

LUCAS DE ASSIS QUEMELLI

**Desenvolvimento de um integrador de tempo e temperatura com a fosfatase alcalina
para investigação do impacto térmico de processos de pasteurização de alimentos
líquidos**

São Paulo

2020

LUCAS DE ASSIS QUEMELLI

Desenvolvimento de um integrador de tempo e temperatura com a fosfatase alcalina para investigação do impacto térmico de processos de pasteurização de alimentos líquidos

Versão Original

Dissertação apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Engenharia Química.

Orientador: Professor Dr. Jorge Andrey Wilhelms Gut.

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-publicação

Quemelli, L. A.

Desenvolvimento de um integrador de tempo e temperatura com a fosfatase alcalina para investigação do impacto térmico de processos de pasteurização de alimentos líquidos / L. A. Quemelli -- São Paulo, 2020. 60 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.Cinética de inativação enzimática 2.Fosfatase alcalina 3.TTI 4.Micro ondas I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

Dedico este trabalho aos meus pais, Penha e Hélio, às minhas irmãs, Josi e Chris, e aos meus amigos Douglas e Ricardo, com afeto e admiração.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio da Coordenação de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processos 2013/07914-8 e 2014/17534-0). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo 459177/2014-1).

Ao orientador Professor Dr. Jorge Andrey Wilhelms Gut pela oportunidade, pela paciência e pelas consistentes soluções para os problemas – que não foram poucos.

A todos os amigos e especialmente ao Douglas, ao Ricardo e ao Otávio que o tempo e a distância (e as redes sociais) não impedem de estarem presentes (de uma forma ou de outra).

A todos os colegas e amigos de laboratório e especialmente à Flávia e ao Matheus, por serem tão amigáveis e gentis; ao Tiago, ao Eduardo e ao Kaiky pelas mais prestativas ajudas em todos os momentos de dúvidas (e desespero); à Giulliana pelas longas e incansáveis conversas; à Larissa, por ser de humanas não praticante e trazer um ar diferente ao ambiente de trabalho; e, por fim e muito importante, à Mirian por ser tão afável e prestativa.

A todos os funcionários do LEA e do FoRC, em especial à Vanessa, ao Ivan e à Cláudia por tornarem os momentos de café mais divertidos. À Professora Dr^a. Carmen Tadini por todo o ensinamento, sobretudo pelas palavras certas nos momentos inesperados.

Aos meus pais, Penha e Hélio, às minhas irmãs, Josi e Chris, de onde as ajudas mais importantes vieram até aqui e hoje. À família de São Paulo, Gabriela e Matheus, que me acolheram e tornaram meus dias mais leves, interessantes e suportáveis. À Heveline, por estar presente de todas as formas (sim!) por toda a minha vida – embora não o tempo todo.

RESUMO

O processamento térmico de alimentos líquidos consiste na inativação de microrganismos patogênicos, deterioradores e/ou enzimas indesejáveis a altas temperaturas. A avaliação desse processamento pode ser feita utilizando um integrador de tempo e temperatura (TTI). O TTI é um componente termicamente sensível que, intrínseco ou extrínseco ao alimento, permite a determinação do impacto de um processo térmico para obter um alimento seguro. O objetivo deste trabalho foi utilizar a enzima fosfatase alcalina (ALP), em tampão carbonato (força iônica 88 mM) sem sacarose e com sacarose no valor de 10 °Brix, como TTI, para avaliar processos de pasteurização de alimentos líquidos de baixa viscosidade (sucos, leites, néctares e cervejas). A inativação térmica ocorreu entre 55 e 70 °C (sem sacarose) e entre 50 a 95 °C (com sacarose). O tratamento térmico foi realizado utilizando minirreator com micro-ondas focalizadas, a 2450 MHz, em tempos de retenção entre 5 s e 10 min. Para avaliar a atividade enzimática, o método 979.13 da AOAC foi adaptado. A partir da curva de calibração de indofenol com concentrações até 12,0 µg de indofenol/mL da solução enzimática, foi determinada a redução da atividade das soluções dos indicadores enzimáticos com ALP na concentração de 4,0 mg/L. As amostras processadas no minirreator tiveram suas atividades determinadas, conforme o método, utilizando espectrofotômetro UV-Vis a 650 nm e a regressão linear da curva padrão. O modelo cinético *D-z* (primeira ordem com dois componentes) apresentou bom ajuste, confirmado pelos coeficientes de determinação (0,97, sem sacarose; 0,99, com sacarose) e pelos gráficos de paridades. O indicador sem sacarose apresentou valores de *z* iguais a 14,0 °C (resistente) e 4,1 °C (lábil) e o indicador com sacarose apresentou valores iguais a 10,0 °C para ambas as frações – este último com resistência adequada para ser utilizado como TTI em processos térmicos de alimentos líquidos. O indicador sem sacarose pode ser usado para avaliação de sub e sobreprocessamento de processos de pasteurização HTST devido às suas frações termorresistente e termolábil, desde que seja usado em temperaturas até 70 °C. O indicador com sacarose apresentou potencial para ser usado como TTI em processos de pasteurização HTST de alimentos líquidos de baixa viscosidade, como sucos, leites, cervejas e néctares, devido à sua maior resistência térmica. Mas está restrito a temperaturas próximas a 70 °C.

Palavras-chave: Cinética. Enzima. Micro-ondas. Suco de frutas. Tratamento térmico.

ABSTRACT

The thermal processing of liquid foods consists of inactivating pathogenic microorganisms, spoilers and undesirable enzymes at high temperatures. The evaluation of this processing can be done using a time and temperature integrator (TTI). TTI is a thermally sensitive component that, intrinsic or extrinsic to the food, allows the determination of the impact of a thermal process to obtain a safe food. The objective of this work was to use the enzyme alkaline phosphatase (ALP), in carbonate buffer (ionic strength 88 mM) without sucrose and with sucrose in the value of 10 ° Brix, as TTI, to evaluate pasteurization processes of low viscosity liquid foods (juices, milks, nectars and beers). Thermal inactivation occurred between 55 and 70 ° C (without sucrose) and between 50 and 95 ° C (with sucrose). The thermal treatment occurred using a mini-reactor with focused microwaves, at 2450 MHz, in holding times between 5 s and 10 min. To assess enzyme activity, AOAC method 979.13 was adapted. From the indophenol calibration curve with concentrations up to 12.0 µg of indophenol/mL of the enzyme solution, it was determined a reduction in the activity of the solutions of the enzymatic indicators with ALP at a concentration of 4.0 mg/L. The samples processed in the minireactor had their activities determined, according to the method, using UV-Vis spectrophotometer at 650 nm and linear regression of the standard curve. The D-z kinetic model (first order with two components) showed a good fit, confirmed by the correlation coefficients (0.97, without sucrose; 0.99, with sucrose) and by the parity charts. The sucrose-free indicator showed z values equal to 14.0 ° C (resistant) and 4.1 ° C (labile) and the sucrose indicator showed values equal to 10.0 ° C for both fractions – suitable resistance for use as TTI in liquid food thermal processes. The sucrose-free indicator can be used to evaluate the under and over-processing of HTST pasteurization processes due to its thermoresistant and thermolabile fractions, as long as it is used at temperatures up to 70 ° C. The sucrose indicator has the potential to be used as TTI in HTST pasteurization processes of low viscosity liquid foods, such as juices, milks, beers and nectars, due to its greater thermal resistance. But it is restricted to temperatures close to 70 ° C.

Keywords: Kinetics. Enzyme. Microwave. Fruit juice. Heat treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Esquema de trocador de calor a placas.....	20
Figura 3.2 – Esquema de trocador de calor a placas com três seções de troca térmica e tubo de retenção.....	20
Figura 3.3 – O espectro eletromagnético.....	22
Figura 3.4 – Atuação de fosfatases com o substrato de fenil fosfato.....	26
Figura 4.1 – Minirreator Discover Reflux (CEM, EUA).....	34
Figura 4.2 – Esquema da seção transversal do reator Discover Reflux (CEM, EUA).....	35
Figura 4.3 – Reação de fenol com CQC para formar indofenol.....	37
Figura 4.4 – Sistema de medição de temperatura: sensor de fibra óptica Fluoroptic STF-1M (LumaSense Technologies, EUA), dentro de um tubo de ensaio, conectado ao termômetro de fibra óptica Luxtron 812 (LumaSense Technologies, EUA).....	40
Figura 4.5 – Esquema de tratamento térmico descontínuo utilizando aquecimento por micro-ondas.....	40
Figura 5.1 – Históricos de tempo-temperatura para o processamento térmico por micro-ondas do indicador sem sacarose a 55 °C (A) e a 60 °C (B).....	43
Figura 5.2 – Históricos de tempo-temperatura para o processamento térmico por micro-ondas do indicador sem sacarose a 65 °C (A) e a 70 °C (B).....	44
Figura 5.3 (A) e (B) – Históricos de tempo-temperatura para o processamento térmico por micro-ondas do indicador com sacarose a 50 °C (A) e a 60 °C (B).....	45
Figura 5.3 (C) e (D) – Históricos de tempo-temperatura para o processamento térmico por micro-ondas do indicador com sacarose a 70 °C (A) e a 80 °C (B).....	46
Figura 5.4 – Históricos de tempo-temperatura para o processamento térmico por micro-ondas do indicador com sacarose a 90 °C (A) e a 95 °C (B).....	47
Figura 5.5 – Curva de calibração com diferentes concentrações de indofenol em água destilada, utilizada para determinar a atividade da enzima ALP em solução tampão.....	48
Figura 5.6 – Atividade residual do indicador sem sacarose com o tempo de retenção, para as temperaturas de 55 °C (A), 60 °C (B), 65 °C (C) e 70 °C (D).....	49
Figura 5.7 – Atividade residual do indicador com sacarose pelo tempo de retenção, para as temperaturas de 50 °C (A), 60 °C (B), 70 °C (C) e 80 °C (D).....	50
Figura 5.8 - Atividade residual do indicador com sacarose pelo tempo de retenção, para as temperaturas de 90 °C (A) e 95 °C (B).....	51
Figura 5.9 – Gráfico de paridade (A) para a previsão da atividade residual do indicador de fosfatase alcalina em tampão carbonato e curvas de inativação (B) em diferentes temperaturas para o modelo ajustado.....	52

Figura 5.10 - Gráfico de paridade (A) para a previsão da atividade residual do indicador de fosfatase alcalina em tampão carbonato com sacarose e curvas de inativação (B) em diferentes temperaturas para o modelo ajustado.....53

Figura 5.11 – Curvas de inativação térmica da fosfatase alcalina, a 70 °C, em diferentes meios e formas de aquecimento.....54

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Energias de ligações moleculares e interação iônica.....	23
Tabela 4.1 – Soluções padrão de fenol para elaborar a curva padrão de indofenol.....	38
Tabela 5.1 – Parâmetros cinéticos ajustados, do modelo <i>D-z</i> , para a inativação térmica da ALP a 70 °C.....	54

LISTA DE SÍMBOLOS

A_0	Atividade enzimática inicial [U/L]
A	Atividade enzimática a qualquer tempo [U/L]
AU	Absorbância [-]
C	Concentração de indofenol [$\mu\text{g/mL}$]
D	Tempo de redução decimal da atividade enzimática [s]
D_{ref}	Tempo de redução decimal na temperatura de referência [s]
F	Tempo equivalente ao processo isotérmico, a uma T_{ref} [s]
k	Constante cinética da reação [s^{-1}]
L	Função letalidade [-]
SV	Valor de esterilização, número de reduções decimais [-]
t	Tempo [s]
T	Temperatura [$^{\circ}\text{C}$]
T_{ref}	Temperatura de referência para o processo térmico [$^{\circ}\text{C}$]
z	Varição da temperatura para provocar uma redução de 90 % no valor- D [$^{\circ}\text{C}$]

Símbolos gregos

α	Fração inicial da atividade isoenzima termorresistente [-]
----------	------------------------------------------------------------

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 PROCESSAMENTO TÉRMICO DE ALIMENTOS	18
3.1.1 <i>Processamento térmico convencional</i>	19
3.1.2 <i>Processamento térmico de alimentos assistido por micro-ondas</i>	21
3.1.3 <i>Efeitos não térmicos das micro-ondas</i>	22
3.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	24
3.2.1 <i>Fosfatase alcalina (ALP)</i>	25
3.3 INTEGRADORES DE TEMPO-TEMPERATURA (TTIs)	28
3.4 CINÉTICA DE INATIVAÇÃO TÉRMICA	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 EQUIPAMENTOS PARA PROCESSAMENTO TÉRMICO	34
4.2 ESTUDO DA CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DOS INDICADORES ENZIMÁTICOS.....	35
4.2.1 <i>Preparação dos indicadores enzimáticos a serem usados como TTI</i>	35
4.2.2 <i>Determinação da atividade enzimática dos indicadores</i>	36
4.2.3 <i>Curva de calibração de indofenol</i>	38
4.2.4 <i>Tratamento térmico descontínuo por micro-ondas</i>	39
4.2.5 <i>Modelo cinético</i>	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 PERFIS DE TEMPO-TEMPERATURA DOS INDICADORES	42
5.1.1 <i>Fosfatase alcalina em tampão carbonato (indicador sem sacarose)</i>	42
5.1.2 <i>Fosfatase alcalina em tampão carbonato com sacarose (indicador com sacarose)</i>	44
5.2 ATIVIDADES RESIDUAIS PARA OS TRATAMENTOS TÉRMICOS APLICADOS AOs INDICADORES.....	47
5.2.1 <i>Fosfatase alcalina em tampão carbonato (indicador sem sacarose)</i>	48

5.2.2 Fosfatase alcalina em tampão carbonato (indicador com sacarose)	49
5.3 AJUSTE DO MODELO CINÉTICO	51
5.3.1 Fosfatase alcalina em tampão carbonato (indicador sem sacarose).....	51
5.3.2 Fosfatase alcalina em tampão carbonato (indicador com sacarose)	52
5.3.3 Comparação dos parâmetros ajustados com parâmetros obtidos na literatura.....	53
6 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

O processamento térmico de alimentos líquidos é um dos métodos físicos mais utilizados para obter um alimento inócuo e estável. Esse método consiste na inativação de microrganismos patogênicos, microrganismos deterioradores e/ou enzimas indesejáveis a altas temperaturas. Contudo, o superaquecimento pode afetar características sensoriais como cor, sabor e textura, e causar a perda de nutrientes (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007).

Uma das técnicas de processamento térmico é a pasteurização contínua HTST (*high temperature short time*) de alimentos líquidos, que apresenta aquecimento abaixo de 100 °C e tempo de tratamento que depende do microrganismo ou da enzima alvo no alimento (por exemplo, 72 °C e 15 s para *Mycobacterium tuberculosis* no leite de vaca). A pasteurização tem como propósito a obtenção de um alimento inócuo e a extensão do prazo de validade, com reduzido impacto sobre as características sensoriais e nutricionais (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007; LEWIS; HEPPELL, 2000; PEREIRA; VICENTE, 2010; TOWLER, 1994).

Para o projeto e o dimensionamento de uma unidade de pasteurização contínua, geralmente, considera-se a letalidade da partícula mais rápida, correspondente à velocidade máxima no centro do tubo de retenção. Essa consideração resulta no tempo mínimo de residência. Quando inclusa com outras hipóteses, tais como temperatura constante e inativação térmica apenas dentro do tubo de retenção, o dimensionamento se torna mais simples e há margem de segurança. Essas hipóteses simplificadoras causam superdimensionamento, tendo, como resultado, um produto sobre-processado, de menor qualidade sensorial e nutricional. (AGUIAR; GUT, 2014; GRIJSPEERDT et al., 2004; GUT et al., 2005; GUTIERREZ; DIAS; GUT, 2010; JUNG; FRYER, 1999).

Para minimizar esse problema, estudos são direcionados para melhorar as técnicas de conservação de alimentos líquidos. Nesse sentido, é importante que seja feita a avaliação do impacto real de um processo térmico. A avaliação da pasteurização de alimentos líquidos pode ser feita teoricamente, pela análise do perfil de temperatura e da distribuição do tempo de residência, juntamente com a cinética da mudança térmica. De forma alternativa, a avaliação também pode ser realizada, experimentalmente, utilizando um integrador de tempo e temperatura (TTI, *time-temperature integrator*) (LEWIS; HEPPELL, 2000; VAN LOEY et al., 1996).

Para a primeira opção de avaliação da pasteurização, o histórico de temperatura é necessário, o qual pode ser determinado a partir de medições na planta do processo e da avaliação da distribuição do tempo de residência (DTR). Em seguida, a avaliação da pasteurização é calculada associando esses dados com a cinética de mudança térmica. Opcionalmente, o histórico pode ser determinado pela simulação do modelo de transferência de calor (temperaturas) e de escoamento (tempo de residência) que represente as condições do processo (AGUIAR; GUT, 2014; GEORGIADIS; MACCHIETTO, 2000; GUT; PINTO, 2005).

Um TTI também pode ser usado para avaliação do impacto do processo térmico. O TTI é um componente termicamente sensível que, intrínseco ou extrínseco ao alimento, permite a determinação do impacto de um processo em termos de segurança ou de qualidade, a partir de um atributo-alvo, de forma rápida e relativamente fácil. As mudanças que ocorrem no TTI devem ser irreversíveis e similares àquelas do atributo-alvo. Um TTI enzimático é usado para avaliar a segurança do alimento e apresenta uma mudança em sua atividade. A sua maior vantagem, em relação aos métodos já descritos, é a capacidade de quantificar o impacto da temperatura e do tempo integrados quando não se tem conhecimento do histórico de tempo-temperatura do produto. Os impactos avaliados utilizando os dois métodos reportados – a partir dos dados de tempo-temperatura do produto associados à cinética de inativação térmica e pelo TTI – precisam estar de acordo entre si (HENDRICKX et al., 1995; TAOUKIS; LABUZA, 1989; VAN LOEY et al., 1996; VAN LOEY et al., 1999).

O uso de um TTI para avaliar o impacto de um processo térmico tem sido relatado por muitos pesquisadores. Por exemplo, Raviyan et al. (2003) desenvolveram um TTI enzimático com α -amilase, imobilizada em gel de poliacrilamida (partículas em suspensão), em tampão fosfato. O objetivo foi o desenvolvimento de um TTI que suas propriedades dielétricas fossem semelhantes às de alimentos e que pudesse ser usado em aquecimentos por micro-ondas na faixa de temperatura de 7–65 °C. As propriedades dielétricas foram medidas usando analisador de rede nas frequências 915 e 2450 MHz. A atividade da enzima foi determinada por método espectrofotométrico. Os pesquisadores confirmaram que o TTI desenvolvido é adequado para pasteurização de alimentos líquidos por micro-ondas. Contudo, a faixa de temperatura (até 65°C) impede que o TTI desenvolvido seja utilizado para avaliar processos térmicos de sucos, que necessitam de maiores temperaturas. Para uma inativação de 95 % da pectinametilesterase (suco de laranja), por micro-ondas, é necessária uma temperatura de, no mínimo, 69 °C, por exemplo. Para o processamento do suco, são necessárias temperaturas por volta de 90 °C e tempos entre 60 e 90 s (DEMIRDÖVEN; BAYSAL, 2015).

De forma similar, Aguiar, Yamashita e Gut (2012) testaram TTIs baseados na atividade das enzimas peroxidase, lactoperoxidase e fosfatase alcalina, todas em tampão fosfato. A determinação da atividade foi feita por método reflectométrico comercial portátil, utilizando o sistema Reflectoquant® (Merck, Darmestádio, Alemanha). Os autores concluíram que apenas a enzima fosfatase alcalina (ALP) tem potencial para ser usada como TTI sob condições de pasteurização de leite e sucos (com aquecimento convencional na faixa de 60–85 °C), considerando sua inativação parcial, seus parâmetros cinéticos, seu baixo custo e os testes de validação. O sistema Reflectoquant® não está mais comercialmente disponível, sendo necessária a utilização de outros métodos para a determinação da atividade da ALP.

Schmidt e Mayer (2018) estudaram, a aplicação da vitamina B₆ (após conversão, inativação, ligação e outras reações), natural do leite de vaca, como TTI. Os autores utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência para avaliar o teor restante da vitamina no leite após tratamento térmico. Os autores concluíram que há necessidade de estudos cinéticos e de todas as reações relevantes, incluindo experimentos em escala industrial, para estabelecer o uso da vitamina B₆ como TTI no leite de vaca.

O conhecimento sobre microrganismos e enzimas e suas relações com o alimento fornece parâmetros para calcular os tempos de processamento para obtenção de alimentos inócuos e estáveis. A utilização de um modelo cinético adequado, para prever a atividade residual de uma enzima em um processo térmico, permite a determinação do tempo de processamento para obter um alimento próprio para consumo. Os parâmetros da cinética de inativação térmica e as propriedades termofísicas do alimento são fundamentais para se obter um modelo que represente o processo (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007; GUT; TADINI, 2016).

Embora TTIs tenham sido desenvolvidos para avaliar processos térmicos convencionais, ainda são necessários estudos para avaliar processos com tecnologias de aquecimento alternativas. Portanto, foi proposto neste trabalho o desenvolvimento de um TTI, com a fosfatase alcalina em tampão carbonato (sem sacarose e com sacarose 10 °Brix), submetido ao processo térmico por micro-ondas (frequência 2450 MHz) com faixa de 50 a 95 °C. Um TTI em solução aquosa pode ser utilizado para avaliar o processamento térmico de líquidos com propriedades termo-físicas próximas às da água. Assim, o TTI foi desenvolvido para avaliar processos térmicos de líquidos de baixa viscosidade, tais como sucos, leites, cervejas e néctares.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram desenvolver um TTI enzimático a partir da fosfatase alcalina, de fonte comercial, para avaliar o impacto térmico de processos de pasteurização de alimentos líquidos de baixa viscosidade, assistida por micro-ondas. Para tanto, propuseram-se submeter amostras a tratamento térmico por micro-ondas e determinar a atividade enzimática, por método espectrofotométrico. Por fim, obter os parâmetros cinéticos de inativação.

Para atendimento da proposta, foram considerados os seguintes objetivos específicos:

1. Determinar a atividade enzimática dos indicadores submetidos a processamento térmico por micro-ondas;
2. Ajustar o modelo cinético e determinar seus parâmetros a partir da minimização do somatório do erro quadrático entre a atividade residual calculada e a experimental;
3. Avaliar a qualidade do ajuste a partir do digrama de paridade que correlaciona os valores de atividade residual calculada e experimental e por coeficiente de determinação (R^2);
4. Validar o TTI enzimático da fosfatase alcalina com base nos parâmetros cinéticos z termorresistente e D lábil.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PROCESSAMENTO TÉRMICO DE ALIMENTOS

O processamento térmico é um dos métodos mais importantes na preservação de alimentos. Ela consiste em combinações de tempo e alta temperatura, que variam conforme a técnica a ser utilizada e o produto que se deseja processar. O objetivo é a inativação de patógenos microbianos e também microrganismos e enzimas que deterioram o alimento (RAMASWAMY; MARCOTTE, 2006; SARAVACOS; MAROULIS, 2011).

Processos térmicos envolvendo alimentos tiveram início nos tempos das guerras napoleônicas (1799 a 1815). O calor pode ocasionar algumas alterações indesejáveis em aspectos sensoriais e nutritivos, como mudanças na cor e no sabor e perda de vitaminas. Por isso, além da preservação de alimentos, buscam-se técnicas para garantir produtos com qualidades sensoriais e nutritivas (FELLOWS, 2006; GUT; TADINI, 2016; SARAVACOS; MAROULIS, 2011).

Combinações de tempo-temperatura são o que definem os três principais processos térmicos: pasteurização, esterilização comercial e branqueamento. A pasteurização é um tratamento térmico que ocorre a temperaturas abaixo de 100 °C. Essa técnica é usada para minimizar perigos para a saúde do consumidor e aumentar o prazo de validade, por inativação térmica de microrganismos e enzimas, seguida de armazenamento sob refrigeração (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007; LEWIS; HEPPELL, 2000; RAMASWAMY; MARCOTTE, 2006; SARAVACOS; MAROULIS, 2011).

A esterilização comercial é usada como um tratamento mais intenso, acima de 100 °C, com o objetivo de inativar microrganismos deterioradores e principalmente patogênicos. Esse processamento permite o armazenamento do alimento em recipiente à temperatura ambiente (AHMED; RAHMAN, 2012; AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007; LEWIS; HEPPELL, 2000; RAMASWAMY; MARCOTTE, 2006).

O branqueamento tem condições de temperatura e tempo similares à pasteurização. Contudo, alimentos líquidos não são alvo do branqueamento que, geralmente, é usado para inativar enzimas oxidativas em frutas e vegetais. Esse processo resulta em características indesejáveis, como mudanças no valor nutritivo, na cor e no sabor durante o armazenamento (RAMASWAMY; MARCOTTE, 2006; SARAVACOS; MAROULIS, 2011; SINGH; HELDMAN, 2009).

A pasteurização é uma alternativa adequada aos outros métodos de processamento térmico para obter um alimento seguro e que satisfaça aos consumidores. Um dos processos

permitidos de pasteurização é o contínuo de curta duração HTST (*high temperature short time*). A sua aplicação é destinada a alimentos líquidos para serem submetidos a altas temperaturas por períodos curtos. Por exemplo, são necessários 72 °C por 15 s para inativar o microrganismo-alvo do leite de vaca (*Mycobacterium tuberculosis*) e 88 °C por 15 s para inativar enzimas presentes em alguns sucos de frutas (pectinesterase e poligalacturonase) (HEPPELL, 2000; LEWIS; RAMASWAMY; MARCOTTE, 2006; TOWLER, 1994).

Por outro lado, quando o objetivo é estender o prazo de validade e inativar esporos termorresistentes, utiliza-se o processo de esterilização comercial UHT (*ultra high temperature*). Nessa técnica, o alimento é submetido a um tratamento térmico com temperaturas mais altas, como é o caso do processamento do leite que ocorre acima de 135 °C (LEWIS; HEPPELL, 2000; RAMASWAMY; MARCOTTE, 2006).

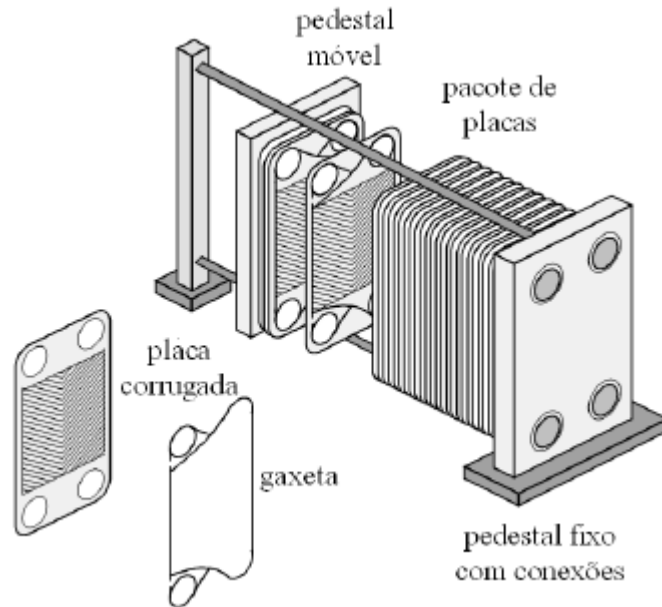
O projeto de uma unidade de processamento térmico requer conhecimento das técnicas do processo, do comportamento térmico do produto e do impacto sobre o atributo-alvo. Tais conhecimentos incluem: características físicas do produto, como propriedades termofísicas do produto; a resistência térmica do atributo-alvo no alimento; o pH e o teor de sólidos (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007).

3.1.1 Processamento térmico convencional

Para o processamento térmico convencional de alimentos líquidos nas indústrias, geralmente, utilizam-se trocadores de calor e processo em fluxo contínuo. Estes são equipamentos usados para realizar troca térmica entre duas ou mais correntes de fluidos com temperaturas diferentes, sem ocorrer mistura entre os fluidos. Os trocadores de calor a placas são muito utilizados em indústrias de alimentos para pasteurização contínua de alimentos líquidos de baixa viscosidade, tais como laticínios, sucos, cervejas, vinhos, misturas de sorvete e cremes (FELLOWS, 2006; GUT; SONG, 2016; LEWIS; HEPPELL, 2000).

O trocador a placas é formado por uma série de placas finas, de aço inoxidável, que são mantidas juntas em uma armação de metal. Elas formam canais paralelos por onde são bombeados o alimento e os fluidos com temperaturas diferentes. Para evitar a mistura dos fluidos de troca térmica com o alimento, as placas são seladas e separadas por uma borracha sintética de nome gaxeta. As placas são, em geral, corrugadas para induzir turbulência no líquido e melhorar a eficiência da troca térmica (FELLOWS, 2006; GUT; SONG, 2016). Pode ser observado na Figura 3.1 um esquema de trocador de calor a placas.

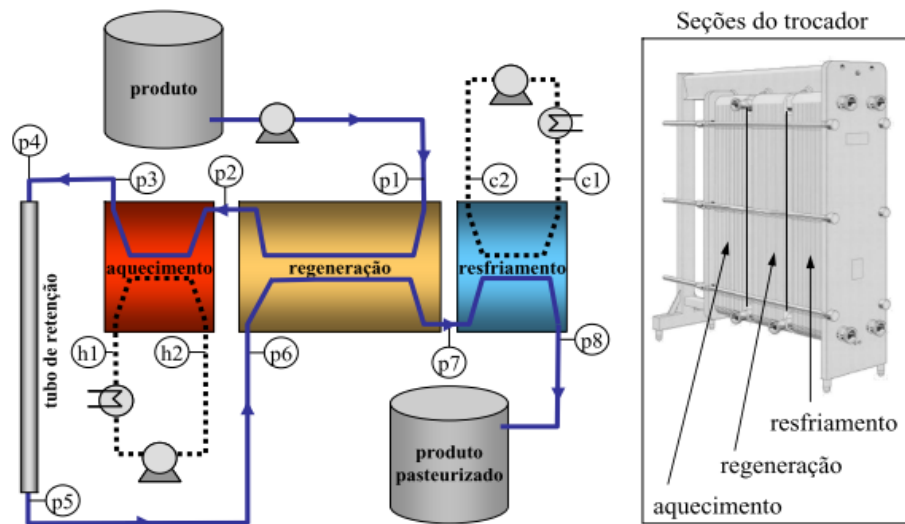
Figura 3.1 – Esquema de trocador de calor a placas.



Fonte: Gut e Pinto (2009).

Está presente na Figura 3.2 um esquema de trocador de calor a placas com três seções de troca térmica e um tubo de retenção. O tubo de retenção é dimensionado para o produto ser submetido ao efeito letal desejado (tempo e temperatura).

Figura 3.2 – Esquema de trocador de calor a placas com três seções de troca térmica e tubo de retenção.



Fonte: Gut e Pinto (2009).

As principais vantagens do uso desse tipo de trocador são alta eficiência térmica e facilidade de higienização. Esse trocador também permite uma grande variedade de arranjos de escoamento e tem boa flexibilidade no ajuste da área de troca térmica, pela configuração das placas. Uma desvantagem é o tempo de vida útil das gaxetas – limitadas a determinadas temperaturas (abaixo de 300 °C) e pressões (abaixo de 2000 kPa) (GUT; SONG, 2016; LEWIS; HEPPELL, 2000).

Alternativas aos métodos convencionais de aquecimento têm sido estudadas a fim de produzir alimentos inócuos e com melhores qualidades nutricionais (vitaminas) e sensoriais (cor, sabor e aroma). Essas alternativas incluem processamentos térmicos e não térmicos, e podem ser: processamento por alta pressão, campo elétrico pulsado, luz ultravioleta, e aquecimentos ôhmico, por infravermelho, por rádio frequência ou por micro-ondas (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007; CULLEN; TIWARI; VALDRAMIDIS, 2012; RAMASWAMY; MARCOTTE, 2006).

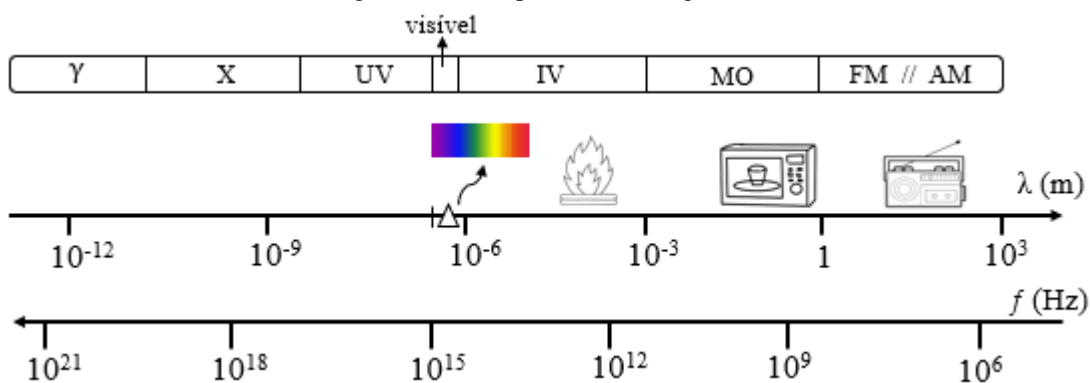
3.1.2 Processamento térmico de alimentos assistido por micro-ondas

A utilização de micro-ondas para aquecimento de alimentos foi patenteada pela companhia Raytheon, em 9 de outubro 1945, com estudos feitos por P. L. Spencer. Em 1952, Spencer desenvolveu o primeiro forno de micro-ondas industrial. A aplicação de fornos micro-ondas para uso doméstico só aconteceu nos anos 1970 e 1980, após avanços tecnológicos (LOUPY, 2006; TEWARI; JUNEJA, 2007).

A tecnologia de aquecimento por micro-ondas é uma alternativa promissora comparada aos métodos convencionais de processamento térmico de alimentos líquidos de fluxo contínuo. Suas vantagens a esses métodos incluem: faixas de temperatura maiores, ativação ou desativação do sistema instantaneamente (maior eficiência energética) e velocidade de aquecimento alta – o tempo para alcançar a temperatura desejada costuma ser um quarto de tempo dos métodos convencionais, levando à inativação térmica de enzimas e microrganismos, e reduzindo a degradação térmica de parâmetros de qualidades nutricionais e sensoriais. Devido às vantagens do processamento por micro-ondas, espera-se um aumento do uso dessa tecnologia nas indústrias de alimentos nos próximos anos (CORONEL et al., 2005; CULLEN; TIWARI; VALDRAMIDIS, 2012; DATTA; ANANTHESWARAN, 2001; LOUPY, 2006; SCHUBERT; REGIER, 2005; TEWARI; JUNEJA, 2007).

No espectro eletromagnético, as micro-ondas estão entre a radiação infravermelha e as frequências de rádio (Figura 3.3). As micro-ondas se localizam na faixa de frequência de 300 MHz a 300 GHz, e têm comprimentos de onda entre 1 cm e 1 m. Entretanto, sua aplicação para processamento de alimentos é mais comum nas frequências de 915 e 2450 MHz, de acordo com a Comissão Federal de Comunicações (FCC, *Federal Communications Commission*) dos Estados Unidos, a fim de evitar interferências nas ondas de rádio para telecomunicações (AHMED; RAMASWAMY, 2007; DATTA; ANANTHESWARAN, 2001; LOUPY, 2006; SCHUBERT; REGIER, 2005; TEWARI; JUNEJA, 2007).

Figura 3.3 – O espectro eletromagnético.



Fonte: Adaptado de Loupy (2006).

A técnica de aquecimento por micro-ondas utiliza a capacidade de materiais dielétricos em absorver energia eletromagnética e dissipá-la como energia térmica. A energia térmica é produzida por dois mecanismos em alimentos líquidos: movimentação iônica e rotação de dipolo. A movimentação iônica ocorre quando íons em solução adquirem energia cinética como resposta a um campo elétrico aplicado. A colisão desses íons converte energia cinética em calor. A rotação de dipolo ocorre quando há alinhamento das moléculas polares, que estavam orientadas aleatoriamente, em direção ao campo elétrico. O campo elétrico oscila em alta frequência durante o aquecimento (até 2,45 bilhões de vezes por segundo em 2450 MHz). Conseqüentemente, esse fenômeno provoca fricção das moléculas, resultando em aquecimento volumétrico (AHMED; RAMASWAMY, 2007; DATTA; ANANTHESWARAN, 2001; LOUPY, 2006; TEWARI; JUNEJA, 2007).

Processos de aquecimentos contínuos por radiação de micro-ondas têm sido estudados por pesquisadores a fim de gerar aquecimento rápido do produto, aquecimento volumétrico significativo e menores custos de produção. James H. Kluck apresentou, pela primeira vez, em 1970, um sistema de aquecimento de alimentos líquidos por micro-ondas. Ele produziu um equipamento que utilizava micro-ondas, três seções de trocadores de calor e um tubo de retenção. Os custos operacionais foram reduzidos com o desenvolvimento de um sistema que aproveitava o calor residual de um trocador de calor para um pré-aquecedor (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007; KLUCK, 1970).

3.1.3 Efeitos não térmicos das micro-ondas

Hugh Fleming sugeriu, em 1944, a existência de efeitos não térmicos das micro-ondas, sobre a inativação da bactéria *Escherichia coli*. Estudos são conduzidos, desde então, com diferentes procedimentos experimentais, técnicas e sistemas biológicos, a fim de avaliar efeitos térmicos e não térmicos do aquecimento assistido por micro-ondas. No entanto, ainda não há

uma clara definição do que ocasiona esses efeitos em processamento de alimentos. Sendo, portanto, necessários mais estudos para esclarecimento (DATTA; ANANTHESWARAN, 2001; FLEMING, 1944; SHAHEEN et al., 2012; TEWARI; JUNEJA, 2007).

Apesar de alguns pesquisadores identificarem a presença de efeitos não térmicos das micro-ondas, outros contestam. A justificativa está na incompatibilidade entre a energia dos fótons da radiação por micro-ondas e a energia das ligações moleculares e de interação iônica. A energia quântica de um fóton com frequência $f = 2,45$ GHz é definida pela lei de Planck ($E = h \cdot f$) como $1 \cdot 10^{-5}$ eV. Quando comparada aos valores da Tabela 3.1, nota-se que as micro-ondas não seriam capazes de promover alterações químicas em microrganismos ou enzimas (LOUPY, 2006; SHAHEEN et al., 2012).

Tabela 3.1 – Energias de ligações moleculares e interação iônica.

Tipo de ligação/interação	Ligação de hidrogênio	Ligação covalente	Interação iônica
Energia (eV)	0,04 – 0,44	4,51 (C–H); 3,82 (C–C)	7,60

Fonte: Adaptado de Loupy (2006).

A forma de controle e de medição dos perfis de temperatura nos estudos são fatores que ocasionam controvérsias nos resultados de experimentos. O campo eletromagnético causa interferência em termopares e termômetros. O sensor de temperatura por fibra óptica é o mais adequado para o aquecimento por micro-ondas, com medição direta (temperatura exata), rápida resposta e alta precisão. O uso de fornos de micro-ondas domésticos, para a realização de experimentos, também é considerado inadequado. Esses equipamentos estão associados a desvantagens como controle de potência por ciclo *on-off*, sem controle de temperatura e distribuição não homogênea do campo eletromagnético durante o aquecimento. Dessa forma, a utilização desses equipamentos não é recomendada para propósitos científicos (KAPPE; PIEBER; DALLINGER, 2013; KAPPE, 2013; SHAHEEN et al., 2012).

Os efeitos do aquecimento por micro-ondas sobre microrganismos foram estudados por muitos pesquisadores. Por exemplo, Shamis et al. (2011) avaliaram os efeitos das micro-ondas, utilizando um reator com controle de frequência, sobre a bactéria *Escherichia coli*, em 18 GHz e com monitoramento da temperatura por sensor de fibra óptica. Os autores observaram, como efeito não térmico, que as interações eletromagnéticas afetaram a membrana celular da bactéria, provocando o vazamento de fluidos citoplasmáticos através dos poros. No entanto, Fujikawa, Ushioda e Kudo (1992) avaliaram a inativação da mesma bactéria, utilizando um forno de

micro-ondas doméstico, com frequência de 2,45 GHz e com temperatura controlada em banho termostaticado, e não observaram efeitos não térmicos.

Experimentos de tratamentos térmicos assistidos por micro-ondas também são realizados com enzimas. Xu et al. (2016) realizaram um estudo da cinética de inativação térmica, por micro-ondas e por aquecimento convencional, das enzimas lipase e lipoxigenase. Os autores utilizaram um reator de micro-ondas com temperatura controlada por banho termostaticado, frequência de 2,45 GHz, sensor de temperatura infravermelho e agitador magnético, na solução de cada enzima, para garantir aquecimento uniforme. Quando as formas de aquecimento foram comparadas, a radiação por micro-ondas não apresentou diferença significativa.

Porcelli et al. (1997) investigaram os efeitos não térmicos da radiação por micro-ondas sobre a inativação térmica das enzimas S-adenosilhomocisteína hidrolase e 5-metiloadenosina fosforilase, ambas em solução tampão de Tris-HCl. O trabalho foi realizado em um sistema de guia de ondas na frequência de 10,4 GHz, na faixa de 70 a 90 °C e as temperaturas foram registradas com auxílio de termopar e termômetro digital. Os autores observaram efeitos não térmicos das micro-ondas, a partir do rearranjo da estrutura química, sabendo que a temperatura não causaria tal efeito porque as enzimas são estáveis na faixa utilizada.

Lin e Ramaswamy (2011) estudaram a inativação térmica da fosfatase alcalina, utilizando forno de micro-ondas doméstico modificado para fluxo contínuo e aquecimento convencional em banho termostaticado. A frequência foi de 2,45 GHz e termopar foi usado para medir a temperatura na entrada, no meio e na saída do equipamento. Foi observado que a inativação térmica pelo forno de micro-ondas de fluxo contínuo ocorreu dez vezes mais rápida do que pelo aquecimento convencional. Contudo, não foram observados efeitos não térmicos, o que sugere a existência de efeitos adicionais associados com o aquecimento por micro-ondas, que eram dependentes da temperatura.

3.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Uma enzima pode ser definida como uma proteína com capacidades catalíticas e como um polipeptídeo que catalisa uma reação com certo grau de especificidade. O termo “enzima” deriva do grego “em levedura”, apresentado por Kühne, em 1878. O primeiro uso documentado de uma enzima foi por Berzelius, em 1835, ao hidrolisar o amido utilizando a diástase. A principal razão para o seu uso nas indústrias de alimentos é a capacidade de catalisar reações com macromoléculas, como proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos, e também com moléculas menores, como aminoácidos, açúcares e vitaminas (FOX, 1991;

NAGODAWITHANA; REED, 1993; TUCKER; WOODS, 1995; WHITAKER; VORAGEN; WONG, 2003).

Em processamento de alimentos, as enzimas são provenientes de plantas, animais ou microrganismos. Grande parte dos primeiros estudos foi a partir da fisiologia da levedura. Desde então, diversos produtos, como iogurte e bebidas alcoólicas fermentadas, foram desenvolvidos por meio de reações enzimáticas. O controle da atividade enzimática também tem sido aplicado em processos industriais de alimentos. Por exemplo, a fosfatase alcalina é alvo no tratamento térmico do leite bovino por ser levemente mais termorresistente que o patógeno *Mycobacterium tuberculosis*. Em sucos de frutas, as enzimas polifenol oxidase e peroxidase têm sido associadas com a oxidação de compostos aromáticos. Por isso, a inativação dessas enzimas tem ajudado a evitar cor e sabor indesejáveis em sucos (ADAMS; BROWN, 2007; FOX, 1991; NAGODAWITHANA; REED, 1993; PAINTER; BRADLEY, 1997; TUCKER; WOODS, 1995; WHITAKER; VORAGEN; WONG, 2003).

O controle da atividade enzimática pode ser desejado para atingir efeitos benéficos e evitar os prejudiciais. No primeiro caso, é necessário ter conhecimento da estabilidade enzimática. No segundo, é necessário conhecimento para eliminar ou atrasar a reação enzimática. Nesse caso, os efeitos podem ser alcançados realizando inativação das enzimas por métodos físicos de aquecimento, como branqueamento, pasteurização ou esterilização (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007; WHITAKER; VORAGEN; WONG, 2003).

A atividade enzimática representa a capacidade catalítica da enzima, isto é, a taxa de conversão de um substrato em produto. A unidade internacional (U) de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que catalisa uma reação com velocidade de conversão de 1,0 μmol de substrato por minuto (NAGODAWITHANA; REED, 1993; TOLEDO, 2007).

3.2.1 Fosfatase alcalina (ALP)

A enzima mais importante do leite é a fosfatase alcalina, devido ao teste de fosfatase como indicador de eficiência do processo de pasteurização contínua HTST. A ALP não tem nenhuma relação com alterações nas qualidades sensoriais e nutricionais do leite, mas é utilizada como indicador do processamento térmico. A existência de uma fosfatase foi primeiramente identificada em 1925, por Desmuth. Posteriormente, foi caracterizada como fosfatase alcalina e se tornou importante ao se observar que as combinações de tempo-temperatura necessárias para sua inativação eram levemente maiores do que aquelas para o

então microrganismo-alvo da pasteurização: *Mycobacterium tuberculosis* (BIRCH; BLAKEBROUGH; PARKER, 1981; FOX, 1991; WHITAKER; VORAGEN; WONG, 2003).

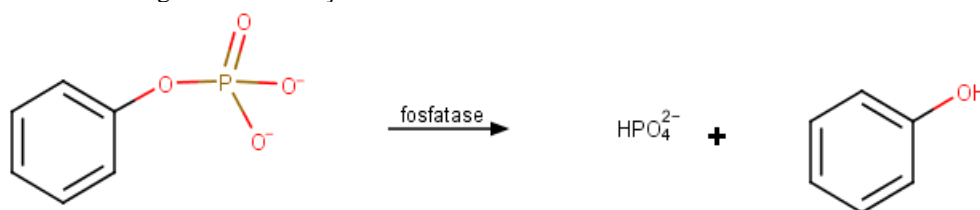
Desde então, alguns testes de controle de qualidade da pasteurização foram desenvolvidos e modificados. Nesses testes, os substratos mais comuns são fenil fosfato, *p*-nitrofenil fosfato e fosfato de fenolftaleína, os quais são hidrolisados, respectivamente, a fosfatos inorgânicos e a fenol, a *p*-nitrofenol e a fenolftaleína (BIRCH; BLAKEBROUGH; PARKER, 1981; WHITAKER; VORAGEN; WONG, 2003).

A escolha do substrato está relacionada ao pH ótimo da atividade enzimática. Na presença de caseína, o pH ótimo da enzima ALP está na faixa de 6,5-7,0. Contudo, na presença de fenil fosfatos, o pH ótimo para a atividade enzimática da fosfatase alcalina se encontra entre 9,0-10,5 (ATYAKSHEVA et al., 2006; BIRCH; BLAKEBROUGH; PARKER, 1981; FOX, 1991; WHITAKER; VORAGEN; WONG, 2003).

Atyaksheva et al. (2006) avaliaram o efeito do pH (faixa de 6,7 a 9,0) na estabilidade térmica (60 °C) da fosfatase alcalina proveniente de intestino bovino e de frango e encontraram picos para a estabilidade em pH 7,5 e para atividade em pH 9,0. De forma similar, Tang et al. (2010) e Tang et al. (2008) investigaram a fosfatase alcalina do fígado da espécie de touro *Bos Taurus* e do intestino da espécie de hipopótamo *Hypophthalmichthys Molitrix*, e concluíram que o pH ótimo de atividade foi, respectivamente, 10,0 e 10,2. Para a ALP proveniente do microrganismo *Bacillus cereus*, Kostadinova e Marhova (2014) encontraram atividade máxima no pH de 9,5.

O método 979,13, encontrado em A.O.A.C. (2016), mostra-se adequado para determinar a atividade da fosfatase alcalina. Nesse método, a verificação é feita por teste espectrofotométrico utilizando fenil fosfato como substrato e tampão de carbonato com faixa entre 9,5-9,7, conforme Figura 3.4.

Figura 3.4 – Atuação de fosfatases com o substrato de fenil fosfato.



Fonte: Adaptado de Whitaker; Voragen; Wong (2003).

Como resultado da reação entre a fosfatase alcalina e o substrato de fenil fosfato, fenol é formado como produto. Fenol é um composto sem cor, mas forma um complexo de coloração azul com 2,6-dicloroquinonaclorimida (WHITAKER; VORAGEN; WONG, 2003), o que torna

possível a utilização de testes espectrofotométricos para a determinação da atividade da fosfatase alcalina.

A determinação da atividade residual da fosfatase alcalina após tratamentos térmicos tem sido muito usada para avaliar processos de pasteurização de leite de vaca. Painter e Bradley (1997), por exemplo, investigaram os níveis da atividade residual da ALP, por método fluorimétrico, em leites que foram pasteurizados sob tratamentos HTST (*high temperature short time*) e LTLT (*low temperature long time*). A análise consistiu em avaliação da atividade enzimática de produtos de leite com teores de gordura padronizados: leite integral (3,4%), leite pouco gorduroso 2%, leite pouco gorduroso 1%, leite desnatado (0,5%), leite gorduroso (10,5%) e leite com sabor de chocolate (1,4%). Para os ensaios com HTST, mantendo a ordem citada dos produtos, as atividades médias determinadas foram $169,7 \pm 12,3$; $145,2 \pm 9,3$; $98,6 \pm 8,9$; $72,5 \pm 4,2$; $38,4 \pm 4,6$; e $157,3 \pm 6,5$ mU/L (mU de ALP por litro). Já, para os ensaios com LTLT, os resultados foram $81,8 \pm 4,8$; $66,4 \pm 5,9$; $56,4 \pm 2,1$; $39,1 \pm 3,9$; $35,0 \pm 1,2$; e $91,3 \pm 7,7$ mU/L, respectivamente. Os valores estão bem abaixo do limite proposto pela legislação dos Estados Unidos, de 350 mU/L, para o leite e seus derivados. Assim, Painter e Bradley concluíram que esse limite não é um valor preciso para avaliação de leites pasteurizados. A partir dos dados, os autores constataram que leites com menores teores de gordura também possuem menores valores de atividade residual.

Fadiloglu, Erkmén e Sekeroglu (2006) realizaram um estudo cinético da inativação térmica da fosfatase alcalina de origem bovina em três meios: ALP adicionada em tampão, ALP adicionada em leite pasteurizado e ALP naturalmente presente em leite não processado termicamente. A atividade foi determinada utilizando-se espectrofotômetro a 405 nm, com *p*-nitrofenil fosfato como substrato, tampão glicina-NaOH e o pH ajustado para 9,6. A enzima adicionada à amostra de leite pasteurizado (72 °C, por 2 min) teve as mesmas concentrações utilizadas no tampão (0,15 mg ALP/mL). A variação de temperatura no tratamento térmico, em banho termostático, foi de 50 a 80 °C e o tempo foi entre 1 e 130 minutos. Então, as atividades foram medidas e a porcentagem de atividade residual foi determinada, assim como os parâmetros cinéticos. Os autores observaram que os comportamentos cinéticos de todas as amostras foram bem descritos por modelos de primeira ordem; altas temperaturas resultaram em taxas de inativação maiores; e a taxa de inativação foi maior em tampão do que em leite pasteurizado. Concluíram, também, que a ALP é termolábil.

3.3 INTEGRADORES DE TEMPO-TEMPERATURA (TTIs)

A avaliação do impacto térmico da pasteurização de um alimento líquido, em termos de segurança, é necessária para o projeto da unidade do processo. O método *in situ* para avaliar a contagem de microrganismos ou a atividade de uma enzima costuma ser caro e demandar muito tempo. Opcionalmente, a avaliação do efeito térmico de uma unidade de processamento pode ser realizada de duas maneiras: analisando o histórico de tempo-temperatura do produto, na planta do processo ou por simulação de modelos matemáticos; ou usando um integrador de tempo-temperatura (TTI, *time-temperature-integrator*) (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007; LEWIS; HEPPELL, 2000; VAN LOEY et al., 1996).

A primeira maneira requer o histórico de tempo-temperatura, que pode ser obtido na planta do processo fazendo-se uso de instrumentos e técnicas adequadas, a fim de determinar o perfil de temperatura e a distribuição do tempo de residência (DTR). Então, o impacto pode ser calculado combinando esses resultados com a cinética de mudanças térmicas. De maneira opcional, o histórico pode ser determinado por simulação de um modelo matemático representativo das condições de processamento, que inclui equações para troca térmica (temperatura) e escoamento (tempos de residência) (AGUIAR; GUT, 2014; GEORGIADIS; MACCHIETTO, 2000; GUT; PINTO, 2005).

A segunda maneira envolve o uso de um TTI, o qual é um componente intrínseco ou extrínseco ao alimento e possui sensibilidade térmica para avaliar o impacto do processo térmico sem conhecimento do histórico de tempo-temperatura. As mudanças que ocorrem no TTI, causadas pelo processo, devem ser irreversíveis e similares às que ocorrem no atributo-alvo. Isso também significa que a letalidade calculada pelo histórico de tempo-temperatura, na primeira opção, tem de estar de acordo com aquela fornecida pelo TTI (BIRCH; BLAKEBROUGH; PARKER, 1981; HENDRICKX et al., 1995; TAOUKIS; LABUZA, 1989; VAN LOEY et al., 1996).

Processos térmicos de alimentos líquidos podem ser avaliados pelo uso de um TTI intrínseco ao produto. Para avaliar processamento térmico do leite, por exemplo, Claeys et al. (2004) estudaram o potencial de seis compostos intrínsecos ao leite para serem usados como TTIs. Esses componentes são as enzimas fosfatase alcalina e lactoperoxidase, a proteína de soro de leite β -lactoglobulina e os compostos químicos hidroximetilfurfural, lactulose e furosina. Os TTIs foram avaliados a partir de informações cinéticas e índices de qualidades encontrados na literatura. Os autores concluíram que a ALP é um bom indicador de qualidade para a pasteurização.

Os TTIs extrínsecos também são estudados em processamento térmico contínuo em alimentos líquidos, pela introdução ao produto ou a um meio líquido que simule o produto alimentício (alimento modelo). Miles e Swartzel (1995) usaram o corante Azul #2 em tampão carbonato-bicarbonato para avaliarem a letalidade de um processo contínuo. Esse processo consistia em dois trocadores de calor bitubulares, para aquecimento e resfriamento, e um tubo de retenção com variação de temperatura entre 75 e 140 °C.

Outro experimento similar foi realizado por Aguiar, Yamashita e Gut (2012) ao estudarem a inativação térmica das enzimas peroxidase, lactoperoxidase e fosfatase alcalina. Todas as enzimas foram adicionadas em tampão fosfato e a determinação da atividade enzimática foi feita por método reflectométrico. Os autores constataram que apenas a fosfatase alcalina tem potencial para ser usada como TTI para avaliar subprocessamento (tratamento térmico insuficiente) e sobreprocessamento (tratamento térmico excessivo) de processos de pasteurização HTST de alimentos líquidos. A consideração foi feita a partir de critérios como inativação parcial, parâmetros cinéticos, baixo custo e pelos testes de validação. Contudo, o método Reflectoquant®, utilizado para determinação de atividade, não está mais disponível comercialmente. Sendo, portanto, necessária a utilização de outros métodos.

Um TTI enzimático foi desenvolvido por Raviyan et al. (2003) com α -amilase, imobilizada em partículas em suspensão do gel de poli(acrilamida), em tampão fosfato. O objetivo foi o desenvolvimento de um TTI que suas propriedades dielétricas fossem semelhantes às de alimentos e que pudesse ser usado em aquecimentos por micro-ondas. As propriedades dielétricas foram medidas (analisador de rede) nas frequências 915 e 2450 MHz. A atividade da enzima foi determinada por método espectrofotométrico. Os pesquisadores confirmaram a adequabilidade do TTI para processamentos de pasteurização por micro-ondas, podendo ser usado para vários alimentos, contanto que as propriedades dielétricas sejam ajustadas para estarem de acordo com o alimento alvo.

A fim de demonstrar a aplicabilidade dos TTIs como ferramenta para obter um alimento seguro, Koutsoumanis e Gougouli (2015) fizeram um estudo de caso para *Listeria monocytogenes* em alimentos RTE (*Ready-To-Eat*, prontos para comer). Dados do crescimento desse microrganismo em patê de carne (pH 6,3) foram comparados com o crescimento de outro microrganismo, *Lactobacillus sakei* (TTI). A eficácia do indicador foi confirmada por testes que demonstraram redução do patógeno. Os testes confirmaram que a relação da temperatura com o crescimento do patógeno foi similar ao do TTI.

Schmidt e Mayer (2018) estudaram a aplicação da vitamina B₆, presente no leite de vaca, como TTI. Eles utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência para avaliar o teor restante

da vitamina no leite, após tratamento térmico. Os autores concluíram que há necessidade de estudos cinéticos e de todas as reações relevantes, incluindo experimentos em escala industrial, para estabelecer o uso da vitamina B₆ como TTI no leite de vaca.

Um TTI baseado no escurecimento não enzimático de um sistema modelo de frutose-glicina, em soluções tampão, foi desenvolvido por Uddin e Boonsupthip (2019), para monitorar a qualidade de alimentos líquidos. O objetivo foi investigar o impacto de diferentes concentrações de frutose-glicina (1,0; 1,5; 2,0; e 2,5 M), pH (8,0; 9,0; e 10,0) e combinações de tempo-temperatura sobre a mudança de cor do sistema. As temperaturas utilizadas, com auxílio de banho termostaticado, foram de 70, 80 e 90 °C. Cada amostra foi submetida a aquecimento seguido de resfriamento em banho de gelo, para evitar a ocorrência de outras reações. O experimento foi conduzido em diferentes intervalos de tempo, sendo interrompido após a formação da coloração marrom escura. Foi elaborado um modelo cinético que correlaciona a mudança de cor do sistema com as combinações de tempo-temperatura. Os autores consideraram as mudanças de cor e a faixa de energias de ativação (58,09 a 95,54 kJ.mol⁻¹) calculadas para validar o uso do TTI, em termos de qualidade.

3.4 CINÉTICA DE INATIVAÇÃO TÉRMICA

A primeira base científica para calcular a segurança mínima de um processo térmico de esterilização foi desenvolvida por Bigelow e Ball, em 1920. Desde então, aplicam-se modelos matemáticos para descrever a cinética de inativação térmica de microrganismos e enzimas. Seu uso tem sido considerado de grande importância para quantificar a sobrevivência de microrganismos e a atividade residual de enzimas e, também, para determinar o tempo de processamento para obtenção de um alimento inócuo e estável (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007; GIL et al., 2017; GUT; TADINI, 2016).

A inativação térmica de microrganismos e enzimas a altas temperaturas geralmente segue uma reação de primeira ordem. Isso significa que, a uma temperatura constante, a taxa de inativação é diretamente proporcional à concentração naquele instante. Uma reação de primeira ordem é, geralmente, empregada para desnaturação de proteína, inativação de enzimas e eliminação de bactérias e seus esporos (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007; LEWIS; HEPPELL, 2000; TOLEDO, 2007; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Fadiloglu, Erkmen e Sekeroglu (2006) relataram cinética de primeira ordem para a fosfatase alcalina em tampão de glicina, leite pasteurizado e leite não pasteurizado. Claeys, Van Loey e Hendrickx (2002) também identificaram cinética de inativação térmica de primeira ordem para a fosfatase alcalina em leite. Aguiar, Yamashita e Gut (2012) utilizaram um modelo

cinético de primeira ordem com dois componentes para a fosfatase alcalina em tampão de fosfato (AGUIAR; YAMASHITA; GUT, 2012; FUJIKAWA; ITOH, 1996; TRIBESS; TADINI, 2006).

Para uma reação de primeira ordem, em que a taxa de inativação enzimática é descrita pela diminuição da atividade em função do tempo (t), à temperatura constante, a taxa é dada pela Equação (3.1) (WHITAKER; VORAGEN; WONG, 2003):

$$\frac{dA}{dt} = -kA \quad (3.1)$$

em que A é a atividade enzimática e k é a constante cinética da reação. Para calcular a mudança da atividade por um certo período de tempo, a Equação (3.1) deve ser integrada, a fim de obter a Equação (3.2) (GUT; TADINI, 2016). O intervalo de integração é $[A_0, A]$, em que A_0 é a atividade enzimática inicial e A representa a atividade no tempo t .

$$\int_{A_0}^A \frac{dA}{A} = -k \int_0^t dt$$

$$\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = -kt \quad (3.2)$$

Para dimensionar um processo térmico e definir a taxa de letalidade térmica são necessários alguns parâmetros. O valor D é conhecido como “tempo de redução decimal” e é uma medida de resistência térmica de um microrganismo ou uma enzima. Ele é definido como o tempo de tratamento, à temperatura constante, necessário para reduzir o número de microrganismos ou a atividade enzimática para um décimo, ou seja, uma redução de 90% (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007; GUT; TADINI, 2016; TOLEDO, 2007).

O valor D pode ser expresso convertendo-se o logaritmo natural, na Equação (3.2), para o logaritmo com base decimal e, na sequência, considerando $D = 2,3026/k$ (LEWIS; HEPPELL, 2000; TOLEDO, 2007):

$$\log\left(\frac{A}{A_0}\right) = -\frac{kt}{2,3026}$$

$$\log\left(\frac{A}{A_0}\right) = -\frac{t}{D} \quad (3.3)$$

O valor de D é válido para uma certa temperatura do processo, isto é, para um processo isotérmico. No caso de processos em que ocorre variação da temperatura com o tempo, para um dimensionamento adequado, é necessário o conhecimento da dependência de D com a

temperatura. Uma forma de quantificar essa dependência é pelo parâmetro z (°C), que é a variação na temperatura necessária para ocasionar uma mudança de 10 vezes no valor de D (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007; GUT; TADINI, 2016; TOLEDO, 2007). A expressão matemática para z está representada pela Equação (3.4):

$$D = D_{ref} \cdot \text{alog} \left(\frac{T_{ref} - T}{z} \right) \quad (3.4)$$

em que D é o tempo de redução decimal (s ou min) em uma certa temperatura T (°C) e D_{ref} é o tempo de redução decimal a uma temperatura de referência T_{ref} .

Em um processamento não-isotérmico, com histórico de temperatura conhecido, o tempo de processo isotérmico equivalente, na temperatura de referência, pode ser calculado pela Equação (3.5). Essa equação pode ser definida como letalidade integrada, que é o tempo de processo a uma temperatura de referência, para atingir um valor de esterilização (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007; GUT; TADINI, 2016; LEWIS; HEPPELL, 2000).

$$F = \int_0^{\infty} L dt = \int_0^{\infty} \text{alog} \left(\frac{T(t) - T_{ref}}{z} \right) dt \quad (3.5)$$

O valor de esterilização é definido como o número de reduções decimais sobre a atividade (GUT; TADINI, 2016), representado pela Equação (3.6):

$$SV = -\log \left(\frac{A}{A_0} \right) \quad (3.6)$$

Com o tempo F é possível calcular a atividade enzimática residual para um tempo de processo isotérmico na temperatura T (F), sem considerar as etapas de resfriamento e aquecimento. De acordo com o modelo cinético de primeira ordem para sistemas de dois componentes, a atividade enzimática tem influência de duas isoenzimas com resistências térmicas diferentes. Nesse modelo, está presente o parâmetro α , que define a fração inicial da atividade enzimática relacionada à isoenzima termorresistente. O termo $(1-\alpha)$ representa a isoenzima termolábil (AGUIAR; YAMASHITA; GUT, 2012; FUJIKAWA; ITOH, 1996; TRIBESS; TADINI, 2006). Dessa forma, a atividade residual pode ser avaliada pela Equação (3.7):

$$\frac{A}{A_0} = \alpha \cdot \text{alog} \left(-\frac{F_R}{D_R} \right) + (1 - \alpha) \cdot \text{alog} \left(-\frac{F_L}{D_L} \right) \quad (3.7)$$

em que F_R e F_L são, respectivamente, as letalidades integradas das isoenzimas termorresistente e termolábil; D_R e D_L são os tempos de redução decimal das isoenzimas termorresistente e termolábil, respectivamente.

Ao combinar as Equações (3.5) e (3.7), o resultado é o modelo cinético D - z , de primeira ordem com dois componentes, representado pela Equação (3.8). Os parâmetros do modelo são: α , fração inicial da atividade componente termorresistente; D_{ref} , tempo de redução decimal na temperatura de referência de cada isoenzima; z , a dependência de D com a temperatura de cada isoenzima. Os detalhes da dedução dessa equação foram apresentados por Murasaki-Aliberti et al. (2009).

$$\begin{aligned} \frac{A}{A_0} = & \alpha \cdot \text{alog} \left(- \frac{\int_0^\infty \text{alog} \left(\frac{T(t) - T_{ref}}{z_R} \right) dt}{D_{R,ref}} \right) \\ & + (1 - \alpha) \cdot \text{alog} \left(- \frac{\int_0^\infty \text{alog} \left(\frac{T(t) - T_{ref}}{z_L} \right) dt}{D_{L,ref}} \right) \end{aligned} \quad (3.8)$$

As integrais das Equações (3.5) e (3.8) podem ser calculadas pelo método de trapézios, utilizando dados de tempo e temperatura.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

São apresentados neste capítulo os equipamentos utilizados para o processamento térmico das soluções enzimáticas, e o procedimento experimental para o desenvolvimento dos indicadores enzimáticos para uso como TTI.

4.1 EQUIPAMENTOS PARA PROCESSAMENTO TÉRMICO

Para a inativação térmica da enzima ALP, foi utilizado um minirreator de síntese química com radiação por micro-ondas focalizadas (Discover Reflux, CEM, EUA), presente na Figura 4.1.

Figura 4.1 – Minirreator Discover Reflux (CEM, EUA).



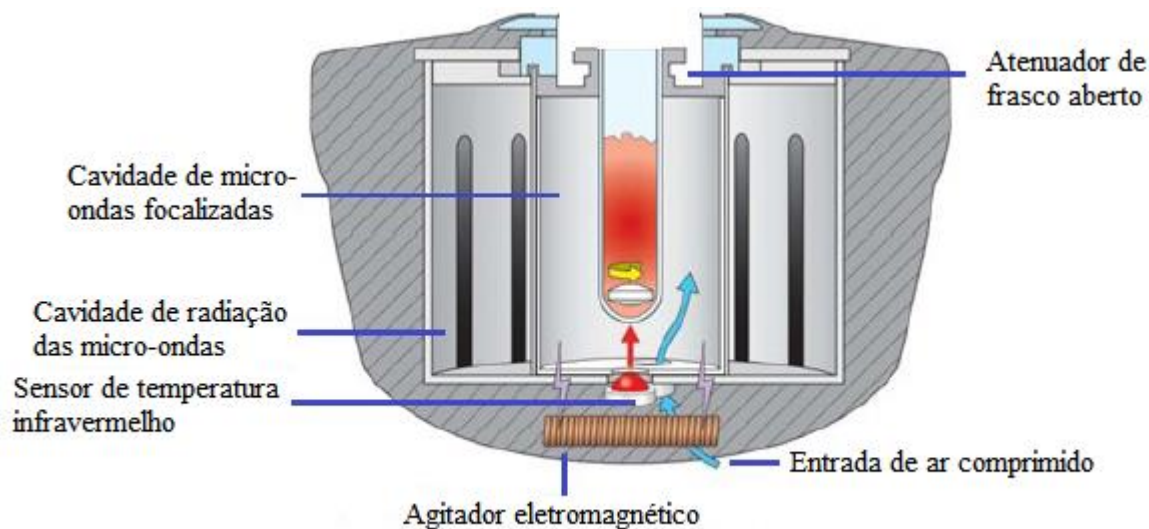
Fonte: Autor (2020).

A frequência das micro-ondas no minirreator é fixa, com valor de 2450 MHz. Utiliza-se agitação magnética e o volume da amostra, em tubo de ensaio ou balão de fundo redondo, pode variar de 5 até 125 mL no equipamento. A programação do equipamento foi realizada utilizando-se o *software* Synergy. As configurações disponíveis são: temperatura constante (FixedTemp) e potência nominal constante (FixedPower). O minirreator permite a aplicação de ar comprimido, por meio de um compressor de ar de pistão (isento de óleo), para resfriamento do recipiente da amostra. O modelo do compressor é o CSD-9 (SCHULZ, Brasil) e a pressão exercida por ele é de 2,7 atm.

É apresentado na Figura 4.2 o esquema da seção transversal do minirreator. O tratamento térmico foi feito em um tubo de ensaio de vidro Pirex, com comprimento de 20,0

cm, diâmetro externo de 22,4 mm e diâmetro interno de 19,3 mm, e barra magnética (7,2 mm de comprimento) dentro do tubo. A temperatura foi medida com a utilização de sensor de fibra óptica (Fluoroptic STF-1M, LumaSense Technologies, EUA) conectado ao termômetro de fibra óptica Luxtron 812 (LumaSense Technologies, EUA).

Figura 4.2 – Esquema da seção transversal do reator Discover Reflux (CEM, EUA).



Fonte: Adaptado de CEM Corporation (2012).

4.2 ESTUDO DA CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DOS INDICADORES ENZIMÁTICOS

O estudo da cinética de inativação da fosfatase alcalina, com sensibilidade de detecção de sobre e sub-processamento em condições de pasteurização, ocorreu sob condições de temperatura entre 50 e 95 °C e de tempo entre 5 s e 10 min. Como a atividade enzimática deve ser fácil de ser quantificada e reproduzida, optou-se pela adaptação do método espectrofotométrico 979,13 de determinação da atividade residual de fosfatase em leite (A.O.A.C., 2016).

Para padronizar os indicadores enzimáticos com a fosfatase alcalina e simplificar suas aplicações, eles foram preparados pela dissolução da enzima comercial em tampão carbonato – sem e com sacarose. A adição de sacarose foi realizada com objetivo de aumentar a resistência térmica do indicador. Essa decisão limita o uso do indicador para avaliação de processos de alimentos líquidos com viscosidade próxima à da água, isto é, líquidos com viscosidade baixa, como leites, sucos, néctares e cervejas.

4.2.1 Preparação dos indicadores enzimáticos a serem usados como TTI

A enzima fosfatase alcalina foi testada para atuar como indicador enzimático de processos térmicos de pasteurização, isto é, para ser usada como integrador de tempo e temperatura (TTI). Os dois indicadores consistiram na enzima comercializada, sob a forma de

pó liofilizado (Sigma-Aldrich, EUA), dissolvida em tampão carbonato (pH 9,5-9,7). Um indicador continha apenas a enzima dissolvida no tampão, o outro continha sacarose (CAAL, Brasil) no valor de 10 °Bx.

O tampão foi preparado pela dissolução de carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3) e bicarbonato de sódio (NaHCO_3), na forma de sais (Synth, Brasil), em água destilada. A determinação do pH foi feita com pHStat (Radiometer Copenhagen, Dinamarca). A escolha do tampão foi feita com base no pH ótimo de atividade da ALP para catalisar a reação de conversão do substrato de fenil fosfato a fenol (WHITAKER; VORAGEN; WONG, 2003). A concentração da solução enzimática (4,0 mg/L) foi escolhida com base em testes experimentais, considerando um valor próximo do limite superior da faixa de absorbância da curva de calibração, para que fosse possível melhor avaliar a redução da atividade.

Um indicador consistiu na dissolução da fosfatase alcalina, de mucosa intestinal bovina (EC 3.1.3.1, Sigma-Aldrich P7640), em tampão de carbonato. Para preparar a solução estoque, dissolveu-se a enzima, na forma de pó liofilizado, em tampão carbonato na concentração de 250,0 mg/L e conservada a 5 °C por até cinco dias. Não se optou pelo congelamento da solução porque testes realizados por Gut (2012) constataram perda na atividade, nessa etapa. Posteriormente, a solução estoque foi diluída para atingir a concentração de 4,0 mg/L e conservada a 5 °C por até cinco dias.

O outro indicador consistiu na adição de 4,0 g de sacarose a 40,0 mL de solução enzimática (descrita no parágrafo anterior) para atingir um valor de 10 °Bx – a fim de aproximar-se do teor de sólidos solúveis em sucos de frutas comerciais. O teor de sólidos solúveis foi determinado, em triplicata, utilizando refratômetro ATR-BR (Schmidt Haensch, Alemanha).

4.2.2 Determinação da atividade enzimática dos indicadores

A atividade enzimática dos indicadores foi determinada usando, como base, o método 979,13 da A.O.A.C. (2016) para determinar a atividade de fosfatases em leite. Por isso, foi necessária uma adaptação por ter sido utilizada ALP em tampão carbonato, conforme descrição a seguir. Para determinação da atividade, foram utilizadas as seguintes soluções:

(a) Tampão carbonato: Dissolução de 2,34 g de Na_2CO_3 e 1,86 g de NaHCO_3 em água destilada até completar 1,0 L de solução. O tampão tem força iônica igual a 88 mM;

(b) Substrato: Dissolução de 0,50 g de fenil fosfato dissódico (Sigma-Aldrich, EUA) dihidratado em água, seguida da adição de 25,0 mL da solução tampão. Na sequência, diluiu-se a solução, com água destilada, até obter um volume de 500,0 mL. A solução foi conservada

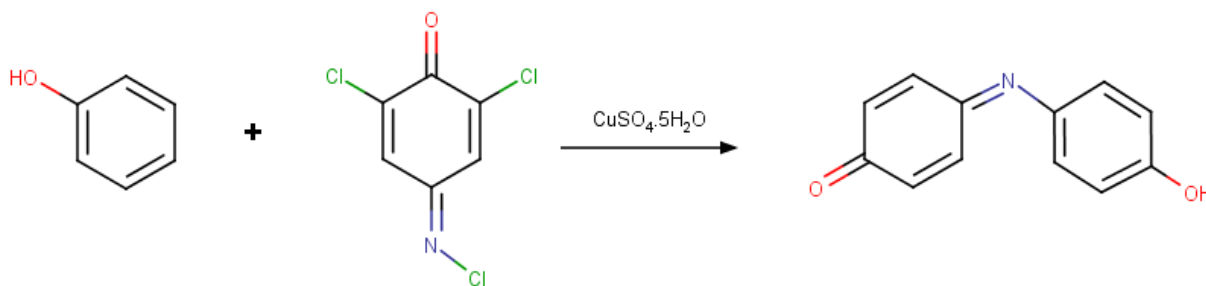
à temperatura ambiente por até duas semanas;

(c) Solução reagente de 2,6-dicloroquinona-4-clorimida (Tokyo Chemical Industry, Japão) (CQC): Dissolução de 0,20 g de CQC em álcool metílico (CAAL, Brasil). Em seguida, diluiu-se a solução com álcool metílico até obter um volume de 50,0 mL. Posteriormente, transferiu-se a solução para frasco âmbar, para estoque em geladeira (cor amarelo-citrina). A solução foi conservada por até uma semana;

(d) Catalisador: Dissolução de 0,20 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (CAAL, Brasil) em água, seguida de diluição até 100 mL de solução;

A determinação enzimática ocorreu após a adição do substrato fenil fosfato dissódico às amostras, dos indicadores, processadas termicamente por micro-ondas em diferentes tempos e temperaturas. A enzima hidrolisou o substrato e liberou fenol (Figura 3.4), que reagiu com CQC, na presença de catalisador de sulfato de cobre (II), produzindo indofenol de cor azul (Figura 4.3). As amostras foram lidas em espectrofotômetro UV-Vis (700 Plus, Femto, Brasil) utilizando cubeta de quartzo (Hellma, Brasil) com 10,5 mm de caminho óptico, a 650 nm, para determinar a atividade enzimática em função da concentração de indofenol formado (μg de indofenol/mL de solução enzimática) (A.O.A.C., 2016; DRUCKREY; KLEYN; MURTHY, 1985; WHITAKER; VORAGEN; WONG, 2003).

Figura 4.3 – Reação de fenol com CQC para formar indofenol.



Fonte: Autor (2020).

Para determinação da atividade enzimática, transferiu-se 0,50 mL da solução de cada indicador para um tubo de ensaio. Foram adicionados 10,0 mL do substrato ao tubo, que foi vedado com papel parafilm e agitado manualmente até ser colocado em banho térmico (RE 620, Lauda, Alemanha) a $(40 \pm 0,20)$ °C por 15 minutos. Considerou-se 1 minuto como tempo de aquecimento (DRUCKREY; KLEYN; MURTHY, 1985). Após esse período, o tubo de ensaio foi retirado do banho térmico e a ele foi adicionado 0,10 mL da solução reagente e 2 gotas do catalisador. Homogeneizou-se a solução do tubo de ensaio e este foi levado ao banho térmico por 5 minutos. Em seguida, o tubo de ensaio ficou em repouso em banho de gelo por 5 minutos. Depois desse período, a amostra ficou à temperatura ambiente por mais 5 minutos e a

absorbância foi lida. A leitura foi feita com a utilização de espectrofotômetro (700 Plus, Fento, Brasil), cubeta de quartzo (Hellma, Brasil) com 10,5 mm de caminho óptico, a 650 nm, e o valor comparado ao da curva de calibração de fenol. Para a leitura das absorbâncias de cada indicador, foram considerados três ensaios (triplicata) e, para cada ensaio, a absorbância foi lida duas vezes.

4.2.3 Curva de calibração de indofenol

A determinação da concentração de indofenol, resultante da atividade da ALP, foi feita a partir da equação da curva de calibração contendo diferentes concentrações de fenol em água destilada. Para o preparo das soluções padrão de fenol e da curva de calibração de indofenol, realizou-se o seguinte procedimento experimental:

(1) Solução estoque – Pesagem de 0,050 g de fenol (Synth, Brasil) puro, seguida de dissolução com solução de HCl (Synth, Brasil) 0,1 mol/L, e posterior transferência para um balão volumétrico de 50,0 mL, com adição de HCl 0,1 mol/L até a marca, para obter uma concentração de fenol igual a 1,0 mg/mL. A solução permanece estável por vários meses no refrigerador (A.O.A.C., 2016);

(2) Diluição de 0,50 mL da solução estoque em água destilada até um volume de 50,0 mL, em balão volumétrico, para obter concentração final de fenol igual a 10,0 µg/mL (preparação diária);

(3) Padrões de trabalho – Diluição da solução de fenol de 10,0 µg/mL com água destilada, em tubos de ensaio, até um volume de 10,0 mL, conforme as proporções da Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Soluções padrão de fenol para elaborar a curva padrão de indofenol.

Volume Sol. Fenol 10 µg/mL (mL)	Volume Água destilada (mL)	Volume total da solução padrão (mL)	Concentração Indofenol (µg/mL)
0,0	10,0	10,0	0,0
1,0	9,0	10,0	2,0
2,0	8,0	10,0	4,0
3,0	7,0	10,0	6,0
4,0	6,0	10,0	8,0
5,0	5,0	10,0	10,0
6,0	4,0	10,0	12,0

Fonte: Autor (2020).

A cada solução padrão de fenol (10,0 mL), foram adicionados 0,50 mL da solução tampão, 0,10 mL da solução de CQC e 2 gotas do catalisador. Em seguida, os tubos foram colocados em banho térmico (RE 620, Lauda, Alemanha) a $(40 \pm 0,20)$ °C por 5 minutos. Após serem retirados, foram resfriados em banho de gelo por 5 minutos. Esperaram-se 5 minutos para a leitura da absorbância em espectrofotômetro (700 Plus, Femto, Brasil), a 650 nm. A absorbância lida está em função da concentração de produto indofenol. É considerado no método uma relação mássica de 2:1 (2 indofenol:1fenol) (A.O.A.C., 2016; DRUCKREY; KLEYN; MURTHY, 1985). A curva de calibração se encontra na Figura 5.5 do item 5.2 dos Resultados e Discussão.

4.2.4 Tratamento térmico descontínuo por micro-ondas

Para determinar os parâmetros cinéticos da inativação enzimática da fosfatase alcalina, ensaios descontínuos com diferentes tempos de retenção e temperatura foram realizados no minirreator de síntese química com radiação por micro-ondas focalizadas (Discover Reflux, CEM, EUA), a 2450 MHz. As condições de tempo e temperatura foram escolhidas com base nos estudos cinéticos de Aguiar, Yamashita e Gut (2012) para a fosfatase alcalina em tampão fosfato, utilizando o modelo D-z com parâmetros: $D_{75^{\circ}\text{C};R,ref} = 478$ s, $D_{75^{\circ}\text{C};L,ref} = 3,83$ s, $z_R = 7,57$ °C e $z_L = 6,57$ °C. O objetivo foi obter reduções de atividade entre 5% e 95% com tempo de retenção entre 15 s e 10 min.

Para cada ensaio térmico descontínuo, uma amostra de 10,0 mL da solução de cada indicador foi adicionada a um tubo de ensaio de vidro, tipo Pyrex, com comprimento de 20,0 cm, diâmetro externo de 22,4 mm e diâmetro interno de 19,3 mm. A temperatura no interior da amostra foi coletada, a cada 0,5 s, utilizando o sensor de fibra óptica Fluoroptic STF-1M (LumaSense Technologies, EUA) conectado ao termômetro de fibra óptica Luxtron 812 (LumaSense Technologies, EUA), conforme Figura 4.4. O tempo de resposta do sensor é de 0,5 s, que é o ideal para uso sob micro-ondas – que possui alta velocidade de aquecimento.

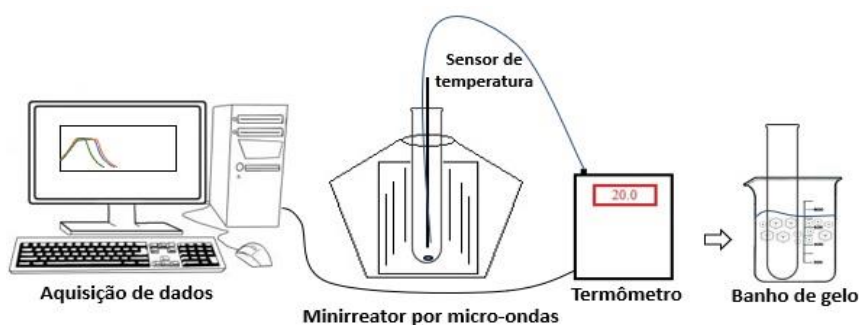
Figura 4.4 – Sistema de medição de temperatura: sensor de fibra óptica Fluoroptic STF-1M (LumaSense Technologies, EUA), dentro de um tubo de ensaio, conectado ao termômetro de fibra óptica Luxtron 812 (LumaSense Technologies, EUA).



Fonte: Autor (2020).

O tratamento térmico descontínuo foi realizado utilizando radiação por micro-ondas, sob agitação constante com barra magnética de 7,2 mm de comprimento. O processamento foi iniciado na configuração FixedPower, com potência fixa de 200,0 W. A 7 °C de atingir a temperatura de retenção, a potência foi reduzida para 5,0 W e o controle da temperatura foi feito manualmente a partir de variações de potência entre 2,0 e 10,0 W. Subsequente ao processo térmico, a amostra foi colocada em banho de gelo, sob agitação, até que a temperatura estivesse abaixo de 10 °C. Simultaneamente, o histórico de tempo-temperatura foi registrado para cada ensaio. Está presente, na Figura 4.5, um esquema de tratamento térmico descontínuo.

Figura 4.5 – Esquema de tratamento térmico descontínuo assistido por micro-ondas.



Fonte: Autor (2020).

Após o tratamento térmico, as amostras foram mantidas em banho de gelo, por 10 min, antes de serem colocadas em tubos Falcon e armazenadas em geladeira, a 5 °C, até a determinação da atividade residual da ALP. Todos os ensaios de atividade foram feitos dentro de 24 h após o tratamento térmico. A medida da atividade foi feita em triplicata. O histórico de tempo-temperatura é particular para cada ensaio, não podendo ser considerado como duplicata

ou triplicata. As repetições para determinação da atividade residual foram consideradas para avaliar o erro na medição.

Combinações de tempo de retenção entre 5 s e 10 min e de temperatura de 50 a 95 °C foram testadas para obter uma atividade residual entre 5 e 95 %. As temperaturas utilizadas para o tratamento térmico da fosfatase alcalina foram 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90 e 95 °C.

4.2.5 Modelo cinético

A modelagem foi feita a partir da Equação (3.8). O modelo de duas frações foi escolhido por representar adequadamente a cinética de inativação da fosfatase alcalina, como visto no item 3.4 da Revisão Bibliográfica. Foram necessárias estimativas iniciais dos parâmetros α , D e z para calcular a previsão da atividade residual pela Equação (3.8). As integrais da Equação (3.8) foram calculadas utilizando método de trapézios, a partir dos dados experimentais do histórico de tempo-temperatura e das estimativas de z . O somatório do erro quadrático foi calculado a partir da Equação 4.2, para a previsão da atividade residual pelo modelo, considerando um conjunto de n ensaios experimentais.

$$SEQ = \sum_{i=1}^n \left[\left(\frac{A}{A_0} \right)_{calculada,i} - \left(\frac{A}{A_0} \right)_{experimental,i} \right]^2 \quad (4.2)$$

Foi adotado como objetivo a minimização do somatório do erro quadrático, feita com a função *Solver* do *software* Excel (Microsoft, EUA), com um algoritmo de otimização GRG (programação matemática com gradiente reduzido generalizado). Para evitar mínimos locais, uma exploração manual – testando diferentes valores – dos parâmetros foi realizada para a convergência da função objetivo para o mínimo global. Gráfico de paridade e coeficiente de determinação foram utilizados para avaliar a qualidade do ajuste do modelo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados dos experimentos para o desenvolvimento dos indicadores enzimáticos, com a fosfatase alcalina, para serem usados como TTI. Primeiramente, são discutidos os históricos de tempo-temperatura obtidos a partir do tratamento térmico, das soluções enzimáticas, assistido por micro-ondas. Posteriormente, são apresentadas as curvas de atividade residual a partir da inativação dos indicadores nas combinações de tempo e temperatura utilizadas para fazer os históricos. Por fim, o ajuste do modelo. A atividade residual prevista pelo modelo matemático, para cada indicador, é comparada com a atividade residual experimental.

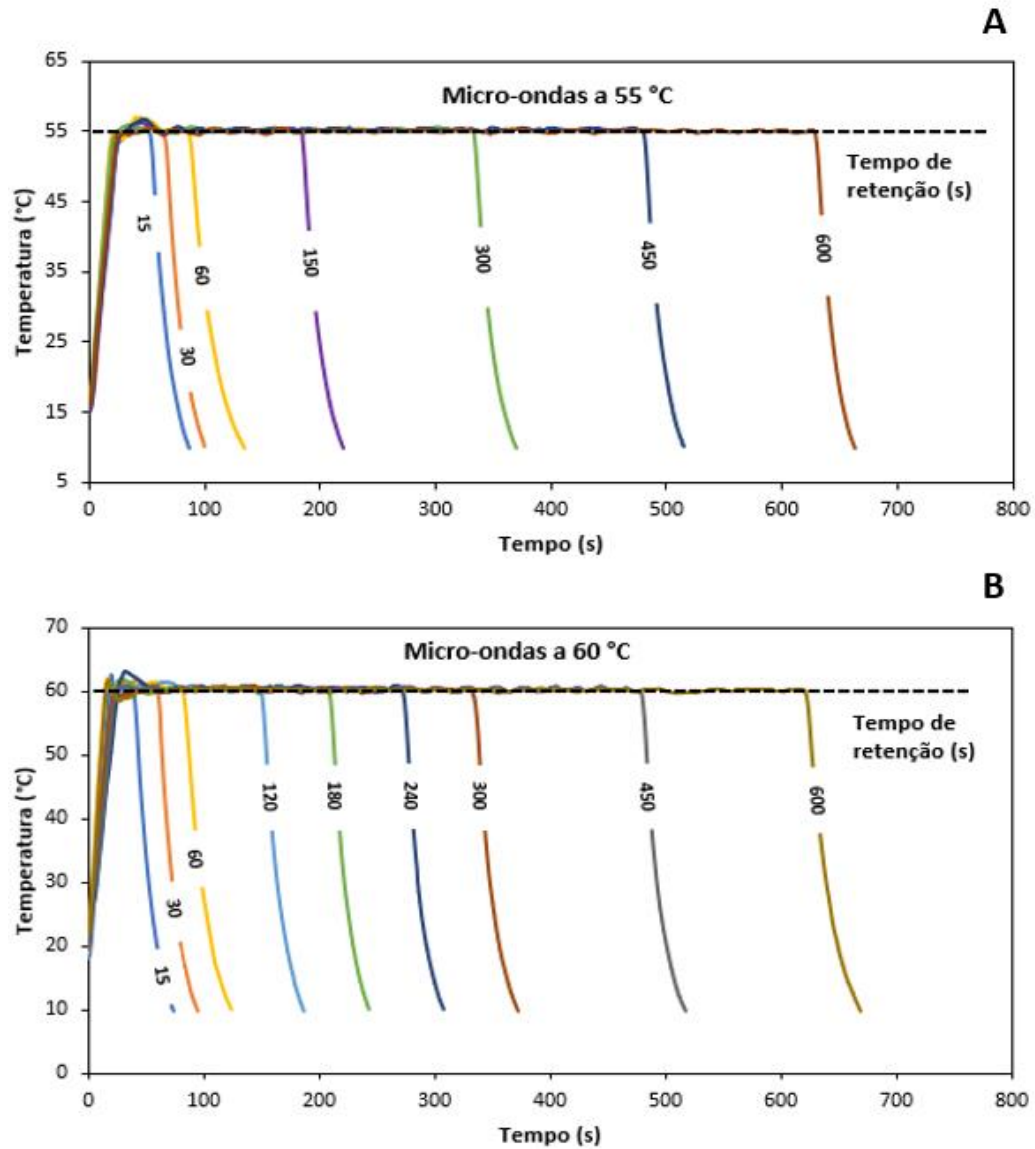
5.1 PERFIS DE TEMPO-TEMPERATURA DOS INDICADORES

5.1.1 Fosfatase alcalina em tampão carbonato (indicador sem sacarose)

Os históricos de tempo-temperatura do indicador sem sacarose, sob tratamento térmico assistido por micro-ondas, estão apresentados nas Figuras 5.1 e 5.2. Na Figura 5.1, optou-se pela utilização de tempos de retenção entre 15 e 600 s por se tratar de uma faixa de temperatura (55 a 60 °C) em que a redução de atividade do indicador enzimático é menor em tempos curtos.

Foi realizado um ensaio para o tempo de retenção de 45 s para as temperaturas de 55 e 60 °C. Contudo, como a curva desse ponto coincide com a de 60 s, no histórico, e o valor da atividade residual (seção 5.2) não apresentou diferença significativa em relação ao tratamento de 60 s, optou-se por retirar essa curva da Figura 5.1. Além disso, como foram realizados experimentos com pontos próximos (30 e 60 s) ao retirado, observou-se que esses pontos estão de acordo com a tendência.

Figura 5.1 – Históricos de tempo-temperatura para o processamento térmico por micro-ondas do indicador sem sacarose a 55 °C (A) e a 60 °C (B).

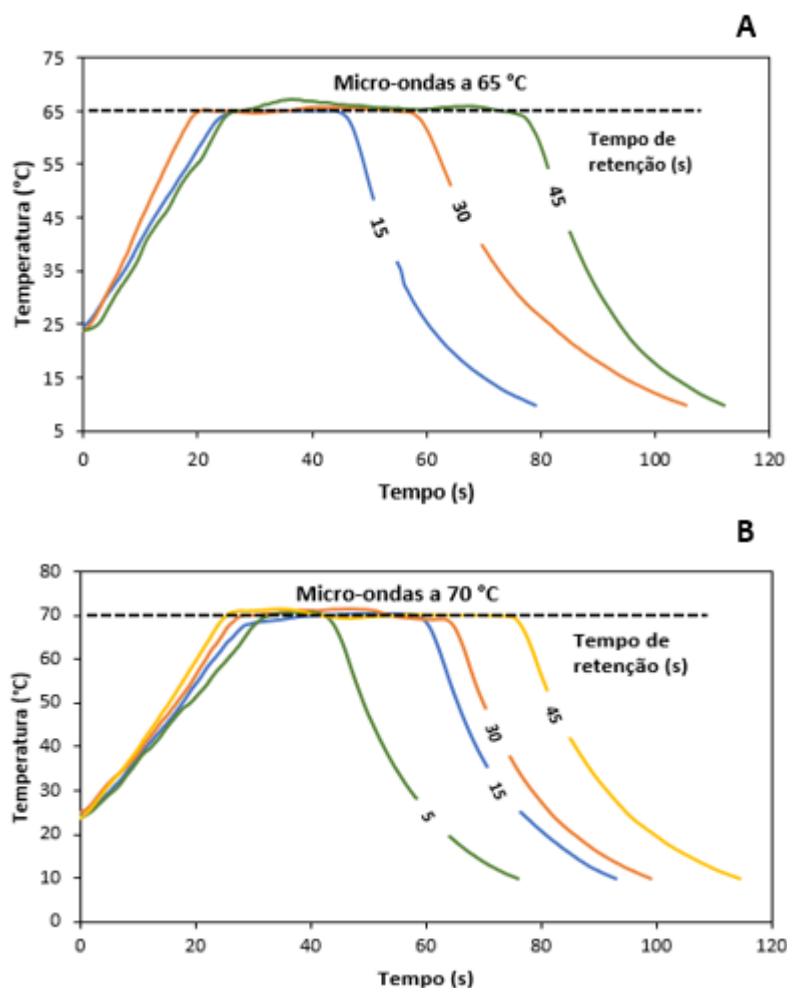


Fonte: Autor (2020).

Observa-se que, após um período inicial para atingir a estabilização da temperatura, ela foi mantida constante, devido à alternância da potência utilizada (de 2,0 a 10,0 W) e à agitação magnética constante das amostras.

Para as temperaturas de 65 a 70 °C (Figura 5.2), os tempos de retenção escolhidos foram entre 5 e 45 s, devido à maior redução da atividade da ALP em tempos curtos. A escolha do tempo de 5 s para a temperatura de 70 °C ocorreu porque nessa temperatura, o tempo mínimo utilizado para as outras temperaturas (15 s) resultou em uma atividade residual muito próxima de zero (0,9 %).

Figura 5.2 – Históricos de tempo-temperatura para o processamento térmico por micro-ondas do indicador sem sacarose a 65 °C (A) e a 70 °C (B).



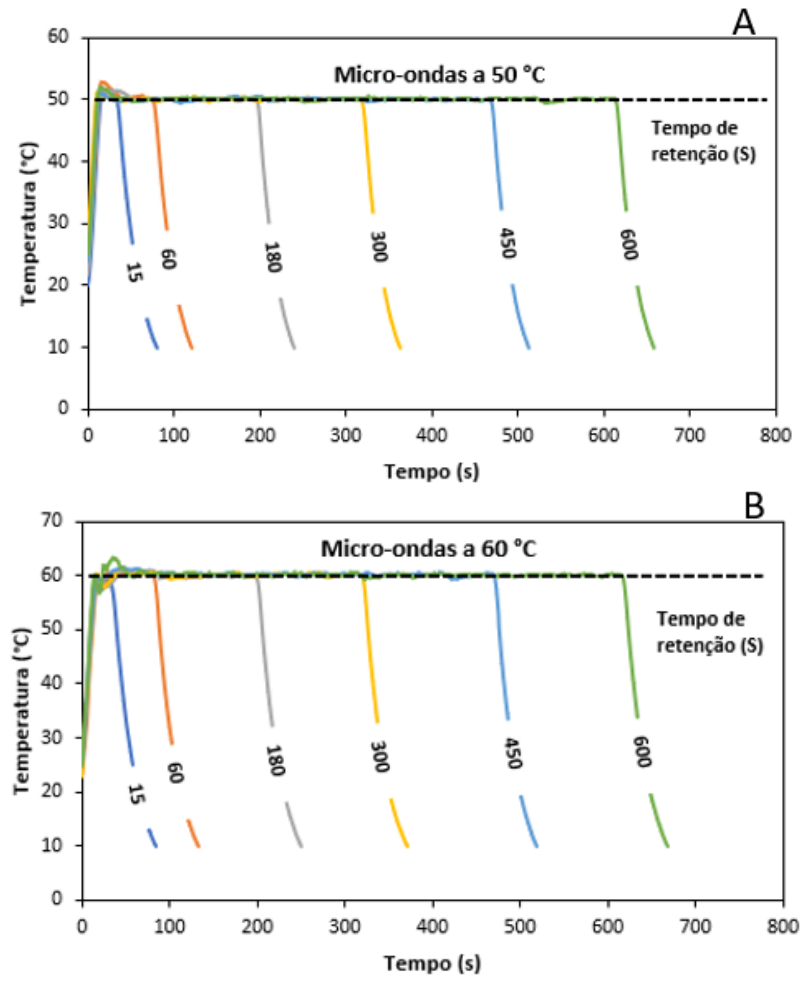
Fonte: Autor (2020).

Os perfis de tempo-temperatura durante o aquecimento por micro-ondas apresentaram rampa de aquecimento quase linear, para volume de amostra igual a 10,0 mL. Para evitar efeitos das rampas de aquecimento e resfriamento sobre a atividade do indicador, optou-se por rápidos aquecimento e resfriamento.

5.1.2 Fosfatase alcalina em tampão carbonato com sacarose (indicador com sacarose)

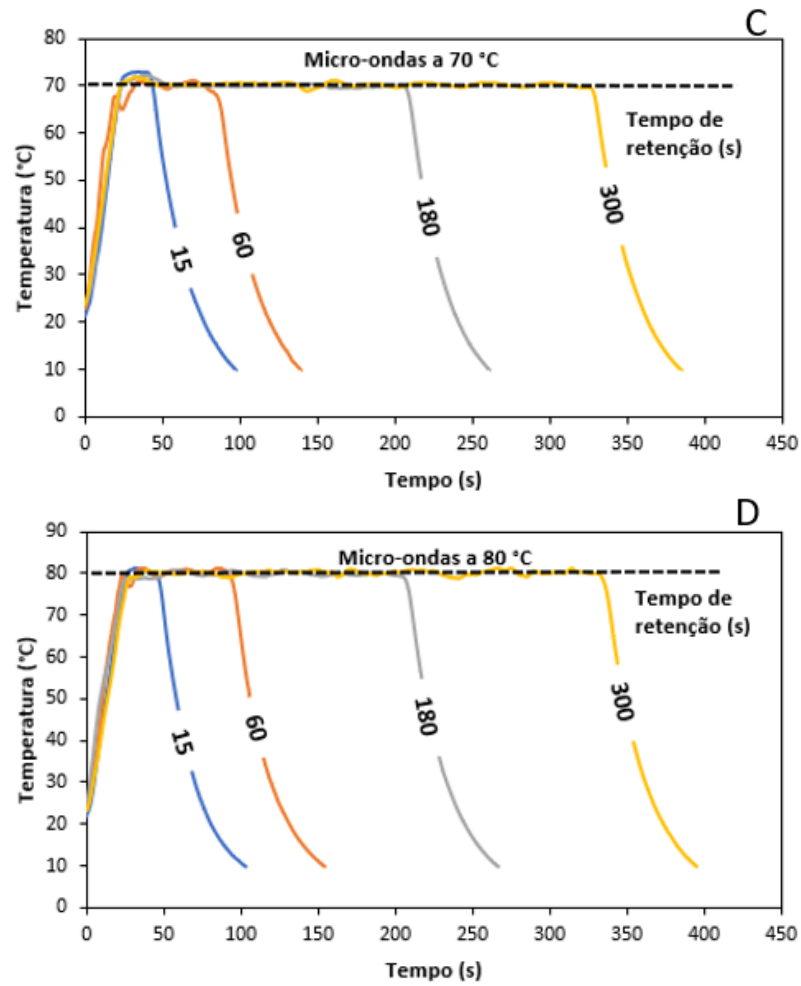
Os históricos de tempo-temperatura do indicador com sacarose, sob tratamento térmico assistido por micro-ondas, estão apresentados nas Figuras 5.3 e 5.4. Nas Figuras 5.3 (A) e (B), optou-se pela utilização de tempos de retenção entre 15 e 600 s por se tratar de temperaturas (50 e 60 °C) em que a redução de atividade do indicador enzimático é menor em tempos curtos. Para os históricos das Figuras 5.3 (C) e (D), utilizou-se tempos entre 15 e 300 s, em que a atividade resultante desses tempos foi quase constante – sendo necessárias temperaturas maiores para obter uma atividade residual menor.

Figura 5.3 (A) e (B) – Históricos de tempo-temperatura para o processamento térmico por micro-ondas do indicador com sacarose a 50 °C (A) e a 60 °C (B).



Fonte: Autor (2020).

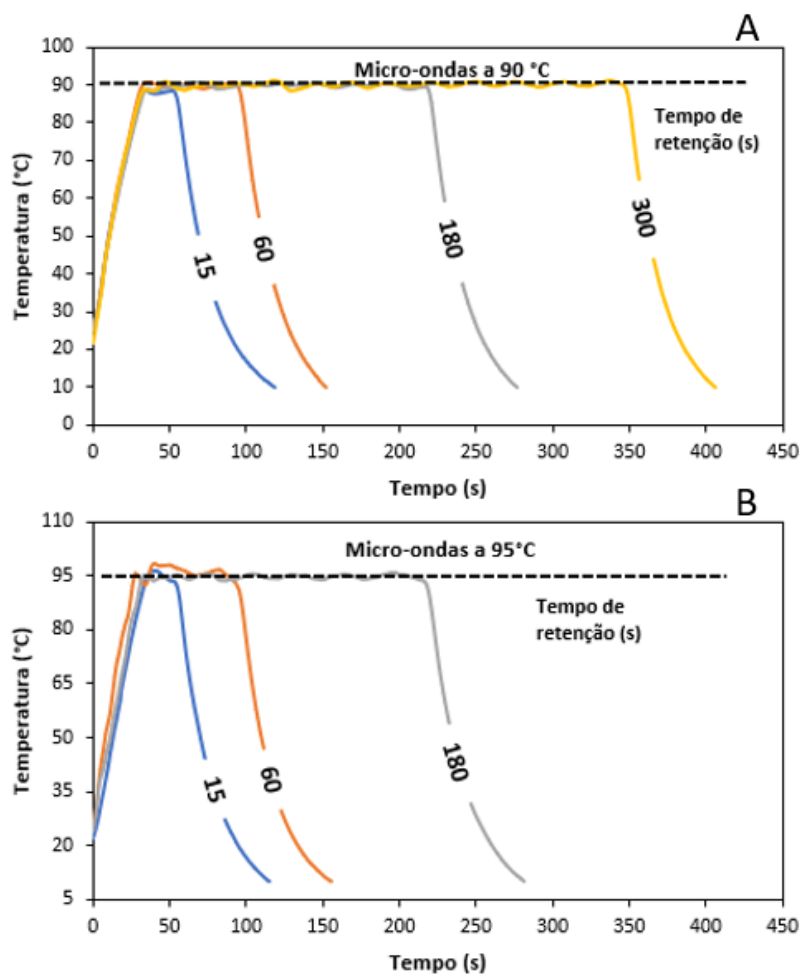
Figura 5.3 (C) e (D) – Históricos de tempo-temperatura para o processamento térmico por micro-ondas do indicador com sacarose a 70 °C (C) e a 80 °C (D).



Fonte: Autor (2020).

Os tratamentos térmicos que correspondem aos históricos das Figuras 5.4 (A) e (B) resultaram em atividades residuais menores que os tratamentos em temperaturas mais baixas. Foram necessários intervalos de tempos menores que aqueles utilizados em temperaturas mais baixas para obter valores pequenos de atividade residual da fosfatase alcalina a 95 °C.

Figura 5.4 – Históricos de tempo-temperatura para o processamento térmico por micro-ondas do indicador com sacarose a 90 °C (A) e a 95 °C (B).



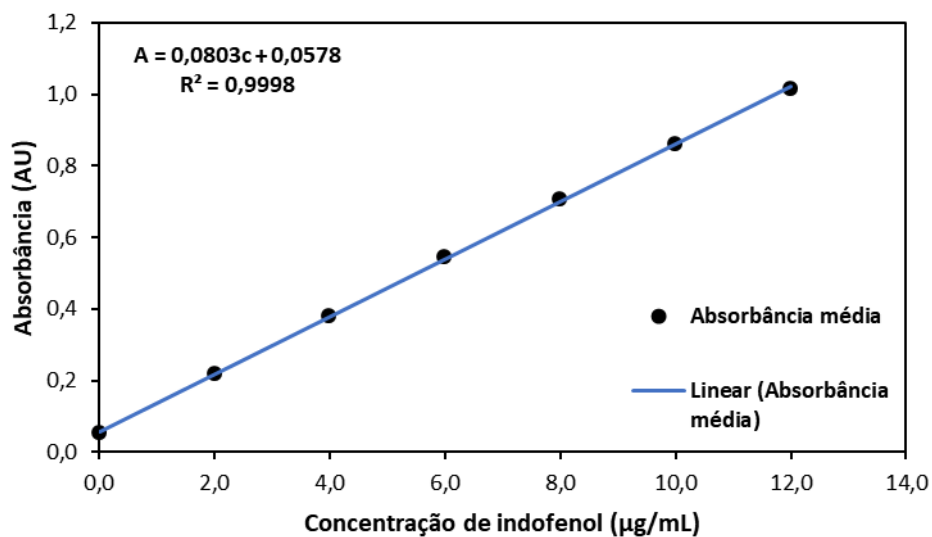
Fonte: Autor (2020).

Para um volume de amostra de 10,0 mL, a rampa de aquecimento foi quase linear. Rápidos aquecimentos e resfriamentos foram necessários para minimizar os efeitos das rampas na atividade enzimática.

5.2 ATIVIDADES RESIDUAIS PARA OS TRATAMENTOS TÉRMICOS APLICADOS AOS INDICADORES

Está apresentada na Figura 5.5 a curva de calibração de indofenol para determinar a atividade da ALP. Na equação presente na figura, A é a absorbância em AU e c é a concentração de indofenol a ser calculada. Os valores dos desvios padrão das absorbâncias não podem ser vistos na escala do gráfico. O maior valor de desvio padrão é 0,005.

Figura 5.5 – Curva de calibração com diferentes concentrações de indofenol em água destilada, utilizada para determinar a atividade da enzima ALP em solução tampão.

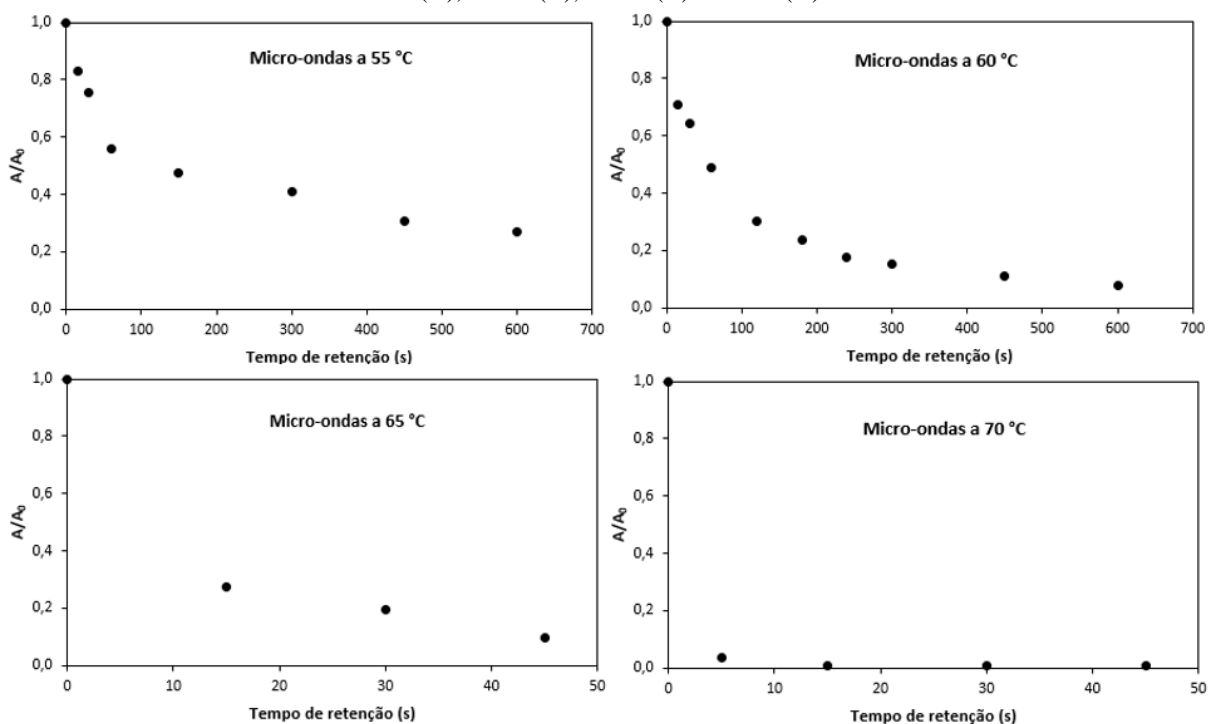


Fonte: Autor (2020).

5.2.1 Fosfatase alcalina em tampão carbonato (indicador sem sacarose)

A atividade do indicador com a fosfatase alcalina em tampão carbonato diminuiu com o aumento da temperatura e do tempo do tratamento térmico descontínuo assistido por micro-ondas. A atividade inicial média foi de $(2,8 \pm 0,2)$ U/L. Está presente na Figura 5.6 a atividade residual (A/A_0) do indicador enzimático para a faixa de temperatura 55-70 °C e tempos de retenção de 5 a 600 s. A_0 é a atividade inicial da amostra (tempo 0 s) e A é a atividade após o tratamento térmico. Os valores dos desvios padrão da atividade residual não podem ser vistos na escala do gráfico. O maior valor de desvio padrão é 0,008.

Figura 5.6 – Atividade residual do indicador sem sacarose com o tempo de retenção, para as temperaturas de 55 °C (A), 60 °C (B), 65 °C (C) e 70 °C (D).



Fonte: Autor (2020).

Os experimentos demonstraram uma variação significativa no decaimento da atividade com o aumento da temperatura, visto que, para as temperaturas de (55, 60, 65 e 70) °C, os valores de atividade residual para o tempo de 15 s foram, respectivamente, (83,1; 71,1; 27,5 e 0,8) %. Nota-se que a 65 °C e a 70 °C, obteve-se menores valores de atividade residual e em menores tempos de tratamento térmico.

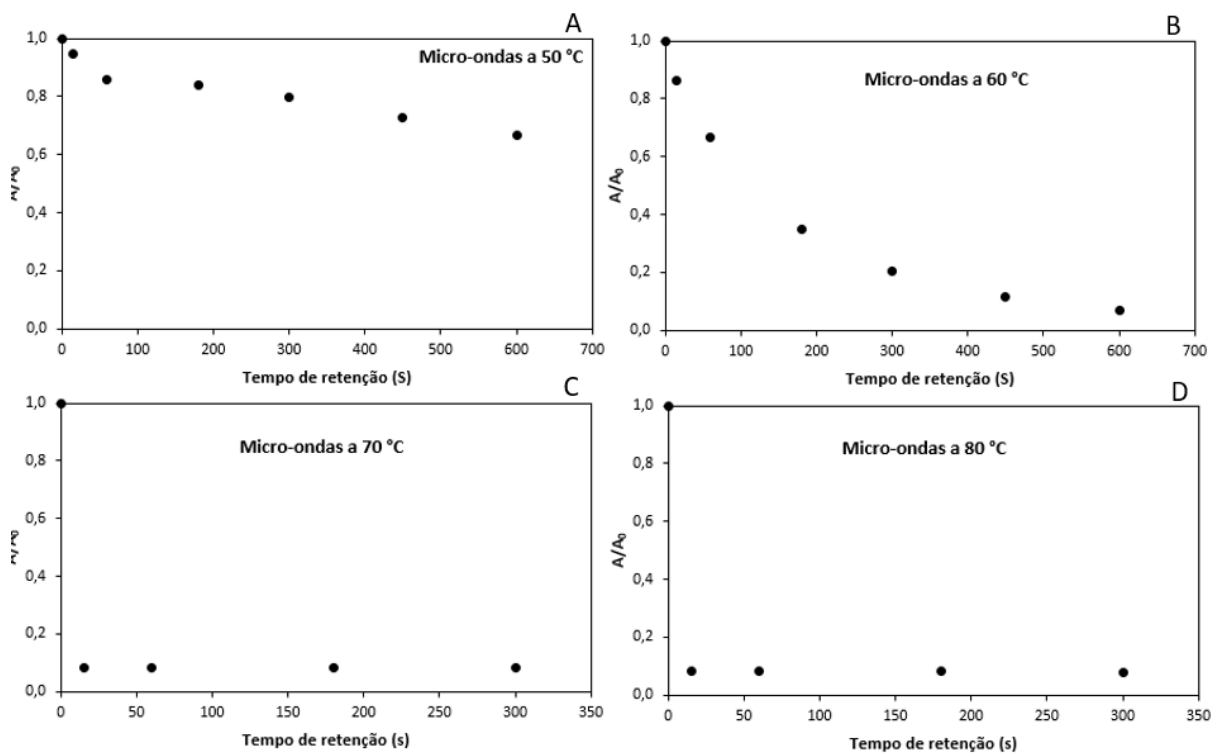
A fosfatase alcalina presente no leite de vaca é inativada a 72 °C após 15 s de tratamento térmico (LEWIS; HEPPELL, 2000). O indicador apresentou condições de tempo e temperatura próximas da condição de inativação da ALP no leite. Mas seu uso não permitiria avaliar processos térmicos acima de 70 °C, como no caso de sucos, que possuem enzimas mais termorresistentes. Por isso, foi necessário o desenvolvimento de outro indicador, com maior resistência térmica, a partir da adição de sacarose.

5.2.2 Fosfatase alcalina em tampão carbonato (indicador com sacarose)

A atividade residual do indicador com sacarose diminuiu com aumento da temperatura e do tempo. A 70 °C e a 80 °C (Figura 5.7), a atividade residual permaneceu quase constante, tendo sido necessário aumento da temperatura para obter valores menores de atividade. O valor da atividade inicial média foi de $(2,9 \pm 0,1)$ U/L.

A Figura 5.7 contém as atividades residuais na faixa de 50-80 °C e tempos de retenção entre 15 e 600 s. Os valores dos desvios padrão da atividade residual não podem ser vistos na escala do gráfico. O maior valor de desvio padrão é 0,005.

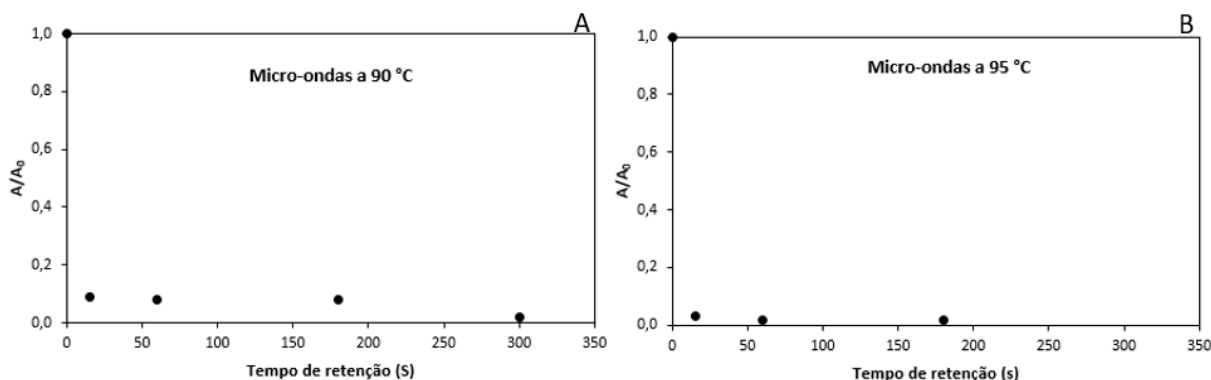
Figura 5.7 – Atividade residual do indicador com sacarose pelo tempo de retenção, para as temperaturas de 50 °C (A), 60 °C (B), 70 °C (C) e 80 °C (D).



Fonte: Autor (2020).

Para as temperaturas de 50 e 60 °C, observou-se decaimento da atividade com o aumento da temperatura e do tempo. Contudo, a 70 °C e a 80 °C, diferentes tempos de processamento resultaram em valores próximos, entre si, de atividade residual. Portanto, foi necessário o aumento da temperatura para obter valores menores de atividade. Está apresentada na Figura 5.8 a curva da atividade residual pelo tempo de retenção para as temperaturas de 90 e 95 °C.

Figura 5.8 - Atividade residual do indicador com sacarose pelo tempo de retenção, para as temperaturas de 90 °C (A) e 95 °C (B).



Fonte: Autor (2020).

Observa-se que a atividade residual só diminuiu efetivamente após 300 s de retenção a 90 °C. As temperaturas de 90 e 95 °C foram as que apresentaram os menores valores de atividade.

Com adição de sacarose, foi possível aumentar a resistência térmica do indicador enzimático. Contudo, o indicador não se mostrou adequado na faixa de 90-95 °C, porque não tem sensibilidade – nessa faixa, não é possível distinguir o tempo de processamento das duas temperaturas (as duas temperaturas se encontram quase sobrepostas na Figura 5.10). O aumento da resistência térmica obtida a partir da sacarose está de acordo com o trabalho realizado por Sekiguchi et al. (2012). Esse efeito foi observado por Chang, Park e Lund (1988) ao estudar a inativação térmica da peroxidase de raiz forte. Os autores entenderam que a resistência da enzima aumenta porque em vez de interagir com a água, a enzima interage com o açúcar solúvel e essa interação promove maior resistência térmica. Apesar do aumento na resistência térmica do indicador enzimático, este ainda deve ser usado em processos térmicos com temperaturas próximas às de 70 °C.

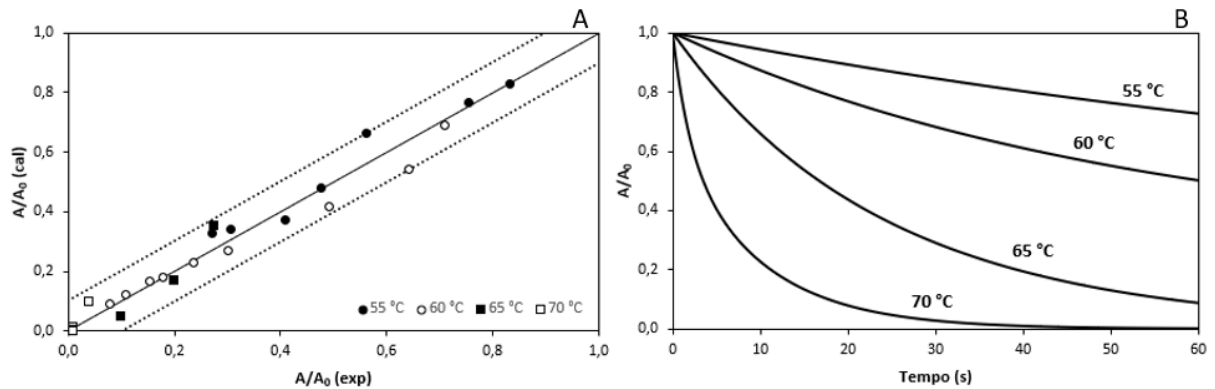
5.3 AJUSTE DO MODELO CINÉTICO

O ajuste do modelo cinético foi realizado de acordo com o conteúdo da seção 4.2.5. Foram considerados os históricos de tempo-temperatura e as atividades residuais dos ensaios térmicos descontínuos aplicados ao indicador.

5.3.1 Fosfatase alcalina em tampão carbonato (indicador sem sacarose)

A Figura 5.9 contém o gráfico de paridade (A) para o ajuste do modelo cinético e as curvas de inativação térmica em diferentes temperaturas (B) pelo modelo ajustado. O coeficiente de determinação (R^2) calculado apresentou valor igual a 0,97.

Figura 5.9 – Gráfico de paridade (A) para a previsão da atividade residual do indicador sem sacarose e curvas de inativação (B) em diferentes temperaturas para o modelo ajustado.



Fonte: Autor (2020).

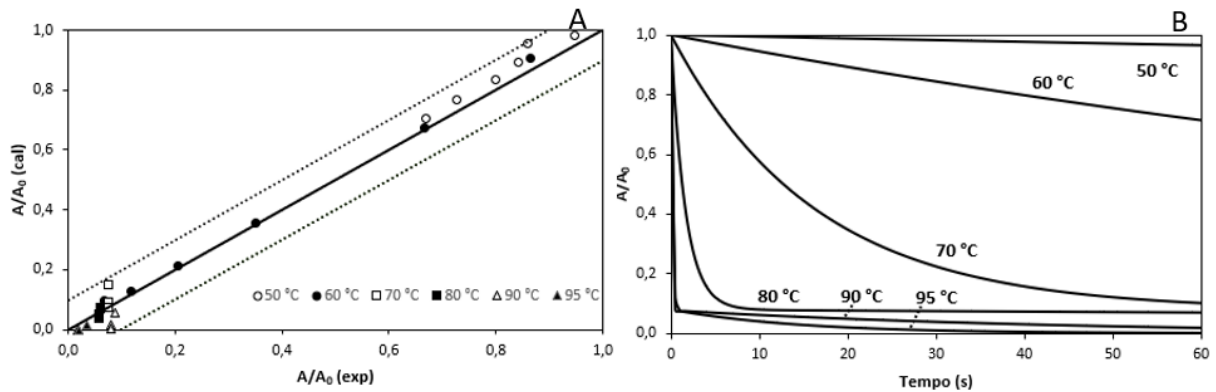
O modelo cinético apresentou bom ajuste, confirmado pelo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,97$) e pelo gráfico de paridade, considerando uma margem de erro de 10 %. Em comparação com a literatura, os desvios estão abaixo do valor de desvio absoluto médio de 20 %, encontrado por Aguiar, Yamashita e Gut (2012), para a mesma enzima.

A partir das curvas de inativação, pode-se entender que a fração termorresistente da ALP em tampão carbonato tem potencial para avaliação do sobreprocessamento de processos de pasteurização HTST do leite de vaca, e a fração termolábil pode avaliar o subprocessamento. Isso pode ser concluído visto que as frações termorresistente e termolábil da enzima foram inativadas a 70 °C e que em temperaturas mais baixas (55 e 60 °C), a fração termolábil não é rapidamente inativada.

5.3.2 Fosfatase alcalina em tampão carbonato (indicador com sacarose)

Está apresentado na Figura 5.10 o gráfico de paridade (A) do ajuste do modelo cinético e as curvas de inativação térmica nas temperaturas utilizadas neste trabalho (B). O coeficiente de determinação (R^2) para o ajuste foi de 0,99.

Figura 5.10 - Gráfico de paridade (A) para a previsão da atividade residual do indicador com sacarose e curvas de inativação (B) em diferentes temperaturas para o modelo ajustado.



Fonte: Autor (2020).

O modelo cinético apresentou bom ajuste, confirmado pelo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,99$) e pelo gráfico de paridade, considerando uma margem de erro de 10 %.

A partir das curvas de inativação, pode-se entender que a fração termorresistente do indicador de ALP em tampão carbonato com sacarose tem potencial para avaliação em sobreprocessamento de processos de pasteurização HTST de leites, sucos, cervejas e néctares. Essa afirmação tem validade para temperaturas próximas de 70 °C.

5.3.3 Comparação dos parâmetros ajustados com parâmetros obtidos na literatura

Estão presentes na Tabela 5.1 os parâmetros ajustados do modelo de 1ª ordem com duas frações, a $T = 70$ °C, obtidos neste trabalho e na literatura para comparação. Considerou-se (a) os parâmetros ajustados para o indicador sem sacarose e (b) para o indicador com sacarose (na Tabela 5.1). Aguiar, Yamashita e Gut (2012) desenvolveram um TTI com a ALP em tampão fosfato (pH 6,6), a partir de tratamento térmico convencional em banho termostatizado. Fadiloglu, Erkmen e Sekeroglu (2006) realizaram um estudo cinético com a ALP em tampão NaOH-glicina (pH 9,6), submetida a tratamento térmico convencional em banho termostatizado. Eckner (1992) estudaram a inativação térmica da ALP em leite bovino (pH 6,6) não pasteurizado, por tratamento térmico convencional em banho termostatizado. Lin e Ramaswamy (2011) avaliaram a inativação térmica da ALP em leite bovino (pH 6,6) não pasteurizado, com tratamento térmico assistido por micro-ondas.

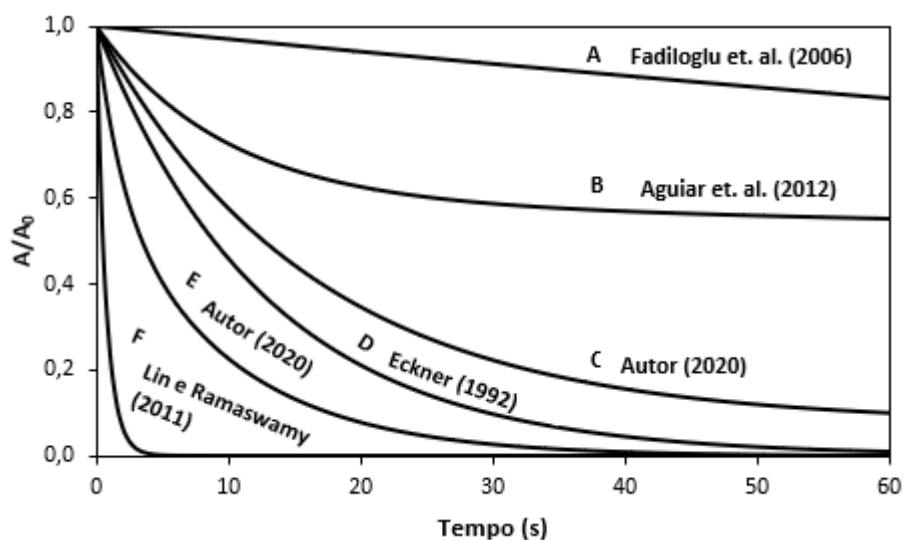
Tabela 5.1 – Parâmetros cinéticos ajustados, do modelo de 1ª ordem com duas frações, para a inativação térmica da ALP a 70 °C.

α	D_R (s)	D_L (s)	z_R	z_L	Fonte
0,65	21,86	4,17	14,04	4,10	Autor (2020a)
0,08	10440	37,40	10,00	10,00	Autor (2020b)
0,59	2187	22,09	7,57	6,57	Aguiar et. al. (2012)
1,00	756	-	23,10	-	Fadiloglu et. al. (2006)
1,00	29,61	-	6,70	-	Eckner (1992)
1,00	1,70	-	4,92	-	Lin e Ramaswamy (2011)

Fonte: Autor (2020).

A partir dos parâmetros da Tabela 5.1 e da Equação (3.8), foram feitas as curvas da atividade residual da fosfatase alcalina com o tempo, presentes na Figura 5.11. Nos casos em que não foi possível obter, na literatura, os parâmetros das frações termolábil e termorresistente, assumiu-se α igual a 1.

Figura 5.11 – Curvas de inativação térmica da fosfatase alcalina, a 70 °C, em diferentes meios e formas de tratamento térmico.



Fonte: Autor (2020).

A influência da forma de tratamento térmico e da composição do meio sobre a atividade residual da ALP fica evidente quando a mesma enzima, em um mesmo pH (9,6), é submetida a tratamento térmico convencional (A, tampão NaOH-glicina) e por micro-ondas (C e E, tampão

carbonato). O tratamento térmico por micro-ondas do indicador em tampão carbonato resulta em uma maior taxa de inativação térmica.

Foi possível observar aumento da resistência térmica, a partir da adição de sacarose à solução enzimática, pela comparação da curva de inativação à 70 °C dos dois indicadores. Mas ainda não é possível utilizar o indicador com sacarose em temperaturas muito acima de 70 °C, devido à sua falta de sensibilidade. Outras enzimas apresentam obstáculos para sua utilização como TTI, como é caso da polifenol oxidase com baixa resistência térmica, e da peroxidase, por conta do seu problema de reativação.

Nota-se que o valor de z , para o indicador sem sacarose, da isoenzima termolábil (4,10 °C) é pequeno e, portanto, mais sensível a variações de temperatura. Isso limita a inativação da ALP em uma menor faixa de temperatura. Para o indicador com sacarose, ambos os valores de z foram iguais a 10,00 °C – sendo melhor para ser usado como TTI por ser mais resistente. Valores de z iguais a 10 °C é típico de bactérias formadoras de esporos (GUT; TADINI, 2016). Os valores de z_R e z_L obtidos neste trabalho estão próximos aos valores de z para inativação de microrganismos em alimentos líquidos (CLAEYS; VAN LOEY; HENDRICKX, 2002).

6 CONCLUSÃO

Foi observado rápido aquecimento das amostras (em tampão carbonato) pelo reator por micro-ondas focalizadas e uma maior taxa de inativação térmica quando comparado ao tratamento térmico convencional (em tampão NaOH-glicina) encontrado na literatura (ambos em pH 9,6). As rampas de aquecimento apresentaram formato quase linear. A inativação do indicador sem sacarose ocorreu mais rapidamente nas temperaturas de 65 e 70 °C, enquanto que para o indicador com sacarose ocorreu entre 90 e 95 °C. Contudo, essa faixa não é adequada para utilização do indicador como TTI por não ter sensibilidade. O modelo cinético apresentou bom ajuste, confirmado pelos coeficientes de determinação – 0,97 (sem sacarose) e 0,99 (com sacarose) – e pela pequena margem de erro (menores e iguais a 10 %) no gráfico de paridade. O indicador sem sacarose pode ser usado para avaliação de sub e sobreprocessamento de processos de pasteurização HTST devido às suas frações termorresistente e termolábil, desde que seja usado em temperaturas baixas (até 70 °C). O indicador com sacarose apresentou potencial para ser usado como TTI em processos de pasteurização HTST de alimentos líquidos de baixa viscosidade, como sucos, leites, cervejas e néctares, devido à sua maior resistência térmica. Mas está restrito a temperaturas próximas de 70 °C.

REFERÊNCIAS

A.O.A.C. **The Official Methods of Analysis of AOAC International**. 20. ed. Maryland: [s.n.].

ADAMS, J. B.; BROWN, H. M. Discoloration in raw and processed fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 3, p. 319–333, 2007.

AGUIAR, H. DE F.; YAMASHITA, A. S.; GUT, J. A. W. Development of enzymic time-temperature integrators with rapid detection for evaluation of continuous HTST pasteurization processes. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 110–116, 2012.

AGUIAR, H. F.; GUT, J. A. W. Continuous HTST pasteurization of liquid foods with plate heat exchangers: Mathematical modeling and experimental validation using a time-temperature integrator. **Journal of Food Engineering**, v. 123, p. 78–86, 2014.

AHMED, J.; RAHMAN, M. S. **Handbook of Food Process Design**. Ames: Blackwell, 2012.

AHMED, J.; RAMASWAMY, H. S. Microwave Pasteurization and Sterilization of Foods. In: **Handbook of Food Preservation**. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 691–711.

ATYAKSHEVA, L. F. et al. Effect of the pH value on the thermal stability of alkaline phosphatase. **Russian Journal of Physical Chemistry**, v. 80, n. 4, p. 630–633, 2006.

AWUAH, G. B.; RAMASWAMY, H. S.; ECONOMIDES, A. Thermal processing and quality: Principles and overview. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 46, n. 6, p. 584–602, 2007.

BIRCH, G. G.; BLAKEBROUGH, N.; PARKER, K. J. **Enzymes and Food Processing**. London: Applied Science Publishers LTD, 1981.

CHANG, B. S.; PARK, K. H.; LUND, D. B. Thermal Inactivation Kinetics of Horseradish Peroxidase. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 3, p. 920–923, 1988.

CLAEYS, W. L. et al. From Time Temperature Integrator Kinetics to Time Temperature Integrator Tolerance Levels: Heat-Treated Milk. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 1, p. 1–12, 2004.

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

10, p. 293–311, 2002.

CORONEL, P. et al. Aseptic Processing of Sweetpotato Purees Using a Continuous Flow Microwave System. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 9, p. 531–536, 2005.

CULLEN, P. J.; TIWARI, B. K.; VALDRAMIDIS, V. P. Status and Trends of Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods. In: **Novel Thermal And Non-Thermal Technologies For Fluid Foods**. [s.l.] Elsevier Inc., 2012. p. 1–6.

DATTA, A. K.; ANANTHESWARAN, R. C. **Handbook of microwave technology for food applications**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2001.

DEMIRDÖVEN, A.; BAYSAL, T. **Effects of electrical pre-treatment and alternative heat treatment applications on orange juice production and storage** **Food and Bioproducts Processing**, 2015.

DRUCKREY, I.; KLEYN, D. H.; MURTHY, G. K. Phosphatase Methods. In: RICHARDSON, G. H. (Ed.). **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 15. ed. Washington, D. C.: American Public Health Association, 1985. p. 311–318.

ECKNER, K. F. Fluorometric analysis of alkaline phosphatase inactivation correlated to Salmonella and Listeria inactivation. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 12, p. 960–963, 1992.

FADILOGLU, S.; ERKMEN, O.; SEKEROGLU, G. Thermal Inactivation Kinetics of alkaline phosphatase in buffer and milk. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 30, p. 258–268, 2006.

FELLOWS, P. J. Processamento por Aplicação de Calor. In: **Tecnologia do Processamento de Alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 239–259.

FLEMING, H. Effect of high-frequency fields on micro-organisms. **Electrical Engineering**, v. 63, n. 1, p. 18–21, 1944.

FOX, P. F. **Food Enzymology**. New York: Elsevier Science Publishing LTD, 1991.

FUJIKAWA, H.; ITOH, T. Characteristics of a multicomponent first-order model for thermal inactivation of microorganisms and enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, n. 1–3, p. 263–271, 1996.

FUJIKAWA, H.; USHIODA, H.; KUDO, Y. Kinetics of Escherichia coli destruction by

microwave irradiation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 920–924, 1992.

GEORGIADIS, M. C.; MACCHIETTO, S. Dynamic modelling and simulation of plate heat exchangers under milk fouling. **Chemical Engineering Science**, v. 55, n. 9, p. 1605–1619, 2000.

GIL, M. M. et al. Mathematical Models for Prediction of Temperature Effects on Kinetic Parameters of Microorganisms' Inactivation: Tools for Model Comparison and Adequacy in Data Fitting. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, n. 12, p. 2208–2225, 2017.

GRIJSPEERDT, K. et al. Applications of modelling to optimise ultra high temperature milk heat exchangers with respect to fouling. **Food Control**, v. 15, n. 2, p. 117–130, 2004.

GRIJSPEERDT, K.; HAZARIKA, B.; VUCINIC, D. Application of computational fluid dynamics to model the hydrodynamics of plate heat exchangers for milk processing. **Journal of Food Engineering**, v. 57, n. 3, p. 237–242, 2003.

GUT, J. A. W. et al. Continuous pasteurization of egg yolk : thermophysical properties and process simulation. **Journal of Food Process Engineering**, v. 28, p. 181–203, 2005.

GUT, J. A. W. **Modelagem matemática e validação experimental da pasteurização de alimentos líquidos em trocadores de calor a placas**. [s.l.: s.n.].

GUT, J. A. W.; PINTO, J. M. **Optimal Design of Continuous Sterilization Processes with Plate Heat Exchangers**. (L. Puigjaner, A. Espuña, Eds.)European Symposium on Computer Aided Process Engineering. **Anais...**New York: CRC Press, 2005

GUT, J. A. W.; SONG, T. W. Trocadores de calor. In: TADINI, C. C. et al. (Eds.). . **Operações Unitárias na Indústria de Alimentos**. [s.l.] LTC, 2016. p. 355–380.

GUT, J. A. W.; TADINI, C. C. Processamento Térmico de Alimentos. In: TADINI, C. C. et al. (Eds.). . **Operações Unitárias na Indústria de Alimentos**. [s.l.] LTC, 2016. p. 443–484.

GUTIERREZ, C. G. C. C.; DIAS, E. F. T. S.; GUT, J. A. W. Residence time distribution in holding tubes using generalized convection model and numerical convolution for non-ideal tracer detection. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 2, p. 248–256, 2010.

HENDRICKX, M. et al. Evaluation of the integrated time-temperature effect in thermal

processing of foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, n. 3, p. 231–262, 1995.

JUNG, A.; FRYER, P. J. Optimising the quality of safe food: Computational modelling of a continuous sterilisation process. **Chemical Engineering Science**, v. 54, n. 6, p. 717–730, 1999.

KAPPE, C. O. How to measure reaction temperature in microwave-heated transformations. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 12, p. 4977–4990, 2013.

KAPPE, C. O.; PIEBER, B.; DALLINGER, D. Microwave Effects in Organic Synthesis: Myth or Reality? **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 52, n. 4, p. 1088–1094, 2013.

KLUCK, J. H. **Microwave Apparatus for Rapid Heating of FLuids**US740, 177, , 1970.

KOSTADINOVA, S.; MARHOVA, M. Purification and properties of alkaline phosphatase from bacillus cereus. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 24, p. 602–606, 2014.

KOUTSOUMANIS, K. P.; GOUGOULI, M. Use of Time Temperature Integrators in food safety management. **Trends in Food Science and Technology**, v. 43, n. 2, p. 236–244, 2015.

LEWIS, M.; HEPPELL, N. **Continuous Thermal Processing of Foods Pasteurization and UHT Sterilization**. [s.l: s.n.]. v. 36

LIN, M.; RAMASWAMY, H. S. Evaluation of phosphatase inactivation kinetics in milk under continuous flow microwave and conventional heating conditions. **International Journal of Food Properties**, v. 14, n. 1, p. 110–123, 2011.

LOUPY, A. **Microwaves in organic synthesis**. 2. ed. Weinheim: Wiley-VHC, 2006.

MILES, J. J.; SWARTZEL, K. R. Evaluation of continuous thermal processes using thermocouple data and calibrating reactions. **Journal of Food Process Engineering**, n. 18, p. 99–113, 1995.

MURASAKI-ALIBERTI, N. D. C. et al. Thermal inactivation of polyphenoloxidase and peroxidase in green coconut (*Cocos nucifera*) water. **International Journal of Food**

Science and Technology, v. 44, n. 12, p. 2662–2668, 2009.

NAGODAWITHANA, T.; REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 3. ed. London: Academic Press, INC, 1993.

PAINTER, C. J.; BRADLEY, R. L. Residual Alkaline Phosphatase Activity in Milks Subjected to Various Time-Temperature Treatments. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 5, p. 525–530, 1997.

PEREIRA, R. N.; VICENTE, A. A. Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. **Food Research International**, v. 43, n. 7, p. 1936–1943, 2010.

PORCELLI, M. et al. Non-thermal effects of microwaves on proteins: Thermophilic enzymes as model system. **FEBS Letters**, v. 402, n. 2–3, p. 102–106, 1997.

RAMASWAMY, H.; MARCOTTE, M. Thermal Processing. In: **Food Processing Principles and Applications**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 67–168.

RAVIYAN, P. et al. Physicochemical properties of a time-temperature indicator based on immobilization of *Aspergillus oryzae* α -amylase in polyacrylamide gel as affected by degree of cross-linking agent and salt content. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 7, p. 2302–2308, 2003.

SARAVACOS, G. D.; MAROULIS, Z. B. Thermal Processing Operations. In: **Food Process Engineering Operations**. Boca Raton: CRC Press, 2011. p. 281–309.

SCHMIDT, A.; MAYER, H. K. Milk process authentication by vitamin B6 as a novel time temperature integrator. **Food Control**, v. 91, p. 123–127, 2018.

SCHUBERT, H.; REGIER, M. **The microwave processing of foods**. 1. ed. [s.l.] CRC Press, 2005.

SEKIGUCHI, S. et al. Stabilization of bovine intestine alkaline phosphatase by sugars. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 76, n. 1, p. 95–100, 2012.

SHAHEEN, M. S. et al. Microwave Applications in Thermal Food Processing. In: CAO, W. (Ed.). **The Development and Application of Microwave Heating**. Rijeka: InTech, 2012. v. 96p. 3–16.

SHAMIS, Y. et al. Specific Electromagnetic Effects of Microwave Radiation on

Escherichia coli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 9, p. 3017–3022, 2011.

SINGH, R. P.; HELDMAN, D. R. Introduction To Food Engineering. In: 4. ed. London: Academic Press in an imprint of Elsevier, 2009. p. 247–413.

TANG, L. T. et al. **Purification and some properties of alkaline phosphatase from the liver of Bos taurus**. 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, iCBBE. **Anais...Chongqing**: 2010

TANG, Y. M. et al. **Isolation, Purification and some properties of alkaline phosphatase from Hypophthalmichthys molitrix Cuv. et Val.** 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, iCBBE. **Anais...Chongqing**: 2008

TAOUKIS, P. S.; LABUZA, T. P. Applicability of Time-Temperature indicators as shelf life monitors of food products. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 4, p. 783–788, 1989.

TEWARI, G.; JUNEJA, V. K. **Advances in Thermal and Non-Thermal Food Preservation**. 1. ed. Ames: Blackwell, 2007.

TOLEDO, R. T. **Fundamentals of Food Process Engineering**. third ed. New York: Aspen, 2007.

TOWLER, C. Developments in Cream Separation and Processing. In: ROBINSON, R. K. (Ed.). **Modern Dairy Technology**. 2. ed. [s.l.] Chapman & Hall, 1994. p. 61-.

TRIBESS, T. B.; TADINI, C. C. Inactivation kinetics of pectin methyl- esterase in orange juice as a function of pH and temperature/time process conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1328–1335, 2006.

TUCKER, G. A.; WOODS, L. F. J. **Enzymes in Food Processing**. 2. ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1995.

UDDIN, Z.; BOONSUPTHIP, W. Development and characterization of a new nonenzymatic colored time–temperature indicator. **Journal of Food Process Engineering**, n. July 2018, p. 1–9, 2019.

VAN LOEY, A. et al. Quantitative evaluation of thermal processes using time-temperature integrators. **Trends in Food Science and Technology**, v. 7, n. 1, p. 16–26, 1996.

VAN LOEY, A. M. et al. Enzymic time-temperature integrators for the quantification of thermal processess in terms of food safety. In: OLIVEIRA, F. A. R.; OLIVEIRA, C.;

HENDRICKX, M. E. (Eds.). . **Processing Food: Quality Optimization and Process Assessment**. Boca Raton: CRC Press, 1999. p. 13–36.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. second ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC, 2006.

WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. G. J.; WONG, D. W. S. **Handbook of Food Enzymology**. New York e Basel: Marcel Dekker, 2003.

XU, B. et al. Thermal versus Microwave Inactivation Kinetics of Lipase and Lipoxygenase from Wheat Germ. **Journal of Food Process Engineering**, v. 39, n. 3, p. 247–255, 2016.