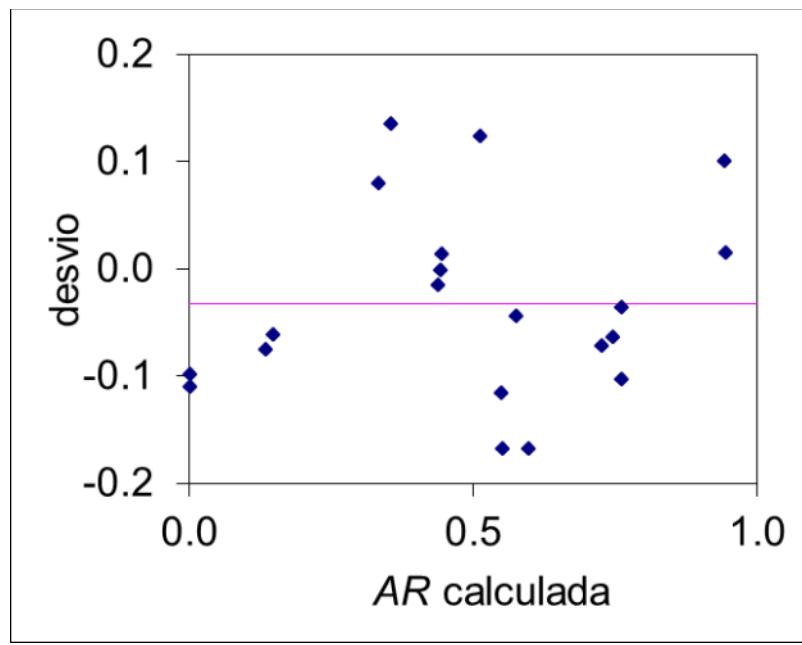


Figura 24: Desvio da atividade residual calculada para o indicador de ALP em ensaio descontínuo lento.

Tabela 11: Resultados do ensaio descontínuo lento para o indicador de ALP.

Ensaio	A/Ao exp	A/Ao calc	erro	desvio	desvio	erro
65-1min a	0.93	0.95	0.0	0.01	0.01	2%
65-1min b	0.84	0.94	1.0	0.10	0.10	12%
65-2min a	0.81	0.75	0.4	0.06	-0.06	8%
65-2min b	0.80	0.73	0.5	0.07	-0.07	9%
70-1min a	0.86	0.76	1.1	0.10	-0.10	12%
70-1min b	0.80	0.76	0.1	0.04	-0.04	4%
70-2min a	0.72	0.55	2.8	0.17	-0.17	23%
70-2min b	0.67	0.55	1.3	0.12	-0.12	17%
75-1min a	0.76	0.60	2.8	0.17	-0.17	22%
75-1min b	0.62	0.58	0.2	0.04	-0.04	7%
75-2min a	0.45	0.44	0.0	0.02	-0.02	3%
75-2min b	0.44	0.44	0.0	0.00	0.00	0%
80-1min a	0.39	0.51	1.5	0.12	0.12	32%
80-1min b	0.43	0.45	0.0	0.01	0.01	3%
80-2min a	0.21	0.14	0.6	0.08	-0.08	36%
80-2min b	0.21	0.15	0.4	0.06	-0.06	29%
85-1min a	0.22	0.36	1.8	0.13	0.13	61%
85-1min b	0.25	0.33	0.6	0.08	0.08	31%
85-2min a	0.10	0.00	1.0	0.10	-0.10	99%
85-2min b	0.11	0.00	1.2	0.11	-0.11	99%

4.6.2 Indicador de peroxidase

Foram realizados dois ensaios descontínuos lento para o indicador de peroxidase, um em dez/2009 e outro em jul/2010. Como a amostra do indicador usada no primeiro ensaio havia sido preparada há algum tempo, o segundo ensaio foi realizado com uma amostra recém preparada, para verificar a interferência do tempo de preparo nos resultados.

As Tabelas 12 e 13 mostram os resultados obtidos no primeiro e segundo ensaios descontínuo lento, incluindo as atividades residuais medidas, atividades residuais calculadas, o erro quadrático, valor absoluto do desvio, desvio e erro percentual entre as atividades residuais de cada medida.

As Figuras 25 e 26 mostram os gráficos de paridade entre as atividades experimentais e calculadas, para os dois ensaios. Observa-se que a tendência apresentada nos gráficos é praticamente a mesma, o que indica que a influência do tempo entre o preparo até o uso do indicador não é significativa. O último ensaio realizado foi adotado como base para a validação dos dados.

Observa-se, comparando as Figuras 13 e 26, que a tendência no ensaio descontínuo lento é claramente diferente da tendência do ensaio de ajuste. No primeiro caso, os pontos estão concentrados na parte direita do gráfico, enquanto que no segundo caso, os pontos estão distribuídos aleatoriamente em torno da linha de 45º.

Tabela 12: Resultados do ensaio descontínuo lento para o indicador de POD, ensaio realizado em dez/2009.

Ensaio	A/Ao exp	A/Ao calc	erro	desvio	desvio	erro
65-1min a	1.00	0.99	0.0	0.01	-0.01	1%
65-1min b	1.00	0.99	0.0	0.01	-0.01	1%
65-2min a	1.00	0.95	0.2	0.05	-0.05	5%
65-2min b	1.00	0.95	0.2	0.05	-0.05	5%
70-1min a	0.96	0.97	0.0	0.01	0.01	1%
70-1min b	0.98	0.98	0.0	0.01	-0.01	1%
70-2min a	0.98	0.81	2.7	0.16	-0.16	17%
70-2min b	1.00	0.83	3.0	0.17	-0.17	17%
75-1min a	0.90	0.99	0.9	0.09	0.09	10%
75-1min b	0.98	0.84	1.8	0.13	-0.13	14%
75-2min a	0.98	0.57	16.2	0.40	-0.40	41%
75-2min b	0.88	0.54	11.7	0.34	-0.34	39%
80-1min a	1.00	0.75	6.2	0.25	-0.25	25%
80-1min b	1.00	0.74	6.6	0.26	-0.26	26%
80-2min a	0.74	0.30	19.1	0.44	-0.44	59%
80-2min b	0.83	0.31	27.1	0.52	-0.52	63%
85-1min a	0.89	0.47	17.6	0.42	-0.42	47%
85-1min b	0.83	0.49	11.5	0.34	-0.34	41%
85-2min a	0.62	0.25	14.0	0.37	-0.37	60%
85-2min b	0.76	0.23	27.1	0.52	-0.52	69%

Tabela 13: Resultados do ensaio descontínuo lento para o indicador de POD, ensaio realizado em jul/2010.

Ensaio	A/Ao exp	A/Ao calc	erro	desvio	desvio	erro
65-1min a	1.00	0.99	0.0	0.01	-0.01	1%
65-1min b	0.92	0.99	0.5	0.07	0.07	8%
65-2min a	0.87	0.95	0.6	0.08	0.08	9%
65-2min b	0.97	0.95	0.1	0.03	-0.03	3%
70-1min a	1.00	0.97	0.1	0.03	-0.03	3%
70-1min b	0.94	0.97	0.0	0.02	0.02	2%
70-2min a	0.97	0.75	4.8	0.22	-0.22	23%
70-2min b	0.97	0.76	4.3	0.21	-0.21	21%
75-1min a	0.94	0.89	0.2	0.04	-0.04	5%
75-1min b	1.00	0.89	1.1	0.11	-0.11	11%
75-2min a	0.92	0.49	18.8	0.43	-0.43	47%
75-2min b	0.99	0.45	28.9	0.54	-0.54	54%
80-1min a	0.96	0.53	19.0	0.44	-0.44	45%
80-1min b	0.97	0.63	11.4	0.34	-0.34	35%
80-2min a	0.80	0.30	25.8	0.51	-0.51	63%
80-2min b	0.89	0.29	36.1	0.60	-0.60	67%
85-1min a	0.88	0.41	22.0	0.47	-0.47	53%
85-1min b	0.67	0.42	6.3	0.25	-0.25	37%
85-2min a	0.64	0.21	17.9	0.42	-0.42	67%
85-2min b	0.68	0.21	21.8	0.47	-0.47	69%

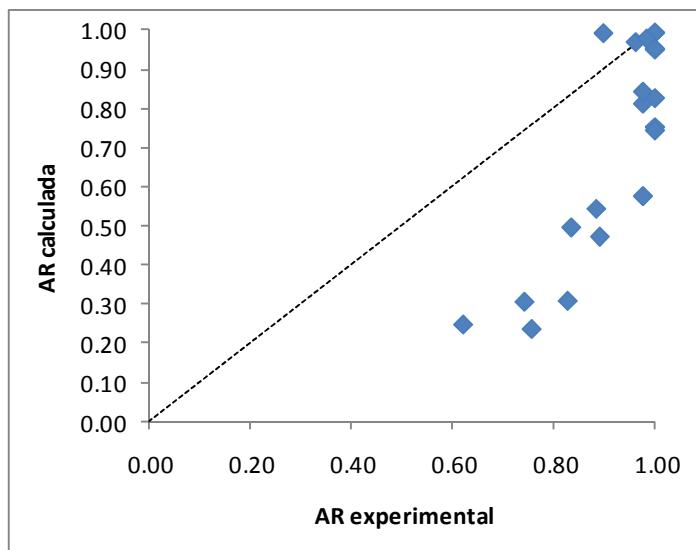


Figura 25: Paridade do indicador de POD em ensaio descontínuo lento, ensaio realizado em dez/2009.

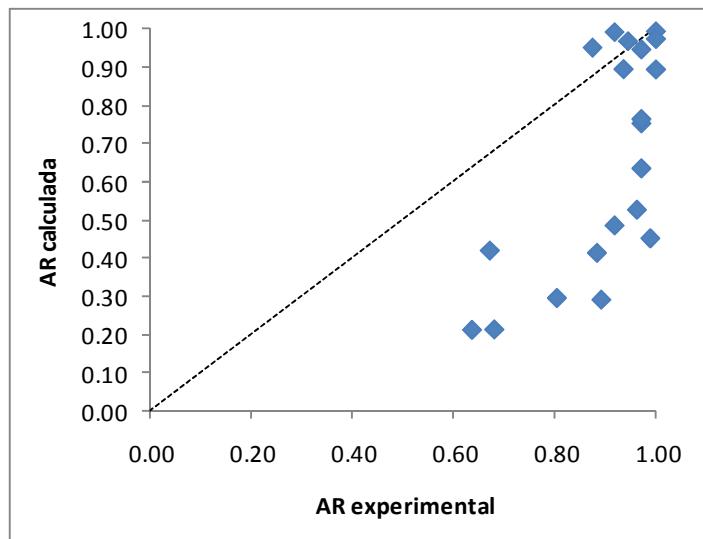


Figura 26: Paridade do indicador de POD em ensaio descontínuo lento, ensaio realizado em jul/2010.

5. CONCLUSÕES

A Figura 27 traz um resumo dos resultados encontrados. No lado direito pode-se ver a atividade residual esperada em faixas de temperatura e tempo diferentes e no lado esquerdo, pode-se ver o gráfico de paridade das atividades residuais calculadas e medidas, para cada um dos indicadores. O gráfico da Figura 28, que mostra a comparação das cinéticas de inativação dos três indicadores, a temperatura de referência $T_{Tref} = 85^{\circ}\text{C}$, nos permite tirar algumas conclusões importantes para a continuidade deste trabalho.

A Tabela 14 traz um resumo dos parâmetros cinéticos ajustados para os três indicadores, o número de ensaios realizados para cada indicador, n e a soma de erros quadrática, SSE.

De acordo com cotação feita em 28/jul/2010, o preço das enzimas liofilizadas é de: 3,74 US\$/mg, 20,24 US\$/mg e 0,11 US\$/mg para a POD, LPO e ALP, respectivamente. Para obter o preço médio do litro de indicador, desconsiderando o preço do tampão fosfato, multiplica-se os custos individuais do mg de enzima liofilizada pela concentração final do indicado. Seguindo este procedimento, obtém-se: 3,74 US\$/L, 0,04 US\$/L e 420,99 US\$/L para os indicadores de POD, ALP e LPO.

Dada a elevada dispersão dos resultados, o que faz necessário o uso de repetições de medidas, observada para os 3 indicadores, a utilização do indicador de LPO se torna economicamente inviável, dado o seu elevado custo.

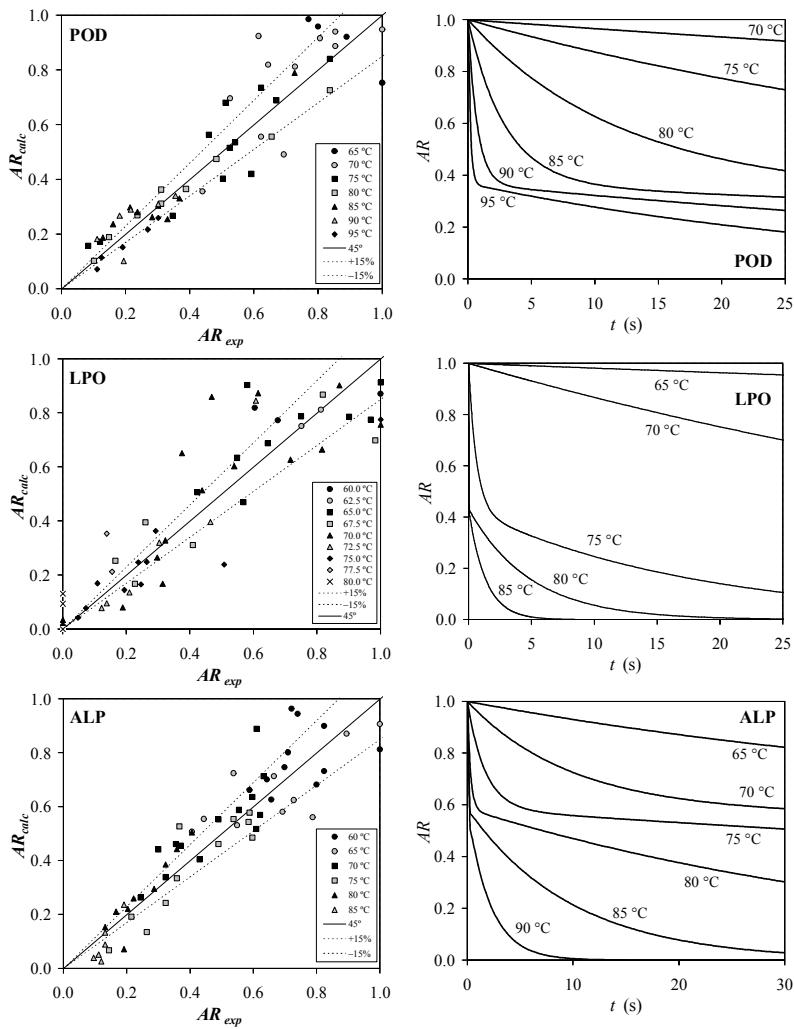


Figura 27: Resumo dos resultados do ajuste de parâmetros cinéticos para os três indicadores estudados.

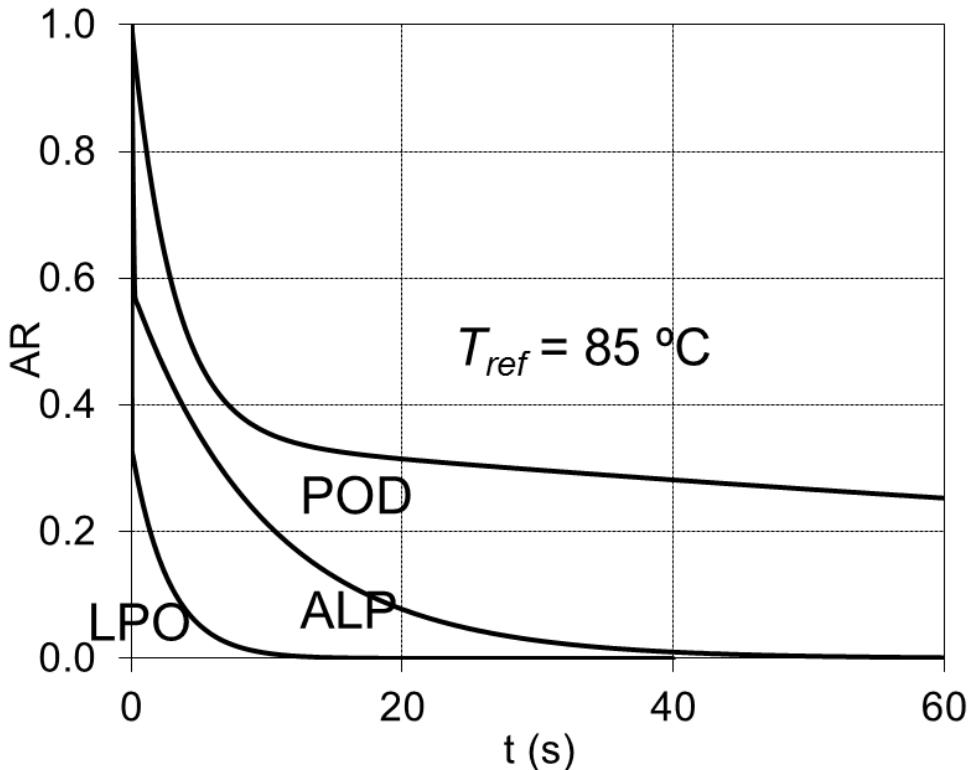


Figura 28: Comparação das cinéticas de inativação dos três indicadores, de acordo com os modelos cinéticos ajustados, em 85°C.

Tabela 14: Resumo dos parâmetros cinéticos dos três indicadores.

Indicador	n	SSE	T_{ref} (°C)	α	$D_{1,ref}$ (s)	$D_{2,ref}$ (s)	z_1 (°C)	z_2 (°C)
POD	56	0.57	80	0.368	808	27.0	15.1	8.22
LPO	59	1.11	70	0.568	173	149	2.40	8.91
ALP	61	0.60	75	0.585	478	3.83	7.57	6.57

Foram obtidos resultados satisfatórios para o indicador ALP. Este apresenta potencial para ser utilizado como TTIs em processos de pasteurização, pois seu valor da atividade residual tende à zero em um intervalo de tempo viável para tratamentos na temperatura dada.

Observando os resultados do ensaio descontínuo lento com o indicador de peroxidase (POD), pode-se concluir, à partir das Figuras 13 e 26, que o comportamento do mesmo difere em relação aos ensaios normal e lento. Por este motivo, esse indicador não pode ser utilizado satisfatoriamente, já que os parâmetros cinéticos obtidos em ensaio descontínuo normal não representam o comportamento do indicador em ensaio descontínuo lento, ou seja, os parâmetros cinéticos encontrados falharam no teste de validação.

Por outro lado, observando as Figuras 18 e 23, pode-se concluir que os parâmetros cinéticos ajustados em ensaio descontínuo para o indicador de fosfatase (ALP) conseguem representar seu comportamento no ensaio descontínuo lento, fato evidenciado pela semelhança entre os gráficos de paridade, onde, em ambos os casos, a fonte de erro predominante é randômica, oriunda da falta de reproduzibilidade do método reflectométrico.

A partir da Figura 27, pode-se dizer que o indicador de ALP pode ser usado como TTI para avaliar tratamentos térmicos de 10 a 30 segundos, à temperatura de 85°C. Esta faixa de operação corresponde a atividade residual (AR) medida pelo método reflectométrico entre 0,1 e 0,4.

A utilização do indicador de ALP como TTI pressupõe que o usuário fará medidas da atividade inicial do indicador antes deste passar pelo tratamento térmico a ser analisado e após a passagem do indicador pelo tratamento térmico, pelo menos em triplicata, reduzindo o erro experimental. Pressupõe-se também que o indicador vai passar pelo tratamento térmico de forma mais semelhante possível que o alimento e também que não haja contato entre o alimento e o indicador de ALP.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. Edição IV. Brasília: Ministério da Saúde, Instituto Adolfo Lutz, 2005.

HENDRICKX M, MAESMANS G, DECORDT S, et al. Evaluation Of The Integrated Time-Temperature Effect In Thermal-Processing Of Foods. Critical Reviews In Food Science And Nutrition 35, 231-262, 1995.

CLAEYS, W.L.; VAN LOEY, A.M.; HENDRICKX, M.E. Intrinsic time temperature integrators for heat treatment of milk. Trends In Food Science & Technology 13 (9-10), 293-311, 2002.

LU, Q.; PIYASENA, P.; MITTAL, G.S. Modeling alkaline phosphatase inactivation in bovine milk during high-temperature short-time pasteurization. Food Science And Technology International 7(6), 479-485, 2001.

VAN LOEY, A; HENDRICKX, M; DE CORDT, S, et al. Quantitative evaluation of thermal processes using time-temperature integrators. TRENDS IN FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY 7(1), 16-26, 1996.

DINNELLA, C; MONTELEONE, E; FARENZA, MF, et al. The use of enzymes for thermal process monitoring: modification of milk alkaline phosphatase heat resistance by means of an immobilization technique. FOOD CONTROL 15(6), 427-433, 2004.

CLAEYS, WL; SMOUT, C; VAN LOEY, AM, et al. From time temperature integrator kinetics to time temperature integrator tolerance levels: Heat-treated milk. BIOTECHNOLOGY PROGRESS 29(1), 1-12, 2004.

MURASAKI-ALIBERTI, N.C.; DA SILVA, R.M.S. ; GUT, J.A.W.; TADINI, C.C. Thermal inactivation of polyphenoloxidase and peroxidase in green coconut (*Cocos nucifera*) water. International Journal of Food Science & Technology, 44, pp.2662-2668, 2009.

7. ANEXO 1

Descrição dos procedimentos para determinação da atividade residual dos indicadores, pelo método reflectométrico, segundo a Merck, traduzidos.

REFLECTOQUANT – Teste de Peroxidase em leite

Material:

Reflectoquant	Água destilada (> 4 mL)
Recipiente de teste	Banho a 23±1 °C
Reagente POD-1	Pipeta 1 mL
Tiras analíticas	Pipeta 4 mL
Microcélula	Bastão de vidro
Amostra de leite (> 1 mL)	Papel absorvente

Temperatura ambiente: 20-25°C

Instruções:

Preparar banho para manter a microcélula a 23 °C.

Adicionar ao recipiente de teste: 1,0 mL da amostra de leite e 4,0 mL de água destilada.

Agitar com o bastão de vidro.

Aguardar temperatura de 23±1 °C.

Ligar Reflectoquant (ON/OFF), selecionar o teste (TEST) e pressionar START. O mostrador indica 180 s.

Rapidamente, em seqüência: pingar 5 gotas de POD-1 no recipiente, agitar com o bastão, inclinar o recipiente, mergulhar a tira e neste instante apertar o botão START (contagem regressiva de 180 s começa). Após 2 s, retirar a tira do recipiente e agitar (6x) para remover o excesso de líquido. Deixar a tira dentro da microcélula a 23 °C. Confirmar temperatura com um sensor termopar.

Quando faltar 10 s para o térmico do tempo de reação, inserir a tira no adaptador com a face voltada para o mostrador. Quando faltar 5 s o aparelho emite um beep e no instante 0 s faz a leitura da tira. O valor é apresentado em U/L.

Notas:

- Faixa de leitura: 5 – 200 U/L
- Fechar reagentes e tubo de tiras imediatamente após o uso.
- Ao final, remover o adaptador de tiras do Reflectoquant, lavá-lo com água destilada e secar.
- Guardar o kit em geladeira (2-8 °C).

REFLECTOQUANT – Teste de Fosfatase Alcalina em leite

Material:

Reflectoquant

Amostra de leite (> 3 mL)

Recipiente de teste

Banho a 37±1 °C

Microcélula

Pipeta 3 mL

Reagente ALP-1 preparado

Bastão de vidro

Reagente ALP-3

Papel absorvente

Tiras analíticas

Temperatura ambiente: 20-25°C

Preparação do reagente ALP-1:

Despejar conteúdo de ALP-2 em ALP-1, encaixar o gotejador, tampar e agitar.

ALP-1 tem agora validade de 6 semanas.

Instruções:

Colocar 15 gotas (0,9 mL) de ALP-1 na microcélula e deixar no banho a 37 °C.

Trazer o frasco do reagente ALP-3 a temperatura ambiente (20-25°C).

Colocar 2,0 mL da amostra de leite no recipiente, a temperatura ambiente (20-25°C).

Adicionar 4 gotas de ALP-3 ao recipiente e agitar com o bastão de vidro.

Inclinar o recipiente e mergulhar a tira para molhar as zonas de reação.

Após 2 s retirar a tira do recipiente, agitá-la (6x) para remover o excesso de líquido, inseri-la na microcélula e ativar o cronômetro.

No instante 19,5 min, ligar o Reflectoquant (ON/OFF), selecionar o teste (TEST) e pressionar START. O mostrador indica 5 s.

Exatamente no instante 20 min, retirar a tira da microcélula, agitá-la (6x), inseri-la no adaptador com a face voltada para o mostrador e pressionar START.

Após a contagem de 5 s, ler o resultado em U/L.

Notas:

- Para medidas em série, esvaziar microcélula e refazer o procedimento.

- Faixa de leitura: 1 – 10 U/L

- Fechar reagentes e tubo de tiras imediatamente após o uso.

- Ao final, remover o adaptador de tiras do Reflectoquant, lavá-lo com água destilada e secar.

- Guardar o kit em geladeira (2-8 °C).