

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**  
**DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**ESTABILIDADE E QUALIDADE DE IOGURTE ADICIONADO DE LUTEÍNA E  
VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RIBOFLAVINA EM  
IOGURTE**

*Lígia Dozena Domingos*

Bacharel em Ciências dos Alimentos

*Walkiria Hanada Viotto*

Orientadora

*Renato Atilio Jorge*

Co-orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos

Campinas - SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

<p>Domingos, Lúgia Dozena D713e Estabilidade e qualidade de iogurte adicionado de luteína e validação de método para determinação de riboflavina em iogurte / Lúgia Dozena Domingos. -- Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientador: Walkiria Hanada Viotto Co-orientador: Renato Atílio Jorge Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.</p> <p>1. Leite fermentado. 2. Carotenóides. 3. Foto-oxidação. 4. Espectroscopia de fluorescência. I. Viotto, Walkiria Hanada. II. Jorge, Renato Atílio. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.</p> <p>cars/bibfea</p>
--

Título em inglês: Stability and quality of yogurt supplemented with lutein and validation method  
for determination of riboflavin in yogurt

Palavras-chave em inglês (Keywords): Fermented milk, Carotenoids, Photooxidation,  
Fluorescence spectroscopy

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Walkiria Hanada Viotto  
José de Assis Fonseca Faria  
Leila Maria Spadoti

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto**

**(Orientadora)**

---

**Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria**

**(Membro)**

---

**Dra. Leila Maria Spadoti**

**(Membro)**

---

**Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante**

**(Membro)**

---

**Dra. Ariene Gimenes Fernandes Van Dender**

**(Membro)**

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida em \_\_/\_\_/\_\_ por  
Lígia Dozena Domingos aprovado pela comissão julgadora em \_\_/\_\_/\_\_.



CADA OVO REPRESENTA UMA PREOCUPAÇÃO, E O OBJETIVO É DAR A CADA UMA A DEVIDA ATENÇÃO, SEM DEIXAR DE FICAR DE OLHO EM TODAS AS OUTRAS.



*Aos meus queridos pais e irmão*

## AGRADECIMENTOS

À vida.

À minha querida Mãe, Maria Helena, pela incansável dedicação, apoio e amor infinito; ao meu querido Pai, Reginaldo, por todo apoio, carinho e exemplo profissional e ao meu querido irmão Vítor, pelo carinho, pela paciência e pelos conselhos. Obrigada por estarem comigo e por sempre me ampararem quando achei que não fosse mais conseguir. Amo vocês!

À Professora Walkiria, pela orientação, dedicação a este trabalho, confiança e paciência. Obrigada por todo conhecimento adquirido, amizade e exemplo profissional.

Ao Professor Renato, por toda dedicação e paciência, que resultaram em uma das partes mais importantes deste trabalho.

À Professora Adriana, pelo aprendizado e por todo suporte cedido ao projeto, que permitiu o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Ademir e à Clarissa pelo auxílio com a parte estatística.

Aos membros da banca examinadora pelas correções e sugestões.

À CAPES, pela bolsa de pesquisa concedida durante o curso, e à FAPESP pelo financiamento do projeto.

À Bete, do laboratório de leite pela amizade e por sempre ser tão atenciosa.

À Claudia Martelli e à todos do Instituto de Química pela contribuição para o desenvolvimento das análises.

Ao Professor Assis, Adriano, Wellington e à Alice do laboratório de embalagens por todo apoio, espaço, equipamentos e embalagens cedidos.

À Ana Augusta, do Departamento de Ciência de Alimentos pelo auxílio nas análises, apoio e amizade.

À querida tia Rosilene, pelo carinho e incentivo.

Às queridas Mônica, Clarice e Veridiana por toda ajuda, e principalmente pela amizade mais que especial e tenho certeza que eterna. Não sei o que seria de mim sem vocês! Infinitamente obrigada!

À Manuzinha, pelo carinho, amizade, alegria, e por sempre estar com o coração aberto para ajudar, aconselhar e ouvir.

Ao Diogo, pela amizade, ajuda e alegria. À Maria Cecília, Karina, Luana, Marcília, Mirian, Ana Carolina e Camila pelo apoio e amizade.

Às meninas de C.A. Vanessa, Luciane, Claudiene, Karim, Patrícia, Luciana, e Bruna, que mesmo distantes me ajudaram muito, simplesmente pela amizade verdadeira e eterna existente entre nós.

À Pri, pela amizade, cumplicidade, ouvidos e conselhos. Quem diria que a gente fosse se entender tão bem? À Simone e Danielle, esalqueanas queridas que tive o privilégio de conhecer melhor aqui em Campinas.

À Carol e à Ana Paula, por fazerem de nossa casinha o lar mais aconchegante do mundo. Obrigada por todo carinho e alegria que vocês proporcionam todos os dias!

Ao Professor Alex, pela alegria e por me desligar do mundo durante algumas poucas (e preciosas) horas durante a semana.

Às decepções e desilusões, com as quais aprendo muito e aos poucos me fortalecem.

À todos que de alguma forma contribuíram e fizeram parte da minha caminhada.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xii
RESUMO GERAL.....	xiii
GENERAL SUMMARY.....	xv
INTRODUÇÃO .....	1

### CAPÍTULO I

LUTEÍNA: PROPRIEDADES, BENEFÍCIOS E APLICAÇÃO EM PRODUTOS LÁCTEOS.	2
RESUMO .....	3
SUMMARY .....	4
1. INTRODUÇÃO .....	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 Carotenóides.....	6
2.2 Luteína.....	7
2.2.1 <i>Efeitos do processamento e estocagem</i> .....	10
2.2.2 <i>Luteína e produtos lácteos</i> .....	12
2.2.3 <i>Benefícios à saúde</i> .....	13
2.2.4 <i>Atividade antioxidante</i> .....	17
3. Iogurte .....	19
4. Mecanismo de Foto-oxidação .....	20
4.1 Avaliação do foto-oxidação em produtos lácteos.....	22
4.2 Fatores que influenciam a fotossensibilidade de produtos lácteos.....	23
5. CONCLUSÃO .....	24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	25

## CAPÍTULO II

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFLUORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE RIBOFLAVINA EM IOGURTE. ....	36
RESUMO .....	37
SUMMARY .....	38
1. INTRODUÇÃO .....	39
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	40
2.1. Reagentes .....	40
2.2. Produção de iogurte.....	40
2.3. Procedimentos para a validação do método .....	40
2.3.1. Determinação da equivalência entre RBF e RBPO .....	41
2.3.2. Determinação da massa de RBF no leite Molico® .....	41
2.3.3. Avaliação de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.....	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
3.1. Titulação espectrofluorimétrica de RBF por RBPO.....	44
3.2. Equivalência entre RBF e RBPO .....	44
3.3. Massa de RBF no leite Molico® .....	45
3.4. Seletividade e linearidade.....	45
3.5. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) .....	46
3.6 Precisão .....	46
3.7 Exatidão.....	46
3.8 Robustez.....	47
3.9 Faixa de aplicação .....	47
4. CONCLUSÃO .....	47
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48
6. FIGURAS.....	50

## CAPÍTULO III

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE LUTEÍNA , TIPO DE EMBALAGEM E EXPOSIÇÃO À LUZ NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DO IOGURTE.....	55
RESUMO .....	56
SUMMARY .....	57
1. INTRODUÇÃO .....	58
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	60
2.1 Materiais.....	60
2.2 Preparo dos iogurtes.....	61
2.3 Composição dos iogurtes .....	62
2.4 Análises realizadas durante o estocagem dos iogurtes.....	62
2.4.1 Teor de oxigênio.....	62
2.4.2 Carotenóides totais .....	62
2.4.3 Determinação de riboflavina .....	64
2.4.4 Avaliação da degradação de RBF.....	64
2.5 Planejamento experimental e avaliação estatística dos resultados .....	65
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	67
3.1 Composição do iogurte.....	67
3.2 Influência da luz e da embalagem na estabilidade do corante luteína adicionado ao iogurte .....	67
3.3. Influência da luz e da embalagem na estabilidade do teor de riboflavina dos iogurtes ...	69
3.3.1 Degradação da riboflavina .....	75
4. CONCLUSÃO .....	76
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76
CONCLUSÃO GERAL.....	79

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO III

TABELA 1. COMPOSIÇÃO MÉDIA DOS IOGURTES COM E SEM ADIÇÃO DE LUTEÍNA.....	67
TABELA 2. TEOR DE CAROTENÓIDES TOTAIS EM IOGURTES ADICIONADOS DE CORANTE LUTEÍNA. ....	68
TABELA 3. VALORES DE RBF EM IOGURTES COM E SEM ADIÇÃO DE CORANTE LUTEÍNA..	70
TABELA 4. QUADRADOS MÉDIOS E PROBABILIDADES PARA RIBOFLAVINA DOS IOGURTES DURANTE O TEMPO DE ESTOCAGEM. ....	71

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

FIGURA 1. ESTRUTURA QUÍMICA DA LUTEÍNA E ZEAXANTINA ..... 7

FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESPÉCIES REATIVAS FORMADAS A PARTIR DA SENSITIZAÇÃO DA RIBOFLAVINA. .... 21

### CAPÍTULO II

FIGURA 1. DIMINUIÇÃO DA INTENSIDADE DO ESPECTRO DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA. .... 50

FIGURA 2. FLUORESCÊNCIA EM FUNÇÃO DO VOLUME DE RBPO ADICIONADO. .... 51

FIGURA 3. INCLINAÇÃO VERSUS EQUIVALÊNCIA ..... 52

FIGURA 4. CURVA ANALÍTICA DE SELETIVIDADE. .... 53

FIGURA 5. CURVA ANALÍTICA UTILIZADA NA DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO..... 54

### CAPÍTULO III

FIGURA 1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL: DELINEAMENTO TIPO *SPLIT-SPLIT-SPLIT-PLOT*. .... 66

FIGURA 2. EFEITO DA LUZ NO TEOR DE LUTEÍNA COM O TEMPO DE ESTOCAGEM. .... 69

FIGURA 3. INTERAÇÃO DOS FATORES LUZ E TEMPO SOBRE OS TEORES DE RBF. .... 72

FIGURA 4. EFEITO DA INTERAÇÃO LUZ E LUTEÍNA SOBRE O TEOR DE RBF. .... 73

FIGURA 5. INTERAÇÃO DOS FATORES TEMPO E LUTEÍNA SOBRE O TEOR DE RBF. .... 74

FIGURA 6. ESPECTRO FLUORESCENTE DOS IOGURTES SEM ADIÇÃO DE CORANTE LUTEÍNA APÓS EXPOSIÇÃO À LUZ DURANTE 35 DIAS. .... 75

## RESUMO GERAL

A luteína, a qual são atribuídas propriedades antioxidantes, está associada à diminuição e prevenção da degeneração macular relacionada à idade (DMRI), principal causa de cegueira irreversível em idosos. Como este carotenóide não é sintetizado pelo organismo humano, a sua adição em iogurte é mais uma opção de suplementação de luteína, além de poder atuar na prevenção de foto-oxidação. As condições de estocagem de iogurtes em supermercados pode levar às alterações no produto devido à presença de riboflavina (RBF), que sob estímulo da luz e presença de oxigênio, promove oxidação de vitaminas, carboidratos, lipídeos e proteínas levando à formação de *off-flavors* e perda de nutrientes. Como a RBF emite fluorescência, uma das maneiras de avaliar a ocorrência de foto-oxidação em produtos lácteos é a determinação fluorimétrica da RBF. Para tal, uma metodologia empregando titulação espectrofluorimétrica de RBF utilizando proteína ligante de riboflavina (RBPO) como titulante, para determinação de RBF em leite foi otimizado e validado para iogurte. As determinações de RBF foram realizadas em espectrofluorímetro com acessório para medidas em *front-face*, em um ângulo de 27°. A seletividade do método foi determinada pela adição de padrão de RBF no iogurte e em água. As curvas se apresentaram paralelas com inclinações de  $1,001 \pm 0,007$  e  $1,00 \pm 0,03$  para as titulações de RBF em água e em iogurte, e os limites de detecção e quantificação foram  $0,0558 \mu\text{g}$  e  $0,1691 \mu\text{g}$  respectivamente. A repetitividade, estimada pelo desvio padrão relativo, foi de 4,0 %. A exatidão foi de  $99 \pm 2 \%$ , e os experimentos de robustez mostraram que o método é efetivo mesmo quando o produto foi analisado após 30 dias de estocagem, em iogurtes produzidos em dias diferentes, com diferentes massas de iogurte, com e sem adição de água.

A influência da luz, embalagem e adição de luteína na estabilidade oxidativa do iogurte durante o tempo de estocagem foi estudada. Adicionou-se corante contendo o equivalente a 1,5 mg de luteína, e o produto final acondicionado em embalagens com diferentes barreiras ao O<sub>2</sub>, foi estocado a 5°C, na presença e ausência de luz durante 35 dias. As amostras foram analisadas nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35, e os parâmetros avaliados foram os teores de carotenóides totais, riboflavina, oxigênio dissolvido na

amostra e presente no espaço vazio (*headspace*). Houve degradação da riboflavina nos iogurtes sem luteína e expostos à luz. Os iogurtes com luteína apresentaram teor de riboflavina e luteína constantes durante o tempo de estocagem, independente do tipo de embalagem usado. Quando presente, a luteína exerceu um papel protetor, impedindo a degradação da riboflavina e aumentando a estabilidade oxidativa do iogurte.

**Palavras-chave: iogurte, luteína, riboflavina, foto-oxidação, espectroscopia de fluorescência.**

## GENERAL SUMMARY

Lutein, to which is attributed antioxidant properties, is associated with reduction and prevention of age-related macular degeneration (ARMD), the leading cause of irreversible blindness in the elderly. This carotenoid is not synthesized by the human body, and its addition in yogurt is another option for supplemental lutein and could act in preventing photo-oxidation. The conditions of storage of yogurt in supermarkets can lead to changes in the product due to the presence of riboflavin (RBF), which under the stimulus of light and the presence of oxygen, promotes oxidation of vitamins, carbohydrates, lipids and proteins, leading to the formation of off-flavors and loss of nutrients. Since RBF fluoresces, one of the ways to evaluate the occurrence of photo-oxidation in dairy products is the fluorimetric determination of the RBF. For this, a methodology for the determination of RBF in milk employing spectrofluorimetric titration using the protein (RBPO) as titrant was optimized and validated for yogurt. Measurements of RBF were performed using a spectrofluorimeter with accessory measures in front-face at an angle of  $27^\circ$ . The selectivity of the method was determined by standard addition of RBF in yogurt and in water. The curves performed in parallel with slopes of  $1.001 \pm 0.007$  and  $1.00 \pm 0.03$  RBF for titrations in water and in yoghurt and the detection limits and quantification were  $0.0558 \mu\text{g}$  and  $0.1691 \mu\text{g}$ , respectively. The repeatability, estimated by the relative standard deviation was 4.0%. The accuracy was  $99 \pm 2\%$  and the experiments showed that method robustness is effective even when the product was tested after 30 days of storage for yogurts produced on different days with different masses of yogurt, with or without addition of water.

The influence of light, packaging and addition of lutein to yogurt during storage time was studied. A dye containing the equivalent of 1.5 mg of lutein was added and the final product was packed in containers with different barriers to  $\text{O}_2$  stored at  $5^\circ \text{C}$  in the presence and absence of light. The samples were analyzed on days 0, 7, 14, 21, 28 and 35. The parameters evaluated were the levels of carotenoids and riboflavin, and of oxygen dissolved in the sample and present in the headspace. There was degradation of riboflavin in yogurt without lutein and exposed to light. The yogurts with lutein showed

that riboflavin content and lutein contents were constant during the storage time, regardless of the packaging used. When present, lutein had a protective role, preventing the degradation of riboflavin and increasing the oxidative stability of yogurt.

**Keywords: yogurt, lutein, riboflavin, photooxidation, fluorescence spectroscopy.**

## INTRODUÇÃO

Os carotenóides são pigmentos naturais conhecidos por sua atividade biológica e aplicação como corantes, dentre os quais se destaca a luteína, uma xantofila que se acumula na mácula, parte central da retina humana responsável pela acuidade visual e a qual se atribuem propriedades antioxidantes e diversas atividades biológicas contra doenças degenerativas. A luteína está associada principalmente com a diminuição e prevenção da ocorrência de catarata e degeneração macular relacionada à idade (DMRI), que é a principal causa de cegueira irreversível em idosos. A luteína não é sintetizada pelo organismo humano e pode ser encontrada em verduras folhosas escuras, como espinafre, brócolis e couve e, na forma de suplementos. Com a crescente valorização de alimentos industrializados funcionais e o aumento da preocupação com a saúde e bem-estar, a aplicação da luteína como ingrediente em bebidas e alimentos pode ser bastante conveniente e atrativa. Neste cenário os produtos lácteos se destacam e são os principais veículos para adição de substâncias funcionais. Entretanto, a luteína e os produtos lácteos são sensíveis à ação da luz e do oxigênio. Os produtos lácteos são sensíveis à luz devido à presença da riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>), caracterizada por ser um forte sensibilizador, capaz de absorver a energia luminosa e transferi-la para moléculas de oxigênio altamente reativas, desencadeando uma série de reações de oxidação nos componentes do leite resultando em perdas nutricionais e alterações sensoriais. Sabe-se também que os carotenóides atuam como antioxidantes uma vez que desativam espécies reativas de oxigênio e sensibilizadores excitados, além de atuarem como filtro à luz. A espectroscopia de fluorescência aliada à técnica de *front-face* tem sido amplamente explorada para a avaliação da foto-oxidação em produtos lácteos. É importante estudar a estabilidade da luteína durante o processamento e a estocagem dos produtos lácteos e a qualidade dos produtos adicionados de luteína e a capacidade antioxidante da luteína na prevenção das reações de oxidação do leite e seus derivados.

## **CAPÍTULO I**

### **LUTEÍNA: PROPRIEDADES, BENEFÍCIOS E APLICAÇÃO EM PRODUTOS LÁCTEOS.**

A ser submetido à revista “Brazilian Journal of Food Technology”

# **LUTEÍNA: PROPRIEDADES, BENEFÍCIOS E APLICAÇÃO EM PRODUTOS LÁCTEOS**

## **RESUMO**

Esta revisão aborda as características dos carotenóides com destaque para a luteína e sua importância como agente antioxidante. São descritos os benefícios trazidos à saúde devido ao consumo de fontes de luteína, como por exemplo, diminuição da incidência de Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) e de catarata. Também é discutido o comportamento da luteína frente às diversas condições de processamento e estocagem. Em vista da possibilidade de adição de luteína em produtos lácteos como, por exemplo, em iogurte, é abordada a estabilidade destes produtos em relação à luz e ao oxigênio. Estes fatores podem ser prejudiciais tanto para luteína quanto para riboflavina, a qual está naturalmente presente e pode desencadear reações de foto-oxidação, prejudicando a qualidade do produto. É apresentada uma maneira de monitorar a foto-oxidação em iogurte, por meio da utilização de espectroscopia de fluorescência aliada à técnica de *front-face*, e por fim, destaca-se a influência de diferentes embalagens utilizadas no acondicionamento de produtos lácteos.

**Palavras-chave:** luteína, riboflavina, foto-oxidação, produtos lácteos, espectroscopia de fluorescência, embalagens plásticas.

## SUMMARY

This review deals with the characteristics of the carotenoid lutein and highlights its importance as an antioxidant agent. The benefits to health due to consumption of sources of lutein, such as decreased incidence of age-related macular degeneration (ARMD) and cataracts are described. The behavior of lutein against the various conditions of processing and storage are discussed. Considering the possibility of adding lutein to milk products, for example, in yogurt, the stability of these products in relation to light and oxygen is addressed. These factors can be harmful for both lutein and for riboflavin, which is naturally present and can trigger reactions of photo-oxidation, impairing the quality of the product. It presents a way to monitor the photo-oxidation in yoghurt, through the use of a front-face fluorescence spectroscopy technique and, finally, highlights the influence of different packaging materials used for packaging dairy products.

**Key-words: lutein, riboflavin, photooxidation, dairy products, fluorescence spectroscopy, plastic packaging.**

## 1. INTRODUÇÃO

O crescimento da população de idosos é um fenômeno mundial que está ocorrendo em níveis sem precedentes. Em 1950, eram cerca de 204 milhões de idosos no mundo; em 1988, este contingente alcançou 579 milhões de pessoas. Projeções indicam que, em 2050, a população idosa será de 1 bilhão e 900 milhões de pessoas. Considerando as tendências verificadas para as taxas de fecundidade e longevidade da população brasileira, as estimativas para os próximos 20 anos indicam que a população idosa pode exceder 30 milhões de pessoas, representando aproximadamente 13% da população brasileira (IBGE, 2002).

O envelhecimento é um processo natural que se inicia no nascimento, e envolve diversas alterações fisiológicas como alterações no funcionamento do sistema digestivo, nas condições físicas e na percepção sensorial (GUIMARÃES, 2004). Uma das deficiências decorrentes do avanço da idade, a degeneração macular relacionada à idade (DMRI) atinge 25% da população acima de 75 anos no Brasil, sendo responsável pela cegueira irreversível (IOG, 2010; CBO, 2010). A ingestão de 6 mg ao dia de luteína (SEDDON, 1994) está associada à diminuição da ocorrência e prevenção da DMRI. Atualmente, o tratamento e a prevenção de DMRI são realizados por meio da ingestão de cápsulas de luteína.

O leite e seus derivados constituem-se uma das melhores fontes de cálcio, vitaminas, e proteínas, com inúmeras funções no organismo. Os produtos lácteos atuam como elo na união das tendências representadas pelo aumento na proporção de idosos na população e pela busca por hábitos alimentares mais saudáveis.

A prosperidade do setor lácteo se justifica tanto pelo apelo nutricional como pelo funcional dos produtos derivados do leite, uma vez que os consumidores tendem a pagar mais por produtos que acreditam contribuir beneficentemente para a saúde. No Brasil, houve um aumento de 20% no consumo de alimentos funcionais de 2001 a 2005, um mercado que em 2005 movimentou US\$ 600 milhões. Nos últimos cinco anos, o consumo de alimentos saudáveis no Brasil (considerados produtos *diet* e *light*, alimentos funcionais, orgânicos, naturalmente saudáveis e específicos para quem tem intolerância a certos tipos de alimentos) passou de R\$ 15,9 bilhões, em 2004, para R\$ 28,9 bilhões em 2009, indicando um crescimento de 82%. Acredita-se que até 2014 o

consumo destes alimentos cresça mais 39% e chegue aos R\$ 39,2 bilhões (SEBRAE, 2010).

Os produtos lácteos vêm sendo o principal veículo para a adição de substâncias benéficas à saúde. Um exemplo disso é o iogurte adicionado de probióticos, que corresponde a 75% dos produtos funcionais comercializados no mundo inteiro. As vendas de iogurtes no mundo saltaram de US\$ 29,3 bilhões para US\$ 47,6 no período de 2002 a 2007 (MILK POINT, 2008). No Brasil, o iogurte foi o produto que mais cresceu em consumo no ano de 2007, com aumento de 32% das vendas em relação a 2006 (NECNETWORK, 2008). Uma pesquisa realizada pela FIESP e IBOPE (2010) indica que o iogurte é o produto que mais desperta o desejo no consumidor quando lançado no mercado, à frente de biscoitos, sucos prontos para beber, chocolates, queijos, alimentos congelados e arroz.

O consumo de iogurte, além de ser fonte de cálcio e vitaminas como o leite, apresenta como benefícios a fácil digestão, auxilia na recuperação do organismo após problemas digestivos, apresenta teor reduzido de lactose, além de ser conveniente. Entretanto, o iogurte pode sofrer modificações frente às condições de estocagem em supermercados devido à presença de riboflavina, que sob o estímulo de luz e na presença de oxigênio, promove oxidação de vitaminas, carboidratos, lipídios e proteínas (SKIBSTED, 2000). Da mesma forma, a luteína também pode ser degradada na presença de luz e oxigênio (CALVO, 2005).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Carotenóides**

Os carotenóides são pigmentos amplamente distribuídos na natureza e encontrados em plantas superiores, algas, fungos e bactérias e também em alguns animais como pássaros e crustáceos. Somente plantas e microrganismos sintetizam carotenóides e, portanto a sua presença em animais é atribuída à ingestão de alimentos (BRITTON, 2006. OTLES, 2006).

Os carotenóides são caracterizados pela presença de uma cadeia de carbono central onde se alternam ligações simples e duplas, e de grupos cíclicos ou acíclicos nas extremidades da cadeia (BRITTON, 1995a). A maioria dos carotenóides apresenta características lipofílicas e, portanto, é solúvel em óleos e solventes orgânicos. Além disso, os carotenóides são moderadamente estáveis ao calor, apresentam perda de

coloração ao sofrer oxidação e podem ser facilmente isomerizados por ação do calor, ácido ou luz. Os carotenóides abrangem cores que vão do amarelo ao vermelho e assim, apresentam comprimentos de onda de aproximadamente 430 a 480 nm. Por apresentarem uma estrutura altamente insaturada e conjugada, os produtos de degradação dos carotenóides são bastante complexos. Durante a oxidação, compostos com grupos carboxílicos e epóxidos são formados inicialmente. A oxidação também resulta na formação de compostos de cadeia curta mono e di-oxigenados, muitos deles voláteis (ELBE e SCHWARTZ, 1996).

## 2.2 Luteína

Os carotenóides compreendem dois grupos estruturais: os carotenos, que possuem cadeia caracterizada pela presença de carbono e hidrogênio e as xantofilas que apresentam oxigênio na cadeia e consistem em uma variedade de derivados que geralmente contêm grupos hidroxílicos, epóxido e aldeído, por exemplo, (ELBE e SCHWARTZ, 1996). A luteína é a xantofila dominante em vegetais amarelos e de folhas verdes e também no plasma humano. A zeaxantina é um isômero da luteína, diferindo estruturalmente na posição de uma ligação dupla. A luteína apresenta grupos terminais  $\beta$  e  $\epsilon$ , enquanto a zeaxantina é simétrica e possui dois grupos terminais  $\beta$  (Figura 1). Tanto a luteína quanto a zeaxantina são dihidroxicarotenóides com grupos hidroxilas localizados nos carbonos 3 e 3'. Fontes ricas em luteína incluem couve (15 mg/100g), salsa (10,82 mg/100g) espinafre (9,2 mg/100g), abóbora (2,4 mg/100g) e brócolis (1,5 mg/100g) (CARVALHO, 2000).

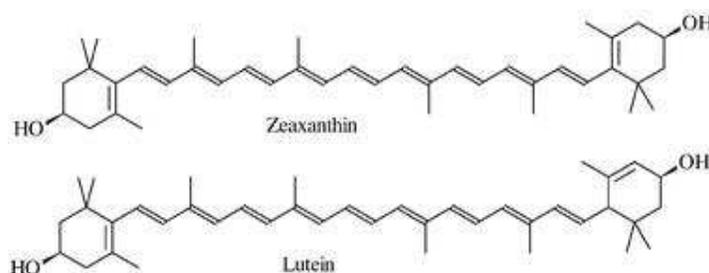


Figura 1. Estrutura química da luteína e zeaxantina

Em humanos, assim como em plantas, acredita-se que a luteína apresenta duas grandes funções protetoras: (1) como filtro de luz azul e (2), como inativador e

sequestrador de espécies reativas de oxigênio foto-induzidas (ALVES-RODRIGUES e SHAO, 2004). A luz azul (de comprimento de onda de aproximadamente 450 nm) é a forma de luz visível de maior energia, e é conhecida por induzir dano foto-oxidativo pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). A luteína, com pico de absorção a 446 nm no espectro visível tem propriedade antioxidante atribuída à sua estrutura caracterizada pela presença de elevado número ligações duplas alternadas. Estas ligações permitem a absorção de energia das espécies reativas de oxigênio (EROs), canalizando-as através da longa cadeia de ligações duplas que se encontram em ressonância. A energia é liberada na forma de calor, regenerando a molécula ao seu estado original (SOUTHON, 2003 apud STRINGHETA et al., 2006).

Estudos mostraram que o consumo de luteína é inversamente proporcional ao risco de doenças oculares, como a degeneração macular relacionada à idade (DMRI) (SEDDON et al., 1994). Além disso, alguns estudos indicam que a luteína pode contribuir para redução do risco de aterosclerose (MARES-PERLMAN et al., 2002) e manutenção da saúde da pele, uma vez que reduz danos provocados pela incidência de luz UV (CHEN et al., 2002).

Assim como os carotenóides, a luteína e a zeaxantina são absorvidos no intestino da mesma maneira que os lipídios ingeridos na dieta. Acredita-se que os carotenóides são absorvidos no intestino delgado por processo de difusão passiva (DURING et al., 2005). Os ésteres de ácidos graxos da luteína e zeaxantina são quebrados no lúmen do intestino delgado antes da captação pela mucosa. Os carotenóides são captados pela mucosa do intestino delgado e “empacotados” por triacilglicerol em quilomicrons, os quais serão transportados para o fígado (PARKER, 1996).

Na corrente sanguínea, os carotenos são encontrados primariamente nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL), enquanto que as xantofilas (que contém um ou mais grupos polares) estão distribuídas entre o LDL e as lipoproteínas de alta densidade (HDL) (CLEVIDENCE e IERI, 1993). Os carotenos, sendo lipofílicos são localizados no centro da lipoproteína, enquanto que as xantofilas, sendo mais polares, estão localizadas na superfície das lipoproteínas, e por isso se distribuem de forma equilibrada entre LDL e HDL. (MASSEY, 1984).

Entretanto, a absorção da luteína e da zeaxantina pelo organismo relaciona-se com o conteúdo de lipídios presentes na dieta. Um estudo (ROODENBURG et al.,

2000) concluiu ser necessária quantidade mínima de gordura de 3 g para que ocorra desesterificação dos diésteres de luteína e absorção da luteína.

Outros fatores podem afetar a absorção de luteína, como, por exemplo, a solubilidade. Luteína livre ou esterificada é praticamente insolúvel em sistemas aquosos, e a solubilidade em óleo é limitada. Para facilitar a incorporação da luteína em diferentes tipos de alimentos, a substância pode ser encapsulada ou microencapsulada (AMAR et al., 2003).

O leite materno é a única fonte de luteína e zeaxantina para o bebê. Quando o bebê é alimentado exclusivamente com leite materno, há aumento do conteúdo de luteína e zeaxantina no plasma no primeiro mês de vida, enquanto que a alimentação com fórmulas infantis mostra declínio destes carotenóides no mesmo período (JOHNSON et al., 1995). Um estudo alemão relatou que o colostro apresenta maior teor de luteína e zeaxantina ( $164,0 \pm 84,9$  nmol/L de luteína e  $33,2 \pm 17,2$  nmol/L de zeaxantina), que o leite maduro ( $88,1 \pm 37,8$  nmol/L de luteína e  $19,5 \pm 10,2$  nmol/L de zeaxantina) (SCHWEIGERT et al., 2004). Outro estudo sobre a composição de carotenóides no leite humano em 9 países mostrou que a luteína é um dos carotenóides mais presentes no leite materno, juntamente com o  $\beta$ -caroteno (CANFIELD et al., 2003).

O processamento de alimentos como moagem, fermentação e rápido aquecimento, usualmente melhoram a disponibilidade das xantofilas, provavelmente devido à dissociação dos complexos proteínas-carotenóides e/ou à dissociação dos complexos cristalinos dos carotenóides (DEMIG e ERDMAN, 1999). Fatores como má nutrição e parasitas intestinais são associados à reduzida eficiência de absorção de carotenóides (OLSEN, 1999).

A luteína e a zeaxantina, assim como os carotenóides em geral, ocorrem na configuração *all-trans*, que é mais termodinamicamente estável (VON DOERING et al., 1995). Tem sido demonstrado que a formação de isômeros *cis* é decorrente do processamento de alimentos (SCHIEBER e CARLE, 2005). Calor, luz, presença de sensibilizadores no estado tripleto (como por exemplo, a riboflavina) e de compostos eletrofílicos (por exemplo, quinonas) (DE RIGAL et al., 2000) são fatores que geralmente afetam a isomerização de carotenóides em alimentos.

Esta transformação é associada a alterações nas propriedades biológicas e físico-químicas. Geralmente os isômeros *cis* são termodinamicamente menos estáveis e

apresentam menor ponto de fusão, em relação aos correspondentes *trans*. O espectro UV-visível dos *cis* é caracterizado pelo aparecimento de um novo pico de absorção, ao redor de 330 – 350 nm, e decréscimo da intensidade de cor (BRITTON, 1995b).

Em relação à capacidade de inativar oxigênio singlete, os isômeros *cis* do  $\beta$ -caroteno demonstraram ser menos efetivos que o all-*trans*- $\beta$ -caroteno (STAHL & SIES, 1993). Jimenez e Pick (1993) observaram que o 9-*cis*- $\beta$ -caroteno é degradado mais rapidamente que o isômero all-*trans* correspondente quando exposto às espécies reativas de oxigênio. Um estudo realizado por Stahl e Sies (1993) também indicou que o isômero all-*trans*- $\beta$ -caroteno é absorvido preferencialmente por humanos.

Aman et al. (2005) confirmaram que o processamento térmico aumentou a formação de isômeros *cis* de luteína e zeaxantina de 12 a 30% e de 7 a 25% respectivamente. O processo de conserva de espinafre, entretanto, resultou em decréscimo dos isômeros *cis*, de 21 a 14%. Até o momento, não há estudos sobre a implicação do consumo dos isômeros *cis*, e sobre o destino dos isômeros *cis* das xantofilas durante a digestão a absorção pelo organismo.

## ***2.2.1 Efeitos do processamento e estocagem***

### ***2.2.1.1 Tratamento térmico***

Há dados contraditórios sobre a influência do tratamento térmico na concentração da luteína. Alguns autores relatam aumento da concentração de luteína, enquanto que outros não encontraram alterações durante o aquecimento e estocagem (CALVO, 2005).

Em geral, a maior concentração de luteína em alimentos enlatados em relação aos alimentos *in natura* pode ser devido a: 1) perda de sólidos solúveis no meio; 2) inativação de enzimas que oxidam carotenóides e ou 3) rompimento dos complexos proteína-carotenóide (UPDIKE e SHWART, 2003).

Esses resultados contraditórios podem ser explicados pela extração incompleta dos carotenóides dos cloroplastos de alimentos *in natura*, uma vez que formam complexos com componentes como proteínas. O processo de aquecimento é responsável pela desnaturação protéica e conseqüente aumento da disponibilidade dos carotenóides, facilitando a extração (CALVO, 2005).

### 2.2.1.2 Luz e oxigênio

Os carotenóides quando expostos à luz, originam uma série de reações. Quando a incidência de energia da luz ultrapassa a região de absorção do carotenóide, reações de fotoisomerização competem com as de fotodegradação, enquanto que na presença de sensibilizador e luz (não necessariamente na mesma região de absorção dos carotenóides) ocorrem reações de isomerização e oxidação, geralmente, com a presença de um carotenóide em estado triplete como intermediário (MONTENEGRO et al., 2004). A reação depende da intensidade de luz, comprimento de luz, temperatura, solvente e presença de catalisadores e sensibilizadores no meio (MERCADANTE, 2008).

Perdas de 21 a 23% no conteúdo de  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno e luteína foram observadas durante a estocagem de suco de cenoura sob luz (1500 lux) a 25°C durante 12 semanas. As perdas foram acompanhadas pelo aumento da concentração de isômero 13-*cis* do  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno e luteína durante a estocagem no escuro, enquanto que a formação de 9-*cis*- $\beta$ -caroteno, 9-*cis*- $\alpha$ -caroteno e 13-*cis*-luteína foram favorecidas pela estocagem sob luz (CHEN et al., 1996).

A comparação do efeito da luz nos carotenóides presentes nos alimentos é difícil de ser feita, uma vez que diferentes alimentos possuem composições diferentes quanto aos isômeros. A presença de macromoléculas oferece certa fotoproteção aos carotenóides em alimentos, através da complexação com as proteínas ou agindo como filtro reduzindo a incidência de luz (MERCADANTE, 2008).

A degradação de carotenóides foi estudada em simulação de envelhecimento de vinho do Porto. O vinho do Porto foi saturado com oxigênio, suplementado com luteína e  $\beta$ -caroteno e mantido a 60 °C durante 87 horas. Os resultados mostraram que houve decréscimo de 95% nos níveis de luteína e de 10% nos níveis de  $\beta$ -caroteno, indicando que a luteína foi mais sensível à degradação que o  $\beta$ -caroteno (FERREIRA et al., 2008).

### 2.2.1.3 Outros tratamentos industriais

Condições de estocagem podem influenciar a concentração de luteína. Fatores como luz e temperatura e oxigênio podem influenciar a degradação e reações de isomerização (CALVO, 2005). Shi e Chen (1997) estudaram o efeito de luz e temperatura em luteína pura durante a estocagem. Os autores relataram que a iluminação e a alta temperatura promoveram a degradação da luteína, enquanto que a estocagem em freezer manteve a concentração de luteína praticamente inalterada. A

influência da temperatura também foi estudada por Monreal et al (1999) em feijões verdes, que foram estocados em temperaturas de 12,8 °C e 4 °C, durante 26 dias. Na temperatura de 12,8 °C não houve decréscimo de luteína, enquanto que a 4 °C a luteína diminuiu com o passar do tempo.

Os efeitos da estocagem sob luz foram estudados por Kopas-Lane e Warthesen (1995) que relataram ter havido perda de 25% na concentração de luteína quando espinafre foi armazenado sob luz durante 8 dias. Não foram observadas alterações na concentração de luteína quando o espinafre foi estocado no escuro.

Entretanto, a luz não afeta a concentração da luteína da mesma maneira em todos os vegetais. Kopas-Lane e Warthesen (1995) relataram que não houve influência da luz durante a estocagem de cenouras. A diferença de comportamento da luteína em diferentes vegetais pode ser devida à presença de clorofila, que sensibilizada pela luz induz a produção de espécies reativas de oxigênio.

Em relação à isomerização, Tang e Chen (2000) observaram diminuição da concentração de all-*trans*-luteína e aumento de 13-*cis* e 9-*cis* luteína durante estocagem em temperaturas entre 4 e 45 °C durante 12 semanas de cenoura liofilizada.

Durante o processo de fermentação utilizado em alguns alimentos ocorre diminuição do pH, o que não afetou a concentração de luteína (MINGUEZ-MOSQUERA e GALLARDO-GUERRERO, 1995). O processo de extrusão também afeta as concentrações de luteína. Ervilhas verdes submetidas à extrusão em temperaturas de 90, 100 e 120 °C sofreram redução nas concentrações de luteína (GRELA et al., 1999).

Em suma, os principais fatores que afetam a estabilidade da luteína são a luz e o oxigênio. O tratamento térmico apresenta importância nos produtos *in natura*, onde após a aplicação de temperatura elevada, a luteína fica mais disponível.

### ***2.2.2 Luteína e produtos lácteos***

Até o momento, poucos estudos sobre a adição de luteína em produtos lácteos foram encontrados. Jones et al. (2005) estudaram a estabilidade da luteína durante a maturação de queijo Cheddar. As amostras tinham diferentes concentrações de luteína: 1, 3 e 6 mg / 28 g (porção de queijo), foram acondicionadas em embalagens a vácuo e maturadas durante 24 dias a 4,5°C, na ausência de luz. Foram analisados a cor, o pH, a contagem microbiana, as características sensoriais e a estabilidade durante o processo de

maturação. Os atributos de cor  $a^*$  e  $b^*$  diferiram significativamente entre as amostras adicionadas de luteína e o controle, o que não foi observado para o atributo  $L^*$  e para pH. Em relação às características sensoriais, os provadores relataram que os queijos adicionados de luteína apresentaram um sabor amargo, mas não diferiram quanto à textura e aparência. A quantificação de luteína durante o período de estocagem mostrou que não houve degradação de luteína.

Aryana et al. (2006) verificaram a estabilidade da luteína adicionada em iogurte de morango. Foram adicionadas concentrações de 0,5; 1,5; e 3,0 mg por 170 g de iogurte, e os parâmetros analisados foram pH, sinérese, viscosidade, cor, contagem microbiana, características sensoriais, e quantificação da luteína durante 5 semanas a 5°C. Os resultados mostraram que a luteína não afetou os parâmetros anteriormente descritos. Entretanto houve diminuição de aproximadamente 10% da concentração de luteína durante o período de estocagem refrigerada. Essa diminuição da luteína foi mais acentuada principalmente na quinta semana

Em um estudo realizado com cream cheese, Tokusoglu (2008) adicionou 0,5; 0,75; 1,5 e 3,0 mg de luteína para cada porção de 170g. De forma semelhante aos trabalhos citados acima, os parâmetros analisados durante 6 semanas de estocagem refrigerada foram estabilidade da luteína, pH, sinérese, cor, viscosidade, contagem microbiana e características sensoriais. Os resultados mostraram que as amostras adicionadas da maior quantidade de luteína apresentaram diferença significativa em relação ao parâmetro de cor  $a^*$ . O conteúdo de luteína se apresentou inalterado durante o período estudado.

A partir dos estudos citados acima, é possível afirmar que até o momento não há pesquisas que avaliam a interação entre a luteína e a foto-oxidação que ocorre em produtos lácteos durante estocagem refrigerada na presença de luz ou em condições similares às encontradas no supermercado em decorrência da ação da riboflavina sensibilizada pela luz.

### **2.2.3 Benefícios à saúde**

#### **2.2.3.1 Degeneração macular relacionada à idade (DMRI)**

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é a degradação da porção central da retina, incluindo a mácula (NEWCOMB et al., 1992) e é a maior causa de cegueira irreversível em idosos (KRINSKY et al., 2003). Estima-se que 1 milhão e

seiscentos mil americanos apresentam esta doença e devido ao aumento da expectativa de vida da população, este número possa dobrar nos próximos anos (FINE et al., 2000). De acordo com o Conselho Brasileiro de Oftalmologia, aproximadamente 10% da população brasileira entre 65 e 74 anos e 25% acima de 75 anos sofrem com a degeneração macular. Os principais fatores relacionados à incidência de DMRI são: pele clara e olhos claros; exposição excessiva à luz solar; tabagismo e dieta rica em gorduras (CBO, 2010).

A “mácula lútea” é a área da retina de máxima acuidade visual. A luteína e a zeaxantina são pigmentos responsáveis pela coloração deste tecido (KHACHIK et al., 2002). Estes compostos também estão presentes em parte da retina, mas a concentração na mácula é consideravelmente maior (LANDRUM et al., 1999).

Acredita-se que a luteína e a zeaxantina protegem os olhos de duas maneiras. Uma hipótese é que o a luteína e a zeaxantina filtram e absorvem a luz azul, que é danosa aos fotoreceptores e ao epitélio da retina (HAM et al., 1984). A segunda hipótese é que esses carotenóides atuam como antioxidantes limitando o estresse oxidativo do tecido, resultante do metabolismo e da ação da luz (KHACHIK et al., 1997). Um dos danos causados a retina pela ação da luz é a geração de radicais livres, que levam a oxidação dos lipídios presentes nas membranas (HAM et al., 1984). O aparecimento de produtos da oxidação da luteína e da zeaxantina junto à retina sugere que estes componentes possuem função antioxidante (KHACHIK et al. 1997).

Muitos estudos mostram evidências que os pigmentos maculares atenuam o dano causado pela luz na retina humana (HAEGERSTROM-PORTNOY, 1988).

Estudos, realizados em humanos, sugerem que a ingestão diária de luteína e zeaxantina pode levar ao acúmulo destes carotenóides na retina, promovendo proteção contra a degeneração macular. Em um estudo prospectivo (HAMMOND et al., 1997), onze pessoas adicionaram na dieta 60 g/dia de espinafre (o equivalente a 11 mg de luteína e 0,3 mg de zeaxantina) durante 15 semanas. Oito pessoas apresentaram aumento no teor de luteína no plasma e na mácula, duas pessoas apresentaram aumento de luteína somente no plasma e uma pessoa não apresentou alterações no teor de luteína no plasma e na mácula. O estudo concluiu que, em geral, a modificação da dieta resultou no aumento da concentração da luteína e zeaxantina na mácula. Em um estudo semelhante, Landrum et al. (1997) relataram que a suplementação de 30 mg luteína /dia

durante 140 dias resultou em crescimento dos níveis de luteína no plasma e na mácula do olho humano.

Outros estudos também evidenciaram que a proteção contra a DMRI pode ser obtida pela ingestão de luteína. Seddon et al., (1994), relataram que a proteção de DMRI estava associada com a ingestão de carotenóides específicos. Neste estudo os voluntários que ingeriram maior quantidade de carotenóides tiveram diminuição de 43% no risco de desenvolver DMRI. Os autores então investigaram quais carotenóides foram responsáveis por este efeito e encontraram forte associação entre a ingestão de luteína e zeaxantina e a proteção contra DMRI. O grupo que consumiu maior quantidade de luteína e zeaxantina (6 mg ao dia) apresentou diminuição de 57% no risco de desenvolver DMRI. Ainda em outro estudo, foi relatado que pacientes que sofriam de DMRI foram suplementados com 10 mg de luteína por dia, o que resultou em efeitos positivos na visão incluindo maior sensibilidade ao contraste e acuidade visual (RICHER et al., 2004).

Entretanto, um estudo com 8222 pessoas acima de 40 anos não verificou relação entre luteína/zeaxantina e prevalência de DMRI. Neste estudo, altos níveis de luteína e zeaxantina foram relacionados com reduzidas anormalidade do epitélio pigmentar da retina (EPR), que são sinais da DMRI, e concluíram que as relações entre estes carotenóides e a DMRI podem ser influenciadas pela idade e etnia, e requer avaliações separadas em estudos prospectivos (MARES-PERLMAN et al., 2001).

Os benefícios da luteína e zeaxantina, bem como a dose necessária para prevenção da degeneração macular permanecem incertos. A *Food and Drug Administration* (FDA) conduziu uma revisão de estudos sobre as evidências científicas do papel da luteína e zeaxantina na degeneração macular e catarata, e concluiu que há necessidade de mais estudos e de maior comprovação dessas evidências (TRUMBO e ELLWOOD, 2006). Da mesma forma, a legislação brasileira não considera que o consumo de luteína esteja relacionado com a diminuição e prevenção de DMRI ou outras doenças. Apenas considera que: “a luteína tem ação antioxidante e protege as células contra os radicais livres” (ANVISA, 2008).

#### 2.2.3.2 Catarata

Atualmente, a catarata é uma das principais causas de cegueira reversível no mundo e acomete 75% das pessoas com idade acima de 70 anos. Cerca de 350 mil

brasileiros são operados todos os anos em decorrência da doença (CBO, 2010). A catarata é caracterizada pela presença de opacidade parcial ou completa em um ou ambos os olhos causada pela precipitação de proteínas que sofreram foto-oxidação resultando em dificuldades de visão ou cegueira (BRON et al., 2000). A luteína e a zeaxantina são os dois únicos carotenóides identificados nas lentes do cristalino humano (YEUM et al., 1995). Embora a concentração destes carotenóides seja menor nas lentes do que na mácula, acredita-se que exerçam papel similar (MARES-PERLMAN et al., 2002).

A relação entre luteína/zeaxantina e o risco de catarata foi estudada por Chasan-Taber et al. (1999). Mulheres que ingeriram altas quantidades de luteína e zeaxantina apresentaram redução de 22% no risco de catarata. Mares-Perlman et al. (1995) observaram que a ingestão de aproximadamente 0,95 mg por dia de luteína reduziu em 27% a prevalência de catarata. Hankinson et al. (1992) reportou que pacientes submetidos à cirurgia de cataratas apresentavam baixa ingestão de alimentos ricos em luteína.

Um estudo duplo-cego envolvendo suplementação com luteína (15 mg/dia, 3 vezes por semana durante 2 anos),  $\alpha$ -tocoferol (100 mg/dia, 3 vezes por semana durante dois anos) e placebo em pacientes com catarata mostrou que a performance visual (acuidade visual e sensibilidade à luz) melhorou no grupo suplementado somente com luteína (OLMEDILLA et al., 2003).

#### 2.2.3.3 Saúde da pele

A exposição da pele às numerosas agressões ambientais pode levar ao envelhecimento precoce. Destes agentes, nenhum é mais comum que os raios ultravioletas provenientes da luz solar. A defesa primária imediata contra o dano da pele é a capacidade antioxidante da mesma. Entretanto, esse sistema de defesa pode ser comprometido pela exposição moderada à luz UV (PALOMBO et al., 2007). A luz UV abrange três faixas de comprimento de onda: UVC (200 a 280 nm), absorvido pela camada de ozônio, UVB (280 a 320 nm) e UVA (320 a 400 nm) os quais causam danos à pele (PEAK e PEAK, 1993 apud SENDER et al, 2004).

Um estudo clínico avaliou a eficácia da luteína e zeaxantina, sob cinco parâmetros fisiológicos da pele (lipídios da superfície, hidratação, atividade fotoprotetora, elasticidade da pele e peroxidação lipídica da pele) de humanos. Os

carotenóides foram administrados oralmente, topicamente ou em combinação (oral e tópico). Os resultados obtidos indicam que a administração da combinação oral e tópica provê maior grau de proteção antioxidante (PALOMBO et al., 2007). Estudos também mostraram que a ingestão oral de uma mistura de antioxidantes contendo 6 mg de luteína e 0,3 mg de zeaxantina por dia induz um aumento dos lipídios da superfície da pele e hidratação, enquanto que simultaneamente, reduz a quantidade de lipídios oxidados pela exposição à luz UV (MORGANTI et al., 2002 apud PALOMBO et al., 2007).

#### 2.2.3.4 Prevenção de câncer e doenças cardiovasculares

Agentes capazes de reagir e modificar quimicamente o DNA são conhecidos como carcinogênicos potenciais. Assim qualquer substância que proteja o DNA ou aumenta a atividade de reparo em caso de danos, possui benefícios à saúde (CALVO, 2005).

Estudos conduzidos por Michaud et al. (2000) mostraram que dietas ricas em carotenóides, provenientes de frutas e vegetais, pode reduzir o risco de câncer de pulmão. Dorgan et al (1998) relatou que os carotenóides  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina podem proteger contra câncer no seio.

A atividade antioxidante da luteína pode aumentar a resistência à oxidação do LDL, contribuindo na prevenção de algumas doenças cardiovasculares (CALVO, 2005). O possível efeito da luteína proveniente da dieta na prevenção de aterosclerose foi relatado por Dwyer et al. (2000) em modelos epidemiológicos, *in vitro* e *in vivo*.

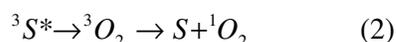
#### **2.2.4 Atividade antioxidante**

Espécies reativas de oxigênio são geradas durante o metabolismo aeróbico e processos patológicos, danificando moléculas biologicamente importantes como lipídios, DNA ou proteínas, estando envolvidas na bioquímica de doenças degenerativas (SIES, 1997). A luteína e a zeaxantina são efetivos desativadores de moléculas excitadas eletronicamente (sensitizadores –  $S^*$ ), que estão envolvidas na geração de radicais livres e de oxigênio singlete ( $^1O_2$ ). Desta forma, a estratégia de defesa da luteína contra as reações de foto-oxidação baseia-se em mecanismos de desativação dos sensitizadores excitados eletronicamente, de transferência de energia onde o  $^1O_2$  retorna ao estado fundamental, e como filtro a luz azul (YOUNG e LOWE 2001).

O  $^1O_2$  é o estado excitado da forma fundamental de oxigênio (oxigênio triplete). O oxigênio singlete pode ser gerado quando um sensibilizador é excitado (por ação da luz, por exemplo) ao seu primeiro estado excitado e em seguida, passa ao estado triplete, de acordo com a equação (1) (STAHL e SIES, 1993):



Em sistemas biológicos, sensibilizadores incluem porfirinas, clorofilas, bilirrubina e riboflavina (STAHL e SIES, 1993). O estado triplete do sensibilizador pode iniciar as reações de foto-oxidação do tipo I e II. A reação do tipo I envolve a abstração de elétron ou hidrogênio, resultando na produção de espécies radicais, enquanto que na reação tipo II, o sensibilizador triplete transfere elétrons diretamente com o oxigênio estável para formar o  $^1O_2$  (BRADLEY e MIN, 1992):



A inativação do oxigênio singlete ocorre por via física ou química. A via física envolve transferência de energia do  $^1O_2$  para o carotenóide, resultando em oxigênio fundamental e carotenóide em estado excitado triplete ( $^3Car^*$ ). A energia é dissipada entre o carotenóide excitado e o solvente envolvente produzindo carotenóide estável no estado fundamental e energia térmica. Neste processo, o carotenóide fica intacto, e pode participar repetidamente da inativação de oxigênio singlete. Ao contrário do processo físico, a via química é pouco importante para carotenóides, contribuindo com menos de 0,05% da inativação do oxigênio singlete, entretanto, resulta em produtos de oxidação (STAHL e SIES, 2003).

Os carotenóides também seqüestram, de forma eficiente, radicais peróxido, especialmente à baixa pressão de oxigênio, contribuindo para defesa contra oxidação lipídica (BURTON e INGOLD, 1985).

A atividade antioxidante depende da concentração de oxigênio, estrutura química dos carotenóides, e presença de outros antioxidantes (KRINSKY, 1993). Na maioria das frutas, vegetais e flores, os carotenóides oxigenados estão presentes na forma esterificada com ácidos graxos. Subagio e Morita (2001) avaliaram a atividade antioxidante de luteína e ésteres de luteína e concluíram que a esterificação dos grupos

OH com ácidos graxos não afetou a atividade antioxidante da luteína. Além disso, outro estudo relatou que a esterificação da luteína, promoveu estabilidade contra calor e luz UV (SUBAGIO et al., 1999).

### 3. Iogurte

O iogurte é definido como produto resultante da fermentação do leite viabilizada pela cultura inicial mista composta por *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* e do *Lactobacillus delbruechii* subsp *bulgaricus*. Caracteriza-se por ser um gel viscoso e por apresentar sabor característico (TAMIME e DEETH, 1980). Além disso, o iogurte tem composição similar ao do leite com o qual foi elaborado constituindo-se em fonte de proteínas, cálcio, fósforo, magnésio, zinco e de vitaminas B<sub>2</sub> e B<sub>12</sub>.

O sabor característico do iogurte é resultante da ação simbiótica das culturas lácteas, as quais levam à produção de ácido láctico, acetaldeído, diacetil, ácido acético dentre outras substâncias voláteis. O *Streptococcus thermophilus* promove o crescimento do *Lactobacillus bulgaricus*, o qual remove o oxigênio e promove liberação de substâncias estimulantes para o *Streptococcus*, como glicina e histidina provenientes da degradação das proteínas do leite (TAMIME e ROBINSON, 1999).

O processo bioquímico que promove acidez no iogurte é associado ao desenvolvimento de aroma e sabor. O pH usual para o iogurte é de 4,2 a 4,4. Os componentes característicos do sabor do iogurte incluem acetaldeído, acetona, acetoína e diacetil (TAMIME e ROBINSON, 1999).

Os produtos lácteos são sensíveis à foto-oxidação devido à presença de riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>) que é forte sensibilizador e é capaz de absorver luz e emitir fluorescência (emissão máxima em aproximadamente 525 nm), e transferir essa energia para formar espécies altamente reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete e radicais livres. Isso pode induzir uma cascata de reações de oxidação, levando ao final, a perdas significativas de nutrientes valiosos, como as vitaminas e aminoácidos; à oxidação lipídica, à descoloração, assim como à formação de off-flavors (BORLE et al., 2001).

A riboflavina é essencial ao crescimento e desenvolvimento do organismo, produção e controle de determinador hormônios, e formação de células vermelhas do sangue (AJAYI et al., 1993). A riboflavina ocupa importante posição no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas e é crucial para a produção de energia no sistema de transporte de elétrons. Também é necessária para a manutenção da boa visão, pele,

cabelo e unhas. A deficiência geralmente se manifesta na pele e em mucosas, particularmente por lesões nos lábios (KIRSCHMANN, 1996). A riboflavina é relativamente estável ao tratamento térmico, mas bastante sensível à ação da luz (LASSEN et al., 2002).

#### **4. Mecanismo de Foto-oxidação**

A luz tem efeito direto nas moléculas que a absorvem. Estas moléculas são primeiramente excitadas e em seguida promovem reações fotoquímicas, que podem ser diretas (isomerização, rearranjos, dissociação) ou indiretas (transferência de energia para outras moléculas, particularmente o oxigênio). Nos alimentos, a maioria das frações lipídicas, protéicas e açúcares não absorvem luz na região visível do espectro, mas são sensíveis a formas excitadas de oxigênio. Algumas moléculas que absorvem luz, como a riboflavina no leite, atuam como fotossensibilizadoras pela transferência de energia absorvida da luz para formas altamente reativas de oxigênio (SKIBSTED, 2000).

O espectro de emissão de luz solar abrange a faixa de radiação de comprimento de onda variando entre 300 e 800 nm. Dentro desta faixa, a luz visível abrange comprimentos de onda de 380 a 780 nm e a luz ultravioleta, de maior energia, apresenta comprimentos de onda de 200 a 380 nm, sendo classificado como UV-B de 280 a 315 nm, e UV-A de 315 a 380 nm. A luz visível com comprimentos de onda entre 420 e 520 nm é a maior causadora de problemas de degradação em produtos lácteos (ALVES e JAIME, 2006).

A riboflavina possui três faixas características de absorção de luz. A primeira (ao redor de 250 nm) não é crítica para a deterioração do produto, uma vez que é pequena a emissão de luz solar ou fluorescente abaixo de 300 nm. A segunda faixa de absorção (em torno de 380 nm) pode ou não interferir dependendo da absorção pelo material de embalagem. A terceira faixa de absorção é considerada a mais crítica, uma vez que se encontra na região de luz visível emitida também por luz fluorescente presente em grande parte dos estabelecimentos comerciais, e que favorece a ocorrência de reações de foto-oxidação (ao redor de 450 nm), a qual favorece degradação (ALVES e JAIME, 2006).

Agindo como fotossensibilizadora, a riboflavina absorve energia proveniente da luz e transfere a outras moléculas, como o oxigênio dissolvido no leite. Como um

receptor de energia, o oxigênio que inicialmente está em estado estável (estado triplete) é excitado e convertido ao oxigênio singlete, altamente reativo (reação fotoquímica tipo II). A riboflavina pode ser transformada em sua forma reduzida pela oxidação de substrato e pode reagir com oxigênio triplete para formar radicais livres (reação tipo I) (Figura 2). O caráter eletrofílico do oxigênio singlete explica as reações de adição com todas as espécies químicas caracterizadas por duplas ligações, como por exemplo, lipídios insaturados, riboflavina (TOYOSAKI e HAYASHI, 1993), vitamina D (LI e MIN, 1998), tiamina, ácido ascórbico, glicose (SILVA et al., 1999), ácido fólico, assim como componentes sulfurados como a metionina. A foto-oxidação do ácido ascórbico por meio da sensibilização da riboflavina pode ser afetada por alguns aminoácidos (JUNG et al., 1998), particularmente o triptofano (SILVA, 1992) e tirosina (SILVA e GODOY, 1994). Geralmente, a reação do oxigênio singlete com proteínas sulfuradas e aminoácidos é capaz de produzir componentes sulfurados voláteis como o dimetilsulfeto. Este composto é considerado o agente responsável pelo *off-flavor* característico do leite exposto à luz (JUNG et al., 1998).

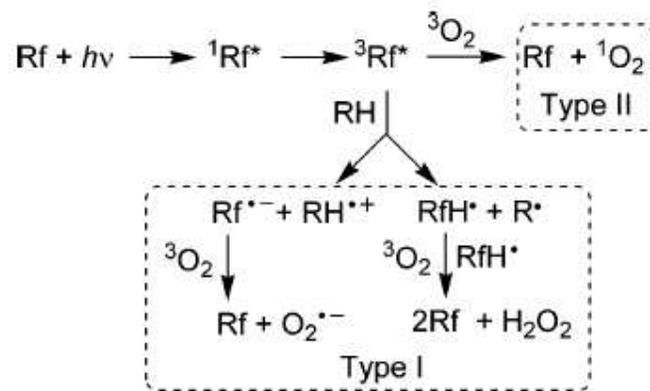


Figura 2. Representação esquemática das espécies reativas formadas a partir da sensibilização da riboflavina (MONTENEGRO et al., 2007).

Sabe-se que os carotenóides atuam de forma eficiente como antioxidantes, e que estão presentes no leite em quantias que variam de acordo com a dieta do animal. Cardoso et al, (2007) estudaram o mecanismo de desativação da riboflavina excitada por ascorbato, carotenóides e tocoferóis em sistemas modelo. Os resultados mostraram que o  $\beta$ -caroteno, o licopeno e a crocina não inativaram o estado excitado da

riboflavina. Entretanto, os carotenóides diminuíram a formação da riboflavina no estado triplete por atuarem como filtro à luz azul.

#### ***4.1 Avaliação do foto-oxidação em produtos lácteos***

Durante o período de permanência nos supermercados, os produtos lácteos geralmente ficam expostos à ação de luz, o que pode afetar a qualidade destes produtos, especialmente quando acondicionados em embalagens transparentes. Ainda há poucos métodos eficientes e confiáveis disponíveis para a avaliação de oxidação induzida por luz nestes produtos. Kristensen et al. (2000) sugerem que um dos possíveis indicadores de foto-oxidação é dada pela redução da RBF como resultado da foto-degradação.

A RBF é altamente fluorescente (com emissão máxima ao redor de 525 nm) assim como os produtos gerados em sua foto-degradação, lumicromo e lumiflavina, os quais apresentam emissão máxima na região de 444 a 479 nm e 516 a 522 nm respectivamente (FOX e THAYER, 1998).

Em vista da capacidade da RBF emitir fluorescência, uma das maneiras de avaliar a ocorrência de foto-oxidação em produtos lácteos é tradicionalmente descrita pelo método padrão da AOAC (2006). Este é um método fluorimétrico de determinação de RBF genérico para todos os tipos alimentos e envolve diversas etapas de extração com solventes orgânicos, processo de autoclavagem e purificação das amostras antes das medidas fluorimétricas, tornando o método trabalhoso e dispendioso. A espectroscopia de fluorescência é um método rápido, não destrutivo, com alta sensibilidade e especificidade, cada vez mais utilizado para análise em alimentos e que aparece como alternativa prática e rápida para avaliar os efeitos da foto-oxidação em produtos lácteos (ANDERSEN et al. 2005, BECKER et al., 2003; WOLD et al., 2006). Wold e colaboradores (2002) utilizaram a técnica de *front-face* para avaliar a foto-oxidação em vários produtos lácteos. Este método também tem sido aplicado em alguns estudos para verificar alterações estruturais nas proteínas do leite durante tratamento térmico (DUFOUR e RIAUBLANC, 1997) e maturação de queijos (KAROUI et al., 2003, 2006).

Zandomeneghi et al. (2007) propôs um método bioquímico e fluorimétrico para determinação de RBF em leite, em que associa o uso da técnica de *front-face* com a capacidade da apo-proteína ligante de RBF (RBPO) proveniente da albumina do ovo de se ligar à RBF diminuindo assim, a intensidade de fluorescência emitida. A diminuição

da fluorescência é atribuída à sobreposição do anel isoaloxazina da RBF com Trp 156 e Tyr 75 dos anéis aromáticos da RBP, estrategicamente presente no sítio com mais quatro triptofanos adicionais. O uso de *front-face* é devido à opacidade da amostra que não permite o uso da técnica de ângulo reto. Os autores titularam a RBF presente no leite pela adição gradual de solução de RBPO na amostra de leite. A cada adição eram realizadas medidas de fluorescência e desta forma foi possível quantificar a RBF. Este método foi otimizado e validado para a determinação de RBF em iogurte, de acordo com as recomendações da IUPAC (THOMPSON, 1999, 2002) e do ICH (1996) por Domingos et al. (2010) (Resultados ainda não publicados).

#### ***4.2 Fatores que influenciam a fotossensitividade de produtos lácteos***

Várias condições devem ser cumpridas para proteger os alimentos suficientemente contra a foto-oxidação. Dentre elas, as condições de estocagem, o espectro de emissão da fonte de luz utilizada, o espectro de transmissão, assim como a permeabilidade ao oxigênio da embalagem (BORLE et al., 2001).

A luz fluorescente é comumente utilizada em supermercados para expor produtos lácteos e seu espectro provê boas condições para absorção de luz pela riboflavina (VITERI et al., 2003). A distribuição das formas reativas de oxigênio formadas pela sensitização da riboflavina depende da disponibilidade de oxigênio, da concentração de riboflavina e outras substâncias oxidantes ou inativadoras (CHOE et al., 2005).

A embalagem pode prevenir diretamente o desenvolvimento de *off-flavor*, protegendo o conteúdo contra a ação de luz e oxigênio (VASSILA et al, 2002). As embalagens plásticas têm sido utilizadas no lugar de garrafas de vidro e cartonadas (DEFOSSE, 2000). Os problemas com todos os tipos de embalagens plásticas incluem transmissão de luz e permeabilidade ao oxigênio (RYSSTAD et al., 1998). Garrafas de PET e PEAD coextrusado tem sido utilizadas como embalagem para leite pasteurizado. O PET tem excelentes propriedades mecânicas, é boa barreira ao oxigênio e reduz os efeitos adversos da luz. As embalagens de PEAD monocamada e multicamadas apresentam maior espessura que as garrafas PET, e são bastantes práticas (CLADMAN et al., 1998).

A influência de embalagens de polipropileno (PP) ou poliestireno (PS) nas características sensoriais de iogurte aromatizado batido com 0% ou 4% de gordura foi

estudada durante estocagem a 4 °C durante 28 dias. Durante o estocagem, o iogurte com 0% de gordura acondicionado em embalagem de vidro (controle) apresentou baixo decréscimo de aroma característico, em relação aos iogurtes acondicionados em PP e PS. Entretanto, a embalagem de PS apresentou menor perda de aroma, em relação à de PP (SAINT-EVE et al., 2008).

Leite UHT armazenado em embalagens de polietileno a 6 °C sob luz de 36 W apresentou oxidação após 4 semanas, enquanto que no leite acondicionado em embalagem cartonada, a oxidação ocorreu após 8 semanas; e o leite em embalagem cartonada com folha de alumínio não foi oxidado (RYSSTAD et al., 1998). Análises de componentes voláteis encontrados no *headspace* de leite exposto a luz fluorescente após 12, 24 e 48 horas mostraram aumento na concentração de metional, hexanal, pentanal e dimetilsulfeto, o que está diretamente relacionado com a quantia de oxigênio disponível e exposição à luz (KIM e MORR, 1996). Creme acondicionado em copos de polipropileno ou poliestireno com tampa de alumínio ou polipropileno armazenado sob 950 lux, durante 3 semanas, não obteve aceitação sensorial após 3 a 6 dias (SPENGLER, 1997 apud BORLE et al., 2001).

O polipropileno é uma poliolefina obtida pela isomerização do propileno. É um polímero linear com praticamente nenhuma insaturação. O polipropileno apresenta densidade específica na ordem de 0,9 g/cm<sup>3</sup>, boa barreira ao vapor d'água, baixa barreira aos gases (inferior a do polietileno), boa resistência aos óleos e gorduras, boa estabilidade térmica e não é suscetível ao fissuramento sob tensão. Desta forma, as propriedades que determinam a aplicação do PP em embalagens flexíveis são transparência, rigidez, resistência aos óleos e gorduras e baixa permeabilidade ao vapor de água (SARANTÓPOULOS, 2002).

## 5. CONCLUSÃO

Os seres humanos não sintetizam luteína e para isso se faz necessário uma dieta balanceada com alimentos ricos neste composto. Produtos lácteos adicionados de luteína seriam uma opção saudável para complementar o consumo de alimentos fonte deste carotenóide (como couve, rúcula, brócolis, dentre outros). Entretanto, os produtos lácteos são sensíveis à ação da luz devido à presença da riboflavina. Desta forma, é importante avaliar a fotoxidação de produtos lácteos enriquecidos com luteína e o papel protetor da embalagem frente à ação da luz e oxigênio.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos / ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em 01 jun, 2010.

AJAYI, O. A.; GEORGE, B. O.; IPADEOLA, T. Clinical trial of riboflavin in sickle cell disease. **East African Medical Journal**. v. 70 (7), p.418 – 421, 1993.

ALVES, R., JAIME, S. B. M. Embalagem para requeijão cremoso e outros tipos de requeijão. In: Van Dender, F. G. A. **Requeijão cremoso e outros queijos fudidos: tecnologia de fabricação, controle de processo e aspectos de mercado**. São Paulo, Brasil, 2006.

AMAN, R.; BIEHL, J.; CARLE, R.; CONRAD, J.; BEIFUSS, U.; SCHIEBER, A. Application of HPLC coupled with DAD, Apcl-MS and NMR to the analysis of lutein and zeaxanthin stereoisomers in thermally processed vegetables. **Food Chemistry**. v. 92, p. 753– 763, 2005.

ALVES-RODRIGUES, A., SHAO, A. The science behind lutein. **Toxicology Letters**. v. 150, p. 57 – 83, 2004.

AMAR, I., ASERIN, A., AND GARTI, N. Solubilization patterns of lutein and lutein esters in food grade nonionic microemulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 4775–4781, 2003.

ANDERSEN, C. M., VISHART, M., HOLM, V. K. Application of fluorescence spectroscopy in the evaluation of light-induced oxidation in cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 9985 – 9992, 2005.

AOAC. **Official Methods of Analysis** 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, 2006.

ARYANA, K. J.; BARNES, H. T.; EMMICK, T. K.; MCGREW, P.; MOSER, B. Lutein is stable in strawberry yogurt and does not affect its characteristics. **Journal of Food Science**. v. 71(6), p. S467 – S472, 2006.

BECKER, E. M., CHRISTENSEN, J., FREDERIKSEN, C. S., HAUGAARD, V. K. Front-face fluorescence spectroscopy and chemometrics in analysis of yogurt: Rapid analysis of riboflavin. **Journal of Dairy Science**. v. 86, p. 2508 – 2515, 2003.

BORLE F.; SIEBER, R.; BOSSET, J. O. Photo-oxidation and photoprotection of foods, with particular reference to dairy products: An update, of a review article (1993-2000). **Sciences des Aliments**. v. 21, p. 571-590, 2001.

BRADLEY, D. G.; MIN, D. B. Singlet oxygen oxidation of foods. **Critical Review of Food Science and Nutrition**. v. 31, p. 211 – 236, 1992.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB Journal**. v. 9, p. 1551 – 1558, 1995a.

BRITTON, G. UV/visible spectroscopy. In. G. Britton, Liaaen, Jensen, H. Pfander. **Carotenoids Spectroscopy**. v. 1B, p. 13 – 62. Besel, Boston, Berlin, 1995b.

BRITTON, G. **The Carotenoids Page**. 2006. Disponível em:  
<<http://dcbcarot.unibe.ch/occur.htm>>. Acesso em: 26 jul. 2010

BRON, A. L.; VRENSSEN, G. F.; KORETZ, J.; MARIANI, G.; HARDING, J. J. The ageing lens. **Ophthalmologica**. v. 214, p. 86 – 104, 2000.

BURTON, G. W.; INGOLD, K. U.  $\beta$ -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. **Science**. v. 224, p. 569 – 573, 1985.

CALVO, M. M., Lutein: A valuable ingredient of fruit and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. p. 871 – 696, 2005.

CANFIELD, L.M.; CLANDININ, M. T.; DAVIES, D. P.; FERNANDEZ, M. C.; JACKSON, J. HAWKES, J. *et al.* Multinational study of major breast milk carotenoids of healthy mothers. **European Journal of Nutrition**. v. 42, p. 133 – 141, 2003.

CARDOSO, D. R.; OLSEN, K.; SKIBSTED, L. H. Mechanism of deactivation of triplet-excited riboflavin by ascorbate, carotenoids and tocopherols in homogeneous and heterogeneous aqueous food model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, p. 6285 – 6291, 2007.

CARVALHO, L.S. **Distribuição qualitativa e quantitativa de carotenóides e seus metabólitos em tecidos oculares**. 2000. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

CHASAN-TABER, L.; WILLETT, W. C.; SEDDON, J. M.; STAMPFER, M. J.; ROSNER, B.; COLDITZ, G. A.; SPEIZER, F. E.; HANKINSON, S. E. A prospective study of carotenoid and Vitamin A intakes and risk of cataract extraction in US women. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 70, p. 509 – 518, 1999.

CHEN, B.H., PENG, H.Y., CHEN, H.E. Stability of carotenoids and vitamin A during storage of carrot juice. **Food Chemistry**. v. 57, p. 497, 1996.

CHEN, J.; WU, A.; PATHAK, M. A.; RIUS-DIAZ, F.; MIHM, C. M. GOUKSSIAN, D.; GONZALEZ, S. Dietary lutein and zeaxanthin partially prevent UVB-induced skin

carcinogenesis in the SKh-1 hairless mouse model (Abstract). In: **Society for Investigative Dermatology**, Los Angeles, CA, 2002.

CHOE, E.; HUANG, R.; MIN, D. B. Chemical reactions and stability of riboflavin in foods. **Journal of Food Science**. v. 70 (1), p. R28 – R36, 2005.

CLADMAN, W.; SCHEFFER, S.; GOODRICH, N.; GRIFFITHS, M. W. Shelf-life of milk packaged in plastic containers with and without treatment to reduce light transmission. **International Dairy Journal**. v. 8, p. 629-636, 1998

CLEVIDENCE, B.A., BIERI, J.G. Association of carotenoids with human plasma lipoproteins. **Methods in Enzymology**. v. 214, p. 33–46, 1993.

CONSELHO BRASILEIRO DE OFTALMOLOGIA. 2010. Degeneração macular relacionada a idade (DMRI). <[http://www.cbo.com.br/site/index.php?mostra=7demaio\\_dmri](http://www.cbo.com.br/site/index.php?mostra=7demaio_dmri)>. Acesso em: 28 jun. 2010.

DE RIGAL, D.; GAUILLARD, F.; RICHARD-FORGET, F. Changes in the carotenoid content of apricot (*Prunus armeniaca* var Bergeron) during enzymatic browning:  $\beta$ -carotene inhibition of chlorogenic acid degradation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 80, p. 763 - 768, 2000.

DEFOSSE, M. Novel milk bottle designs keep blow molders on top. **Modern Plastic International**. v.10 (7), p. 114-116, 2000.

DEMIG, D. M.; ERDMAN, J. W. Jr. Mammalian carotenoid adsorption and metabolism. **Pure Applied Chemistry**. v. 71, p. 2213 – 2223, 1999.

DORGAN, J. F.; SOWELL, A.; SWANSON, C. A.; POTISCHMAN, N.; MILLER, R.; SCHUSSLER, N.; STEPHENSON Jr, H. E. Relationships of serum carotenoids, retinol,  $\alpha$ -tocopherol and selenium with breast cancer risk: results from a prospective study in Columbia, Missouri (United States). **Cancer Causes and Control**. v. 19 (1), p. 89 – 87, 1998.

DUFOUR, E.; RIAUBLANC, A. Potentiality of spectroscopic methods for the characterization of dairy products. I. Front-face fluorescence study of raw, heated and homogenized milks. v. 77, p. 657 – 670, 1997.

DURING, A., DAWSON, H.D., HARRISON, E.H. Carotenoid transport is decreased and expression of the lipid transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 is downregulated in Caco-2 cells treated with ezetimibe. **Journal of Nutrition**.v. 135, p. 2305–2312, 2005.

DWYER, J. H.; NAVAB, M.; DWYER, K. M.; HASSAN, K.; SUN, P.; SHIRCORE, A.; HAMA-LEVY, S.; HOUGH, G.; WANG, X.; DRAKE, T.; MERZ, C. N. B.; FOGELMAN, A. M. Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis. **Circulation**. v. 103, p. 2922 – 2927, 2000.

ELBE, J. H. VON, SCHWARTZ, S. J. Colorantes. *In*: FENNEMA, O. R., **Food Chemistry**. 3ed., p 673 – 681, 1996, 1069p.

FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Consumidor brasileiro busca alimentos práticos e rápidos, aponta pesquisa da Fiesp e Ibope, 2010**. Disponível em: <[http://www.fiesp.com.br/agencianoticias/2010/05/18/brasil\\_trend\\_foods\\_2020\\_fiesp.ntc](http://www.fiesp.com.br/agencianoticias/2010/05/18/brasil_trend_foods_2020_fiesp.ntc)>. Acesso em: 01 jul. 2010.

FERREIRA, A. C. S.; MONTEIRO, J; OLIVEIRA, C.; PINHO, P. G. de. Study of major aromatic compounds in port wines from carotenoid degradation. **Food Chemistry**. v. 110, p. 83 – 87, 2008.

FINE, S. L.; BERGER, J. W.; MAGUIRE, M. G.; HO, A. C. Age-related macular degeneration. **The New England Journal of Medicine**. v. 342 (7), p. 483-92, 2000.

FOX, J. B.; THAYER, D. W.. Radical oxidation of riboflavin. **International Journal for Vitamin and Nutritional Research**. v.68, p. 174-180, 1998.

GRELA, E. R.; JENSEN, S. K.; JAKOBSEN, K. Fatty acid composition and content of tocopherols and carotenoids in raw and extruded grass pea (*Latyrus satirus* L.) **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 79, p. 2075 – 2078, 1999.

GUIMARÃES, F. A. Desenvolvimento de leite pasteurizado para pessoas idosas: identificação de necessidades, e expectativas de segmentos de mercado e utilização da Matriz de Qualidade. **Tese de Mestrado**. Universidade Federal de Viçosa – Minas Gerais, 2004.

HAEGERSTROM-PORTNOY, G. Short-wavelength-sensitive-cone sensitivity loss with aging: a protective role for macular pigment? **Journal of the Optical Society of America A**. v. 5, p. 2140 – 2144, 1988.

HAM Jr, W. T.; MUELLER, H. A.; RUFFOLO Jr, J. J.; MILLEN, J. E.; CLEARY, S. F.; GUERRY, R. K.; GUERRY, D. Basic mechanisms underlying the production of photochemical lesions in the mammalian retina. **Current Eye Research**. v. 3 (1), p. 165 – 174, 1984.

HAMMOND JR., B.R., JOHNSON, E.J., RUSSELL, R.M., KRINSKY, N.I., YEUM, K.-J., EDWARDS, R.B., SNODDERLY, D.M. Dietary modification of human macular pigment density. **Investigative and Ophthalmology & Visual Science**. v. 38, p. 1795–1801, 1997.

HANKINSON, S. E.; STAMPFER, M. J.; SEDDON, J. M.; COLDITZ, G. A.; ROSNER, B.; SPEIZER, F. E.; WILLETT, W. C. Nutrient intake and cataract extraction in women: a prospective study. **British Medical Journal**. v. 305, p. 335 – 339, 1992.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Perfil dos idosos responsáveis pelos domicílios no Brasil 2000**. 97p, Rio de Janeiro, 2002. Disponível

em:

<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/perfilidoso/perfidosos2000.pdf>>.

Acesso em 20 jun 2010.

INSITUTO DE OLHOS DE GUARAPUAVA. 2010. Degeneração macular relacionada a idade(DMRI). <[http://www.cbo.com.br/site/index.php?mostra=7demaio\\_dmri](http://www.cbo.com.br/site/index.php?mostra=7demaio_dmri)>. Acesso em: 28, Jun 2010.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). Topic Q2B, Validation of Analytical Procedures: Methodology, **Proceedings of the Commission of the European Communities**. 1996.

JIMENEZ, C.; PICK, U. Differential reactivity of  $\beta$ -carotene isomers from *Dunaliella bardawil* toward oxygen radicals. **Plant Physiology**. v. 101, p. 385 – 390, 1993.

JOHNSON, L.; NORKUS, E.; ABBASI, S. GERDES, J.; BHUTANI, V. Contribution of beta-carotene (BC) from BC enriched formulae to individual and total serum carotenoids in term infants. **FABESB Journal**. 9(4 Pt 3):314A (Abstract no. 1869), 1995.

JONES, S. T., ARYANA, K. J. LOSSO, J. N. Storage and stability of lutein during ripening of cheddar cheese **Journal of Dairy Science**. v. 88, p 1661 – 1670, 2005.

JUNG, M. Y.; YOON, S. H.; LEE, H. O.; MIN, D. B. Singlet oxygen and ascorbic acid effects on dimethyl disulfide and off-flavor in skim milk exposed to light. **Journal of Food Science**. v. 63, p. 408-412, 1998.

KAROUI, R.; LAGUET, A.; DUFOUR, E. Fluorescence spectroscopy: A tool for the investigation of cheese melting – Correlation with rheological characteristics. **Lait**. v. 83, p. 251 – 264. 2003.

KAROUI, R.; DUFOUR, E.; De BAERDEMAEKER, J. Common components and specific weights analysis: A tool for monitoring the molecular structure of semi-hard cheese throughout ripening. **Analytica Chimica Acta**. v. 572, p. 125-133, 2006.

KHACHIK, F.; BERNSTEIN, P. S.; GARLAND, D. L. Identification of lutein and zeaxanthin oxidation products in human and monkey retinas. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v. 38, p. 1802 – 1811, 1997.

KHACHIK, F.; MOURA, F. F. de; ZHAO, D. Y.; AEBISCHER, C. P.; BERNSTEIN, P. S. Transformations of selected carotenoids in plasma, liver and ocular tissues of humans and in nonprimate animal models. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v. 43, p 3383 – 3392, 2002.

KIM, Y. D.; MORR, C. V. Dynamic headspace analysis of light activated flavor in milk. **International Dairy Journal**. v. 6, p. 185- 193, 1996.

KIRSCHMANN, G. **Nutrition Almanac**. ed 4, New York: McGraw Hill, 1996.

- KOPAS-LANE, L. M.; WARTHESEN, J. J. Carotenoid photostability in raw spinach and carrots during cold storage. **Journal of Food Science**. v. 60, p. 773 – 776, 1995.
- KRINSKY, N. I. Actions of carotenoids in biological systems. **Annual Review of Nutrition**. v. 13, p. 561-587, 1993.
- KRINSKY, N. I.; LANDRUM, J. T.; BONE, R. A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. **Annual Review of Nutrition**. v. 23, p. 171 – 201, 2003.
- KRISTENSEN, D. V.; ORLIEN, G.; MORTENSEN, G.; BROCKHOFF, P.; SKIBSTED, L. H. Light-induced oxidation in sliced harvati cheese packaged in modified atmosphere. **Internarional Dairy Journal**. v. 10, p. 95 – 103, 2000.
- LANDRUM, J.T., BONE, R.A., JOA, H., KILBURN, M.D., MOORE, L.L., SPRAGUE, K.E. A one year study of the macular pigment: the effect of 140 days of a lutein supplement. **Experimental Eye Research**. v. 65, p. 57–62, 1997.
- LANDRUM, J. T.; BONE, R. A.; CHEN, Y.; HERRERO, C.; LLERENA, C. M.. TWAROWSKA, E. Carotenoids in human retina. **Pure and Applied Chemistry**. v. 71, p 2237 – 2244, 1999.
- LASSEN, A.; KALL, M.; HANSEN, K.; OVESEN, L. A comparison of the retention of Vitamins B1, B2 and B6, and cooking yield in pork loin with conventional and enhanced meal-service systems. **European Food Research and Technology**. v. 215, p. 194 – 199, 2002.
- LI, T. L.; MIN, D. B. Stability and photochemistry of vitamin D2 in model system. **Journal of Food Science**.v. 63, p. 413 – 417, 1998.
- MARES-PERLMAN, J. A.; BRANDY, W. E.; KLEIN, B. E. K.; KLEIN, R.; HAUS, G. J.; PALTA, M.; RITTER, L. L.; SHOFF, M. M. Diet and nuclear lens opacities. **American Journal of Epidemiology**. v. 141, p. 322-334, 1995.
- MARES-PERLMAN, J. A.; FISHER, A. I.; KLEIN, R.; PALTA, M.; BLOCK, G. MILLEN, A. E.; WRIGHT, J. D. Lutein and zeaxanthin in the diet and serum and their relation to age-related maculopathy in the third national health and nutrition examination survey. **American Journal of Epidemiology**. v. 153, p. 424 – 432, 2001.
- MARES-PERLMAN, J. A.; MILLEN, A. E.; FICEK, T. L.; HANKINSON, S. E. The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. **The Journal of Nutrition**. v. 132, p. 518S – 524S, 2002.
- MASSEY, J.B. Kinetics of transfer of  $\alpha$ -tocopherol between model and native plasma lipoproteins. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 793, p. 387–392, 1984.
- MERCADANTE, A. M. Carotenoids in foods: sources and stability during processing and sotorage. In. SOCACIU, C. **Food Colorants – Chemical and Functional Properties**. 2008.

MICHAUD, D. S.; FESKANICH, D.; RIMM, E. B.; COLDITZ, G. A.; SPEIZER, F. E.; WILLETT, W. C.; GIOVANNUCCI, E. Intake of specific carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 72 (4), p. 990 – 2000.

MILK POINT. **Riboflavina (vitamina B12) e saúde**. 07 mar. 2005. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/?noticiaID=22870&actA=7&areaID=50&secaoID=167>> . Acesso em: 08 set. 2008.

MINGUEZ-MOSQUERA, M. I.; GALHARDO-GUERREIRO, L. Anomalous transformation of chloroplastic pigments in gordal variety olives during processing for table olives. **Journal of Food Protection**. v. 58, p. 1241 – 1248, 1995.

MONREAL, M.; ANCOS de, B.; CANO, P. Influence of critical storage temperatures on degradative pathways of pigments in green beans (*Phaseolus vulgaris* Cvs. Perona and Boby). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, p. 19 – 24, 1999.

MONTENEGRO, M. A.; RIOS, A. de O.; MERCADANTE, A. Z.; NAZARENO, N. A.; BORSARELLI, C. D. Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 367 – 373, 2004.

MONTENEGRO, M. A.; NUNES, I. L.; MERCADANTE, A. Z.; BORSARELLI\*, C. D. Photoprotection of vitamins in skimmed milk by an aqueous soluble lycopene- gum arabic microcapsule. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, p.323 – 329, 2007.

NECNETWORK. **Cresce o consumo de iogurte no Brasil**. 2008. Disponível em: <[http://www.necnet.net/artigo.php?id\\_artigo=40246&item=16807](http://www.necnet.net/artigo.php?id_artigo=40246&item=16807)> Acesso em: 15 set. 2008.

NEWCOMB, P. A.; KLEIN, R.; MASSOTH, K. M. Education to increase ophthalmologic care in onset diabetes patients: indications from the Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. **Journal of Diabetes Complications**. v. 6, p. 211 - 217, 1992.

OLMEDILLA, B.; GRANADO, F.; BLANCO, I.; VAQUERO, M. Lutein, but not alpha-tocopherol, supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts: a 2-year double-blind, placebo controlled pilot study. **Nutrition**. v. 19, p. 21 – 24, 2003.

OLSEN, J. A. Carotenoids. In: SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M. ROSS, C. A. (eds). **Modern Nutrition in Health and Diseases**. Ed 9, p 525 – 541, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1999.

OTLES, S.. Carotenoids. **Carotenoids**. 2006. Disponível em.<<http://eng.ege.edu.tr/~otles/ColorScience/carotenoids.htm>>. Acesso em: 26 jul. 2010.

PALOMBO, P.; FABRIZI, G.; RUOCCO, V.; FLUHR, J.; ROBERTS, R.; MORGANTI, P. Beneficial long-term effects of combined oral/topical antioxidant treatment with the carotenoids lutein and zeaxanthin on human skin: a double-blind, placebo-controlled study. **Skin Pharmacology and Physiology**. v.20, p. 199 – 210, 2007.

PARKER, R. S. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. **FABESB Journal**, v. 10, p. 542-551, 1996.

RICHER, S.; STILES, W.; STATKUTE, L.; PULIDO, J.; FRANKOWSKI, J.; RUDY, D.; PEI, K.; TSIPURSKY, M.; NYLAND, J. Double-masked, placebo-controlled, randomized trial of lutein and antioxidant supplementation in the intervention of atrophic age-related macular degeneration: the Veterans LAST study (Lutein, Antioxidant Supplementation Trial), **Optometry**. v. 75, p. 216 – 230, 2004.

RYSSTAD, G.; EBBESEY, A.; EGGESTAD, J. Sensory and chemical quality of UHT milk stored in paperboard cartons with different oxygen and light barriers. **Food Additives and Contaminants**. v. 15 (1), p112-122, 1998.

ROODENBURG, A. J. C.; LEENEN, R.; VAN HET HOF, K. H.; WESTSTRATE, J. A.; TIJBURG, L. B. M. Amount of fat in diet affects bioavailability of lutein esters but not of  $\alpha$ -carotene and vitamin E in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p 1187 - 1193, 2000.

SAINT-EVE, A.; LÉVY, C.; MOIGNE, M. LE.; DUCRUET, V.; SOUCHON, I. Quality changes in yogurt during storage in different packaging materials. **Food Chemistry**. v. 110, p. 285 – 293, 2008.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; PADULA, M.; COLTRO, L.; ALVES, R. M. V.; GARCIA, E. E. C. **Embalagens Plásticas Flexíveis**. Instituto de Tecnologia de Alimentos, 267p, 2002.

SEDDON, J. M.; AJANI, U. A.; SPERDUTO, R. D.; *et al.* Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. **Eye Disease Case-Control Study Group. JAMA**. v. 272, p. 1413 – 1320, 1994.

**SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS.** Consumo de alimentos saudáveis no Brasil cresce 82%. **2010. Disponível em:** <<http://www.sebrae-rs.com.br/central-noticias/agencia-noticias/consumo-alimentos-saudaveis-no-brasil-cresce-82/2161.aspx>>. Acesso em 01 jul. 2010.

SENDER, C. S.; CHANG, H.; HAMM, F.; ELSNER, P.; THIELE, J. J. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. **International Journal of Dermatology**. v.43, p. 326 – 335, 2004.

SCHIEBER, A.; CARLE, R. Occurrence of carotenoid *cis* isomer in food: Technological, analytical and nutritional implications. **Trends in Food Science and Technology**. v.16, p 416 – 422, 2005.

- SCHWEIGERT, F.; BATHE, K.; CHEN, F.; BUSCHER, U.; DUDENHAUSEN, J. Effect of the stage of lactation in humans on carotenoid levels in milk, blood plasma and plasma lipoprotein fractions. **European Journal of Nutrition**, v. 43, p. 39 – 44, 2004.
- SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**. v. 82 (2), p. 291 – 295, 1997.
- SILVA, E. Biological implications of aerobically obtained riboflavin-sensitized photoproducts of tryptophan. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. v. 14, p. 142 – 144, 1992.
- SILVA, E.; GODOY, J. Riboflavin sensitized photooxidation of tyrosine. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**. v. 64, 253 – 256, 1994.
- SILVA, E.; EDWARDS, A. M.; PACHECO, D. Visible light-induced photooxidation of glucose sensitized by riboflavin. **The Journal of Nutrition Biochemistry**. v. 10, p. 181 – 185, 1999.
- SHI, X. M.; CHEN, F. Stability of lutein under various storage conditions. **Food Chemistry**. v. 41, p. 38 – 41, 1997.
- SKIBSTED, L. H. Light-induced changes in dairy products. **Bulletin of the IDF**. v. 346, p. 4-9, 2000.
- STAHL, W.; SIES, H. Physical quenching of singlet oxygen and *cis-trans* isomerization of carotenoids. **Annals of the New York Academy of Science**. v. 961. p 10 – 19, 1993.
- STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 24, p. 345 – 351, 2003.
- STRINGHETA, P. C.; NACHTIGALL, A. M.; OLIVEIRA, T. T. de; RAMOS, A. M.; SANT'ANA, H. M.; GONÇALVES, P. M. P. J. C. Luteína: propriedades antioxidantes e benefícios à saúde. **Alimentos e Nutrição**. v. 17, n. 2., p. 229 – 238, 2006.
- SUBAGIO, A.; WAKAKI, H.; MORITA, N. Stability of lutein and its myristate esters. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 63, p. 1784-1786, 1999.
- SUBAGIO, A.; MORITA, N. No effect of esterification with fatty acid on antioxidant activity of lutein. **Food Research International**. v. 34, p. 315-320, 2001.
- TAMIME, A. Y.; DEETH, H. C. Yogurt technology and biochemistry. **Journal of Food Protection**. v.43, p. 939 0 977, 1980.
- TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yogurt – Science and Technology**. 2 ed. CRC Press, 605p, 1999.
- TANG, Y. C.; CHEN, B. H. Pigment change on freeze-dried carotenoid powder during storage. **Food Chemistry**. v. 69, p. 11 – 17, 2000.

TOKUSOGLU, □. Lutein fortified nutraceutical cream cheese: Psychochemical, microbiological and sensory quality characteristics of the new developed dairy product. **Books of Abstracts IFT**. 2008.

TOYOSAKI, T.; HAYASHI, A. A structural análisis of the products of milk riboflavin photolysis. **Milchwissenschaft**. v. 48 (11), p. 607 – 609, 1993.

TRUMBO, P. R.; ELLWOOD, K. C. Lutein and zeaxanthin intakes and risk of age-related macular degeneration and cataracts: na evaluation using the Food and Drug Administration's evidence-based review system for health claims. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, p. 971 – 974, 2006.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; FAJGELD, WILLETTS, A. P.; WOOD, R. Harmonized Guidelines For the Use of Recovery Information in Analytical Measurement (IUPAC Technical Report). **Pure and Appied. Chemistry**. v. 71 (2), p. 337–348, 1999.

THOMPSON, M., ELLISON, S. L. R, WOOD, R. Harmonized Guidelines For Single Laboratory Validation Of Methods Of Analysis - (IUPAC Technical Report) **Pure and Appied. Chemistry**. v. 74 (5), p. 835–855, 2002.

UPDIKE, A.A., AND SCHWARTZ, S.J. 2003. Thermal processing of vegetables increases cis isomers of lutein and zeaxantin. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 51, p. 6184– 6190, 2003.

VASSILA, E.; BADEKA, A.; KONDYLI, E.; SAVVAIDIS, I.; KONTOMINAS, M. G. Chemical and microbiological changes in fluid milk as affected by packagins conditions. **International Dairy Journal**. v.12, p.715-722, 2002.

VITERI, G.; EDWARDS, A. M.; LA FUENTE, J. D.; SILVA, E. Study of the interaction between triplet riboflavin and the  $\alpha$ -,  $\beta_H$ - e  $\beta_L$ - crystallins on the eye lens. **Photochemistry and Photobiology**. v. 77, p. 535 - 540, 2003.

VON DOERING, W. E.; SOTIRIOU-LEVENTIS, C.; ROTH, W. R. Thermal interconversions among 15-*cis*, 13-*cis* and all-*trans*-  $\beta$ -carotene: Kinetics, Arrheius parameters, thermochemistry, and potential relevance to anticarcinogenicity of all-*trans*- $\beta$ -carotene. **Journal Chemical Society**. v.117, p. 2747 – 2757, 1995.

WINTERHALTER, P. Oxygenated C13-morisoprenoids – important flavor precursors. Flavor prevursors – termal and enzymatic conversión. In: TERANISHI, R.; TAKEOKA, G. R.; GUNTERT, M. (eds). **Flavor precursors**. Washington, D. C.: American Chemical Society, p. 98 – 115, 1992.

WOLD, J. P., JØRGENSEN, K., LUNDBY, F. Nondestructive measurement of light-induced oxidation in dairy products by fluorescence spectroscopy and imaging. **Journal of Dairy Science**. v. 85, p. 1693-1704, 2002.

WOLD, J. P., VEBERG, A., LUNDBY, F., NILSEN, A. N., MOAN, J. Influence of storage time and color of light on photooxidation in cheese: A study based on sensory analysis and fluorescence spectroscopy. **International Dairy Journal**. v. 16, p. 1218 – 1226, 2006.

YEUM, K. J.; TAYLOR, A.; TANG, G.; RUSSEL, R. M.; Measurement of carotenoids, retinoids, and tocopherols in human lens. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v. 36, p. 2756 – 2761, 1995.

YOUNG, A. J.; LOWE, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 385, p. 20 – 27, 2001.

ZANDOMENEGHI, M., CARBONARO, L., ZANDOMENEGHI, G. Biochemical fluorimetric method for the determination of riboflavin in milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, p. 5990- 5994, 2007.

## **CAPÍTULO I**

### **VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFLUORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE RIBOFLAVINA EM IOGURTE.**

A ser submetido à revista “Food Chemistry”

## VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFLUORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE RIBOFLAVINA EM IOGURTE

### RESUMO

O uso da titulação espectrofluorimétrica de riboflavina (RBF) utilizando proteína ligante de riboflavina (RBPO) como titulante, para determinação de RBF em leite foi otimizado e validado para iogurte. As determinações de RBF foram realizadas com acessório para medidas em *front-face*, em um ângulo de 27°. A seletividade do método foi determinada pela adição de padrão de RBF no iogurte e em água. As curvas apresentaram-se paralelas com inclinações de  $1,001 \pm 0,007$  e  $1,00 \pm 0,03$  para as titulações de RBF em água e em iogurte, e os limites de detecção e quantificação foram 0,0558 µg e 0,1691 µg, respectivamente. A repetitividade, estimada pelo desvio padrão relativo, foi de 4,0%. A exatidão foi de  $99 \pm 2$  %, e os experimentos de robustez mostraram que o método é efetivo mesmo quando o produto foi analisado após 30 dias de estocagem, em iogurtes produzidos em dias diferentes, com diferentes massas de iogurte, com e sem adição de água.

**Palavras-chave: riboflavina, iogurte, front-face, fluorescência.**

## SUMMARY

A spectrofluorimetric titration method for the determination of riboflavin (RBF) in yogurt, using apo-riboflavin-binding protein as titrant and an accessory for front-face measurement at an incidence angle of the excitation beam at  $27^\circ$ , was validated. The selectivity was determined by RBF addition to yogurt and to water. Both straight lines were parallel with slopes equal to  $1.001 \pm 0.007$  for water and  $1.00 \pm 0.03$  for yogurt. The detection and quantification limits were  $0.0558 \mu\text{g}$  and  $0.1691 \mu\text{g}$ , respectively. Repeatability estimated by the relative standard deviation was  $4.0 \%$ . The accuracy was  $(99 \pm 2) \%$  and the experiments for robustness showed that the RBF values are equal after 30-days storage, for yogurt produced on different days, with different quantities of yogurt added to water and to yogurt with no added water. The results show that the determination of RBF by spectrofluorimetric titration is applicable for yogurt.

**Key-words: riboflavin, yogurt, front-face, fluorescence.**

## 1. INTRODUÇÃO

A foto-oxidação em produtos lácteos ocorre na presença de luz, oxigênio e um fotossensibilizador como a riboflavina (RBF). A vitamina absorve luz na região do visível e atua como fotossensibilizador, o que envolve formação de oxigênio singlete e/ou formação de radical livre levando à degradação de lipídios e proteínas (Skibsted, 2000). Tanto a luz, quanto o oxigênio podem induzir a degradação de RBF (Sattar *et al.*, 1975, Skibsted, 2000). Este processo de deterioração oxidativa pode levar à descoloração, formação de *off-flavors* e perda de nutrientes (Skibsted, 2000; Cristensen *et al.*, 2003). Portanto, o tipo de embalagem é essencial para proteção do produto contra a ação da luz e do oxigênio.

A espectroscopia de fluorescência é um método rápido, não destrutivo, com alta sensibilidade e especificidade, cada vez mais utilizado na análise em alimentos. Este método tem sido aplicado em alguns estudos para verificar alterações estruturais nas proteínas do leite durante tratamento térmico (Dufour e Riaublanc, 1997), maturação de queijos (Karoui *et al.*, 2003. Karoui *et al.*, 2006), e principalmente foto-oxidação de produtos lácteos (Andersen *et al.* 2005, Becker *et al.*, 2003; Wold *et al.*, 2006). Wold e colaboradores (2002) utilizaram a técnica de *front-face* para avaliar a foto-oxidação em vários produtos lácteos.

A riboflavina pode ser determinada de acordo com o método padrão descrito pela AOAC (2006), o qual envolve diversas etapas de extração com solventes orgânicos, processo de autoclavagem e purificação das amostras antes das medidas fluorimétricas, tornando o método caro e trabalhoso.

Zandomenghi *et al.* (2007) propõem um método bioquímico e fluorimétrico para determinação de RBF em leite, em que associam o uso da técnica de *front-face* com a capacidade da apo-proteína ligante de RBF (RBPO) de se ligar à RBF, diminuindo assim, a intensidade de fluorescência emitida. Os autores titularam a RBF presente no leite pela adição gradual de solução de RBPO.

A técnica de *front-face* é útil na análise de amostras opacas, como os produtos lácteos, onde não é possível o uso de ângulo reto. O presente trabalho tem como objetivo otimizar e validar um método espectrofluorimétrico, baseado no trabalho de Zandomenghi, *et al.* (2007), para a determinação de RBF em iogurte. Para a validação

do método, os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, limite de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Reagentes**

Riboflavina (RBF) (Sigma R9504, > 99% pureza) e *riboflavin binding protein* (RBPO), (forma apo, Sigma R8628) foram fornecidas pela *Sigma Chemical Company* (St. Louis, MO, USA). O leite em pó desnatado Molico<sup>®</sup> (Nestlé, Araçatuba, SP - Brasil) foi comprado em supermercado da cidade de Campinas (SP - Brasil), sendo todo do mesmo lote (9179046032) e em quantidade suficiente para desenvolver a pesquisa. A cultura láctea mista liofilizada de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* (YO-MIX 505 LYO 200<sup>®</sup>) foi fornecida pela Danisco, (Cotia, SP, Brasil). A água utilizada nos experimentos foi inicialmente bi-destilada e em seguida deionizada (Millipore).

### **2.2. Produção de iogurte**

O iogurte foi produzido a partir de leite desnatado em pó Molico<sup>®</sup> reconstituído a 10% de sólidos totais, e adicionado de 2,5% de cultura láctea mista liofilizada de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* ativada previamente. O leite adicionado de cultura foi distribuído em copos plásticos que foram selados com selos metálicos por termo indução, e em seguida, foi incubado a 45°C até atingir pH 4,8, quando foi resfriado em banho de gelo, e acondicionado a 5°C para posterior utilização.

### **2.3. Procedimentos para a validação do método**

O espectrofluorímetro (Varian Cary Eclipse, Palo Alto, CA, USA) foi equipado com acessório (Varian Accessory Solid Sample, Melbourne, Australia) capaz de regular a inclinação do ângulo de posicionamento da amostra para permitir medidas em *front-face*, a fim de minimizar a radiação que reflete e se espalha durante a incidência da luz na amostra. Verificaram-se ângulos que variaram de 20° a 31°, sendo o melhor ângulo de 27° em relação à luz incidente.

Os espectros foram medidos em cubetas de quartzo (1 × 1 cm), as fendas de excitação e emissão foram iguais (10 nm), o tempo de integração foi 0,5 s e o incremento no comprimento de onda do espectro de varredura foi de 1 nm. A emissão

foi medida entre 480 nm e 700 nm, com excitação da amostra a 450 nm. Os experimentos de titulação da RBF foram efetuados pela adição de alíquotas de 10 a 15 µL de RBPO na amostra a fim de suprimir gradualmente a fluorescência. Após cada adição, a cubeta foi agitada vagarosamente em vortex durante 30 segundos, e em seguida se mediu a emissão. Aproximadamente de 15 a 20 adições foram necessárias em cada experimento. Todas as titulações foram realizadas em triplicata.

O método espectrofluorimétrico para a quantificação de RBF em iogurte foi validado segundo as recomendações da IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry (Thompson *et al.*, 2002) e da ICH – International Conference of Harmonization (1996). Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Foram avaliados a seletividade, linearidade, faixa de aplicação, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez. As figuras foram obtidas utilizando-se o programa Origin 8.0<sup>®</sup> (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA).

### **2.3.1. Determinação da equivalência entre RBF e RBPO**

Massas conhecidas de RBF e RBPO (0,17 mg e 1,0057 mg, respectivamente) foram medidas em microbalança AD6<sup>®</sup> (Perkin Elmer, cidade, estado, USA) e dissolvidas em 250 mL e 2,4 mL de água, respectivamente. 1,2 mL da solução aquosa de RBF foi adicionada na cubeta de quartzo e titulada espectrofotometricamente com a solução de RBPO.

### **2.3.2. Determinação da massa de RBF no leite Molico<sup>®</sup>**

Como não há material de referência certificado para riboflavina em leite, foi utilizado o método denominado “surrogate recovery” (Thompson *et al.*, 1999), similar ao método de adição de padrão, para a determinação da massa de RBF no leite em pó Molico<sup>®</sup>. Foi adicionada uma massa conhecida de RBF ao leite em pó antes da adição de água de modo que a quantidade de RBF adicionada fosse 50% superior à encontrada no leite sem adição de RBF. Titulou-se a RBF no leite líquido com e sem a adição de RBF. O volume de leite na cubeta foi de 300 µL acrescido de 100 µL de água. A equação utilizada foi:

$$\text{RBF}_{\text{total,titulado}} = \text{RBF}_{\text{adicionado}} + \text{RBF}_{\text{leite}} \quad (1)$$

Onde  $RBF_{total, \text{titulado}}$  é a concentração de RBF (massa RBF/g Leite), obtida na titulação da amostra adicionada de RBF;  $RBF_{adicionado}$  é a concentração de RBF adicionada ao leite e  $RBF_{leite}$  é a concentração de RBF no leite sem adição de RBF.

A concentração de RBF no leite, calculada pela equação (1), foi comparada com o valor obtido na titulação do leite sem adição de RBF, pela determinação do grau de recuperação R, obtido pela equação (2) (Thompson *et al.*, 2002):

$$R = \frac{C_{obs}}{C_{ref}} \quad (2)$$

Onde  $C_{obs}$  é a concentração do leite obtida na titulação sem adição de RBF e  $C_{ref}$  é a concentração de RBF, obtida pela aplicação da equação (1).

### **2.3.3. Avaliação de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez**

A seletividade foi avaliada pelo método de adição de padrão (RBF) no iogurte. Foi construída uma curva analítica da titulação de RBF no iogurte preparado pela adição de quantidades conhecidas de RBF no iogurte, medidas em balança AE 200® (Mettler Toledo, Zurique, Suíça), a qual foi comparada com a curva analítica da titulação das mesmas quantidades de RBF em água. Os experimentos foram realizados em triplicata e as massas de RBF adicionadas foram de 10%, 20%, 30%, 40%, 50% e 60% acima do valor de RBF do iogurte sem a adição de padrão. Em todas estas porcentagens, o volume de água adicionada à cubeta após a pesagem do iogurte foi de 400  $\mu\text{L}$ . Para as titulações do iogurte, as massas nas cubetas foram de 0,6 g (para as amostras com 10% e 20% de RBF), 0,5 g (para as amostras com 20% e 30% de RBF) e 0,4 g (para as amostras com 40%, 50% e 60% de RBF adicionada). Nas titulações das soluções de RBF e água, os volumes de solução foram de 1000  $\mu\text{L}$  (solução 10%), 500  $\mu\text{L}$  (soluções 20% e 30%), 250  $\mu\text{L}$  (soluções 40% e 50%) e 200  $\mu\text{L}$  (solução 60%). Para as soluções de 20% de RBF em diante, adicionou-se água até completar o volume de 1000  $\mu\text{L}$ .

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram avaliados pela titulação de RBF em soluções de iogurte que consistiam em massas que variaram de 0,1 a 0,6 g, adicionadas cada uma de 400  $\mu\text{L}$  de água. O LD do método foi obtido pela equação (3) (ICH, 1996):

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (3)$$

Onde  $S$  é a inclinação da reta obtida a partir da titulação e  $s$  é o desvio padrão da interseção da curva analítica construída a partir da titulação das amostras. Para determinação do LQ foi utilizada a equação (4) (ICH, 1996):

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (4)$$

A precisão foi determinada por meio da repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade foi calculada por nove determinações (com 3 repetições cada) contemplando o intervalo linear do método, isto é, três concentrações (alta, média e baixa correspondentes a 0,6; 0,3 e 0,1 g de iogurte, respectivamente, medidos na cubeta) (ICH 1996). Para estes cálculos foram utilizados os resultados dos experimentos do limite de detecção e quantificação.

A precisão intermediária foi verificada pela concordância entre os resultados do mesmo laboratório, obtidos em dias diferentes (ICH 1996). Foram feitas duas determinações em cinco dias diferentes do mesmo iogurte. As massas de iogurte medidas nas cubetas foram de 0,3 mg adicionadas de 400  $\mu$ L de água. Por fim, a precisão do método foi expressa por meio do desvio padrão relativo DPR:

$$DPR = \frac{s}{X_m} \times 100 \% \quad (5)$$

Onde,  $s$  é a estimativa do desvio padrão e  $X_m$  é a média aritmética do número de repetições.

A exatidão foi calculada de acordo com (ICH, 1996):

$$Exatidão = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica esperada}} \times 100 \% \quad (6)$$

Para avaliar a robustez, foram realizadas análises de iogurtes produzidos em diferentes dias, e acondicionados por diferentes períodos de tempo e utilizando-se massas diferentes de iogurte. Para isto as massas variaram de 0,1 a 0,6 g, as quais tiveram 400 µL de água adicionada. Também foram realizadas titulações de iogurte sem adição de água. Neste caso utilizou-se uma massa de iogurte igual a 0,4 g.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Titulação espectrofluorimétrica de RBF por RBPO**

A Figura 1 mostra a sequência de espectros durante a titulação espectrofluorimétrica de RBF com alíquotas crescentes de solução de RBPO. É possível observar que a intensidade da emissão a 525 nm decresce proporcionalmente com a quantidade de RBPO adicionada. A emissão tende a permanecer constante próxima do ponto final. A Figura 2 apresenta curva de titulação de iogurte com solução de RBPO. Os resultados obtidos indicam que a emissão de fluorescência variou linearmente antes e após o ponto final da titulação. Nesta figura, a linha *s* representa a fluorescência da RBF em decaimento acentuado com adição de RBPO, enquanto que *p* representa um decaimento mais sutil após o ponto final da titulação com RBF, quando o excesso de RBPO começa a se ligar outras substâncias fluorescentes com menor afinidade pela RBPO, tais como flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (Viñas et al., 2004).

#### **3.2. Equivalência entre RBF e RBPO**

A equivalência nominal indicada no rótulo do produto comprado da Sigma é 1,00 mg RBPO para 10,0 µg de RBF. No entanto, ao se utilizar esta equivalência, a inclinação da reta obtida pela titulação de massas conhecidas e crescentes de RBF com RBPO em água (figura não mostrada) foi 1,1286. Se esta equivalência fosse real a inclinação deveria ser unitária. Desta forma, as equivalências foram alteradas para 9,46 e 9,025 µg de RBF, e as novas inclinações foram 1,06938 e 1,02007, respectivamente. A partir dos três valores de inclinação e equivalência construiu-se um gráfico da inclinação versus equivalência. O gráfico foi linear (Figura 3) e para uma inclinação unitária calculou-se a equivalência. O valor obtido foi 1,00 mg RBPO para  $8,84 \pm 0,014$  µg de RBF. Esta equivalência foi utilizada em todos os experimentos de validação. O

desvio no valor da equivalência foi calculado utilizando a propagação de erros dos desvios padrões da inclinação e da intercessão da Figura 3.

### **3.3. Massa de RBF no leite Molico<sup>®</sup>**

A massa obtida experimentalmente de RBF no leite em pó desnatado Molico<sup>®</sup> foi  $2,334 \pm 0,028 \mu\text{g}$  e  $2,24 \pm 0,05 \mu\text{g}$  por grama para titulação de leite com e sem adição de RBF respectivamente. O grau de recuperação calculado pela propagação de erros dos desvios padrões de 0,028 e 0,05 foi de  $0,96 \pm 0,02$ . Este resultado indicou que não há outras substâncias no leite em pó Molico<sup>®</sup> competindo com a RBF e que o método utilizado foi eficaz. O teor de RBF em leite desnatado, encontrado na literatura (Fox & McSweeney, 1998), é de  $1,8 \mu\text{g}$  de RBF por grama de leite fluido desnatado. De acordo com estes autores, a concentração de RBF no leite é influenciada principalmente pela raça e alimentação do animal, sendo pouco afetada por processos tecnológicos como o tratamento térmico. Entretanto, o composto é bastante sensível à ação da luz (principalmente em comprimentos de onda ao redor de 450 nm), podendo apresentar grandes perdas dependendo da intensidade da luz a que o produto foi exposto, distância da fonte luminosa e principalmente material de embalagem. Desta forma, é possível afirmar que a diferença entre o valor de RBF encontrado na literatura e aqueles obtidos experimentalmente estão dentro de limites aceitáveis, em função da variação na origem do leite, tipo de alimentação dos animais e às condições de processamento e estocagem do produto final.

### **3.4. Seletividade e linearidade**

Na Figura 4 foi colocado como variável dependente a massa de RBF obtida na titulação com RBPO e como variável independente a massa medida na balança. As inclinações das retas da Figura 4 foram  $1,001 \pm 0,007$  e  $1,00 \pm 0,03$  para as titulações de RBF em água e em iogurte, respectivamente. Estes resultados indicam que não há interferência de outras substâncias presentes durante a titulação. Portanto, pode ser concluído que o método é seletivo. As interseções das retas foram  $0,008 \pm 0,007$  e  $2,21 \pm 0,02 \mu\text{g RBF/g}$  de produto (água ou iogurte) para as titulações de RBF em água e em iogurte, respectivamente. A interseção da reta de RBF em água corresponde ao valor esperado quando não há massa de RBF presente na água. Já a interseção da reta de RBF em iogurte indica que a massa de RBF no iogurte sem a adição externa de RBF

corresponde a  $2,221 \pm 0,02 \mu\text{g}$  de RBF por grama de iogurte. O valor de RBF encontrado para o leite desnatado foi de  $2,24 \pm 0,05 \mu\text{g}$  de RBF por grama, indicando que o método espectrofluorimétrico para a titulação de iogurte foi eficaz. Dados da literatura indicam que o teor de RBF para iogurte desnatado consiste em  $2,5 \mu\text{g}$  de RBF por grama de iogurte (Fox & McSweeney, 1998, Tamime & Robinson, 1999), o que permite afirmar que os resultados obtidos a partir da titulação de iogurte sem adição de RBF condizem com os valores apresentados na literatura. A Figura 4 também indica que a massa de RBF obtida na titulação com RBPO é diretamente proporcional à massa de RBF para a faixa de aplicação estudada, mostrando que a relação é linear. As retas da Figura 4 também foram paralelas (figuras não mostradas) para todas as outras três equivalências usadas na Figura 3.

### **3.5. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)**

A Figura 5 corresponde à curva analítica construída a partir das titulações em diferentes massas de iogurte na cubeta. O valor obtido para LD foi de  $0,0558 \mu\text{g}$  de RBF, sendo esta a menor concentração de riboflavina no iogurte que pode ser detectada pelo método.

O valor obtido para LQ foi de  $0,1691 \mu\text{g}$  de RBF, sendo esta a menor massa de riboflavina em iogurte passível de ser quantificada pelo método em questão.

### **3.6 Precisão**

O valor médio de RBF encontrado para as condições de repetitividade descritas anteriormente foi de  $2,35 \pm 0,012 \mu\text{g}$  RBF por grama de iogurte. Os resultados obtidos em dias diferentes pela verificação da precisão intermediária foram de  $2,13 \pm 0,02$ ,  $2,17 \pm 0,02$ ,  $2,224 \pm 0,002$ ,  $2,35 \pm 0,01$  e  $2,11 \pm 0,02 \mu\text{g}$  de RBF por grama de iogurte. A precisão do método, calculada pelo desvio padrão relativo (DPR), foi de 4%.

### **3.7 Exatidão**

Na ausência do material de referência para a vitamina B2, foi utilizado como valor de referência da equação (6), o valor de RBF do leite em pó Molico<sup>®</sup>, isto é,  $2,24 \pm 0,05 \mu\text{g}$  de RBF por grama de iogurte. Desta forma, a exatidão foi  $(99 \pm 2) \%$  calculada pela propagação de erros dos desvios padrões de 0,05 e 0,02, indicando alto

grau de concordância entre os resultados encontrados e os valores correspondentes encontrados em literatura.

### **3.8 Robustez**

O valor de RBF no iogurte, imediatamente após o preparo, foi  $2,22 \pm 0,02$   $\mu\text{g}$  de RBF por grama e após trinta dias, foi de  $2,11 \pm 0,02$   $\mu\text{g}$  de RBF por grama. Os resultados mostraram que o método é efetivo mesmo após 30 dias de estocagem no escuro a  $5^{\circ}\text{C}$  do produto, que é em média o tempo de vida útil deste produto no Brasil.

Iogurtes produzidos em dias diferentes também apresentaram valores próximos de RBF que variaram apenas de  $2,11 \pm 0,02$   $\mu\text{g}$  a  $2,13 \pm 0,02$  de RBF por grama.

Titulações realizadas com diferentes massas de iogurte e adição de água indicam valores de  $2,35 \pm 0,012$ ;  $2,36 \pm 0,015$ ;  $2,33 \pm 0,004$ ;  $2,35 \pm 0,005$  e  $2,22 \pm 0,002$   $\mu\text{g}$  de RBF por grama de iogurte para massas que foram de 0,1 a 0,6 gramas respectivamente. Titulação realizada em iogurte, sem adição de água, resultou num teor de  $2,0749 \pm 0,05644$   $\mu\text{g}$  de RBF por grama de iogurte. Os resultados obtidos indicaram que o método é robusto.

### **3.9 Faixa de aplicação**

Em relação ao iogurte, a faixa de aplicação abrange desde a massa mínima de iogurte sem adição de água ou 25% (m:v) a 100% de iogurte, onde a massa do iogurte é dada em gramas e o volume de água é dado em mL. Em relação à quantidade de RBF, a faixa de aplicação corresponde ao intervalo de 0,255  $\mu\text{g}$  a 1,37  $\mu\text{g}$ .

## **4. CONCLUSÃO**

O método para determinação de RBF em leite foi otimizado para análise em iogurte. Os resultados obtidos nas etapas de validação mostraram que o método é seletivo, linear, robusto, preciso e exato. Desta forma, o método proposto por Zandomenighi *et al.* (2007), é totalmente aplicável para determinação de RBF em iogurte. Além disso, o uso da técnica de *front-face* dispensa as etapas onerosas de preparação e purificação de amostra, como descrito no método da AOAC (2006).

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersen, C. M.; Vishart, M.; Holm, V. K. (2005) Application of fluorescence spectroscopy in the evaluation of light-induced oxidation in cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53. 9985 – 9992.

AOAC – Official Methods of Analysis (2006). Official Method 970.65 – Riboflavin (Vitamin B2) in Foods and Vitamin Preparations. Fluorimetric Method. Chapter 45, 12 – 13.

Becker, E. M.; Christensen, J.; Frederiksen, C. S.; Haugaard, V. K. (2003) Front-face fluorescence spectroscopy and chemometrics in analysis of yogurt: Rapid analysis of riboflavin. *Journal of Dairy Science* 86, 2508 – 2515.

Christensen, J.; Povlsen, V. T.; Sørensen, J. (2003) Application of fluorescence spectroscopy and chemometrics in the evaluation of the stability of processed cheese. *Journal of Dairy Science*, 86:1101-1107.

Dufour, E.; Riaublanc, (1997) A. Potentiality of spectroscopy methods for characterization of dairy products.I. Front-face fluorescence study of raw, heated and homogenized milks. *Lait*. 77, 657-670.

Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H. (1998) Dairy Chemistry and Biochemistry. Blackie Academic and Professional, 478p.

International Conference on Harmonisation (ICH) (1996) Topic Q2B, Validation of Analytical Procedures: Methodology, Proceedings of the Commission of the European Communities.

Karoui, R.; Laguet, A.; Dufour, E. (2003.) Fluorescence spectroscopy: A tool for the investigation of cheese melting – Correlation with rheological characteristics. *Lait* 83, 251 – 264.

Karoui, R.; Dufour, E.; De Baerdemaeker, J. (2006.) Common components and specific weights analysis: A tool for monitoring the molecular structure of semi-hard cheese throughout ripening. *Analytica Chimica Acta*. 572, 125-133.

Kirschmann, G. (1996.) *Nutrition almanac*. ed 4. New York: McGraw Hill.

Sattar, A.; de Man, J. M. (1975) Photooxidation of milk and milk product: a review. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 7, 13 – 37.

Skibsted, L. H. (2000) Light-induced changes in dairy products. *BIDFD*. 346, 4-9.

Tamime, A. Y.; Robinson, R. K. Yoghurt – Science and Technology. (1999) 2ed, Woodhead Publishing Ltd, 619p.

Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Fajgeld, Willetts, A. P.; Wood, R. (1999) Harmonized Guidelines For the Use of Recovery Information in Analytical Measurement (IUPAC Technical Report) *Pure Appl. Chem.* 71, 2, 337–348.

Thompson, M., Ellison, S. L. R., Wood, R. (2002) Harmonized Guidelines For Single Laboratory Validation Of Methods Of Analysis - (IUPAC Technical Report) *Pure Appl. Chem.* 74, 5, 835–855.

Wold, J. P., Jørgensen, K.; Lundby, F. (2002) Nondestructive measurement of light-induced oxidation in dairy products by fluorescence spectroscopy and imaging. *Journal of Dairy Science.* 85, 1693-1704.

Wold, J. P.; Veberg, A.; Lundby, F.; Nilsen, A. N.; Moan, J. (2006) Influence of storage time and color of light on photooxidation in cheese: A study based on sensory analysis and fluorescence spectroscopy. *International Dairy Journal.* 16, 1218 – 1226.

Zandomenighi, M., Carbonaro, L., Zandomenighi, G. (2007) Biochemical fluorimetric method for the determination of riboflavin in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 5990-5994.

Viñas, P.; Balsalobre, N.; López-Erroz, C.; Hernández-Córdoba, M. (2004). Liquid chromatographic analysis of riboflavin vitamers in food using fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 1789-1974.

## 6. FIGURAS

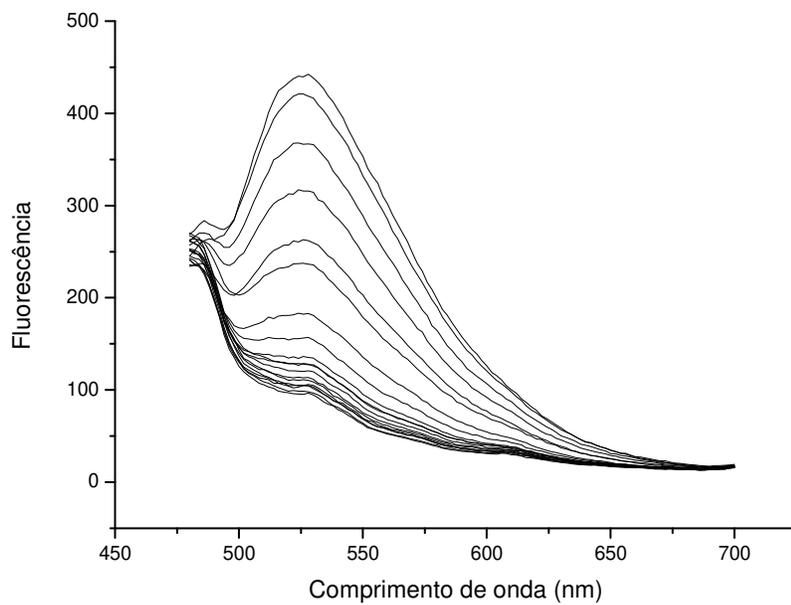


Figura 1. Diminuição da intensidade do espectro de emissão de fluorescência durante a titulação com alíquotas de 10 a 15  $\mu\text{L}$  de solução de RBPO.

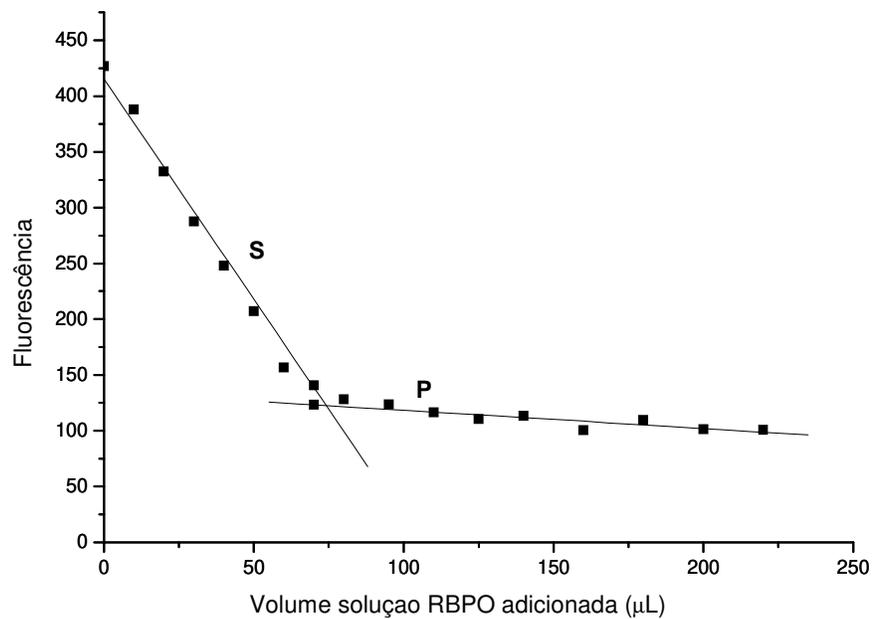


Figura 2. Titulação de iogurte com solução de RBPO. Fluorescência em função do volume de RBPO adicionado. O cruzamento entre as linhas S e P indica o ponto final da titulação.

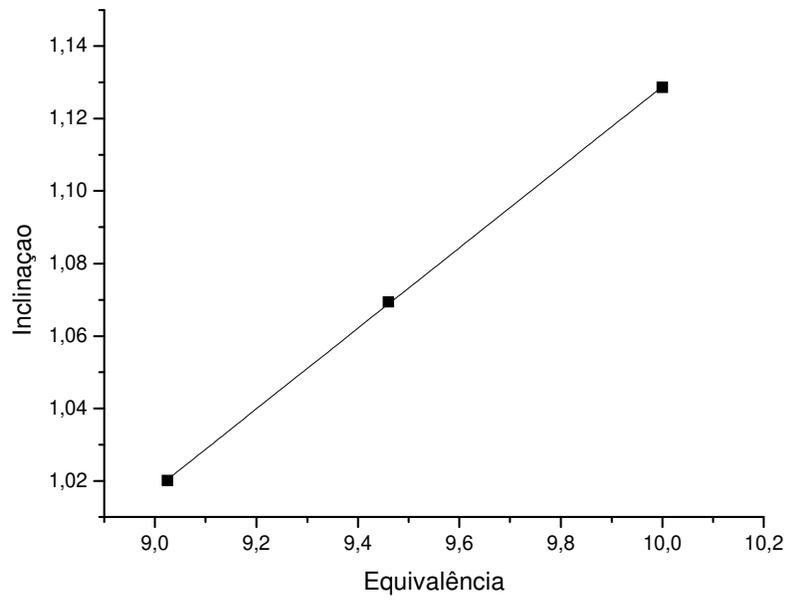


Figura 3. Inclinação versus equivalência para os valores de equivalência de 9,025; 9,46 e 10  $\mu\text{g}$  de RBF.

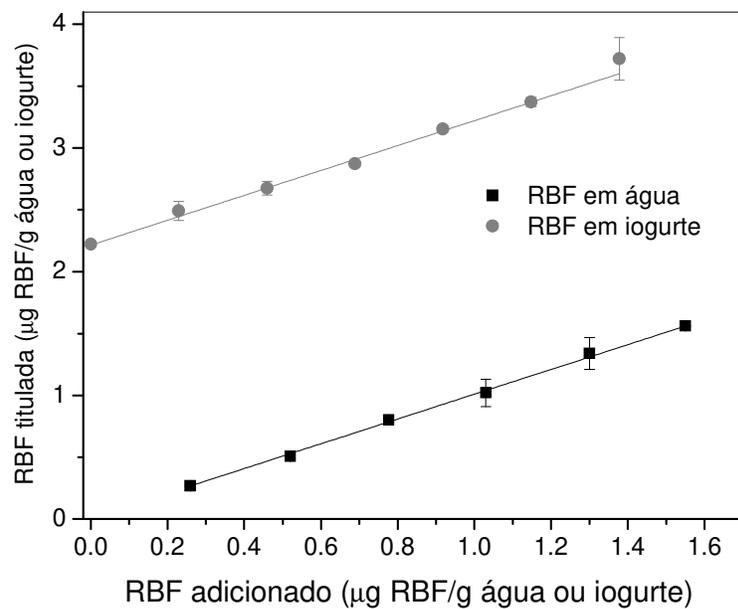


Figura 4. Curva analítica de seletividade. Massas conhecidas e crescentes de RBF foram adicionadas em água ou em iogurte. Cada ponto representa a média de três replicatas  $\pm$  desvio padrão.

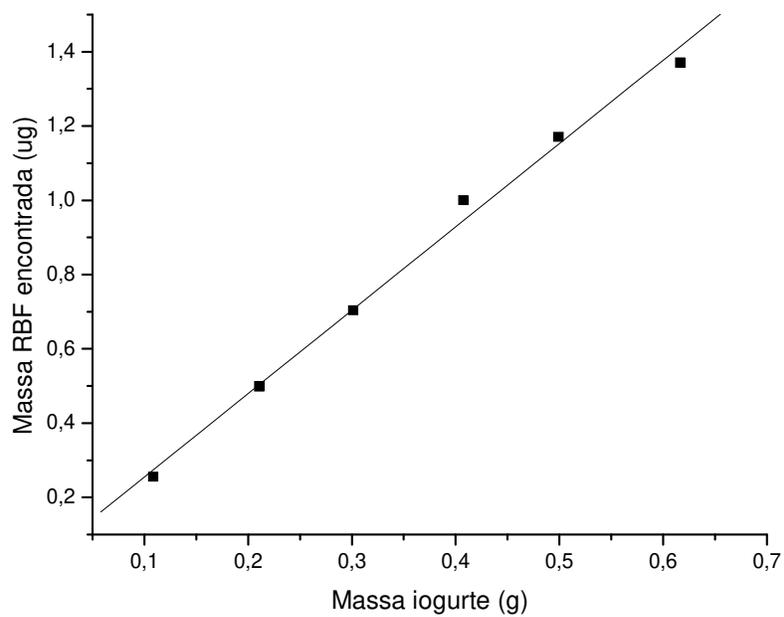


Figura 5. Curva analítica utilizada na determinação do limite de detecção, considerando a equivalência da solução de RBPO igual a 8,8414.

## **CAPÍTULO III**

### **INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE LUTEÍNA , TIPO DE EMBALAGEM E EXPOSIÇÃO À LUZ NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DO IOGURTE**

A ser submetido à revista “Journal of Dairy Science”

## **INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE LUTEÍNA, TIPO DE EMBALAGEM E EXPOSIÇÃO À LUZ, NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DO IOGURTE**

### **RESUMO**

O presente trabalho avaliou a estabilidade oxidativa de iogurte adicionado de luteína em embalagens de polipropileno, com diferentes propriedades de barreira ao oxigênio, na presença e ausência de luz, durante 35 dias de estocagem refrigerada. Iogurtes fabricados sem luteína e com um equivalente a 1,5 mg de luteína no produto final foram caracterizados quanto ao teor de carotenóides totais, teor de riboflavina, oxigênio dissolvido na amostra e presente no *headspace* e a degradação da riboflavina e luteína foram acompanhadas durante a estocagem. Houve diminuição do teor de riboflavina e aparecimento de produtos de oxidação nos iogurtes sem luteína e expostos à luz. Os iogurtes com luteína apresentaram teores de riboflavina e de carotenóides constantes durante o tempo de estocagem sob luz, o mesmo ocorrendo para as amostras mantidas no escuro. O tipo de embalagem influenciou no teor de oxigênio dissolvido e no *headspace*, mas não afetou a degradação da riboflavina. Os resultados mostram que a luteína impediu a foto-degradação da riboflavina no iogurte exposto à luz, independente do tipo de embalagem utilizada. Todos os iogurtes apresentaram teores de luteína praticamente constantes durante todo o período de estocagem refrigerada, permitindo supor que toda a luteína adicionada permaneceu disponível ao final do período de estocagem.

**Palavras-chave: iogurte, luteína, riboflavina, embalagem**

## **SUMMARY**

This study evaluated the oxidative stability of lutein-added yogurt packaged in polypropylene presenting different barrier properties to oxygen in the presence and absence of light, during 35 days of refrigerated storage. Yogurts made without extra lutein and 1.5 mg of added lutein in the final product were analysed for total carotenoids, riboflavin content, and dissolved oxygen present in the sample and present in the headspace. The degradation of riboflavin followed by spectrofluorimetry. Without lutein content of riboflavin decreased and the appearance of oxidation products in the yogurt exposed to light. The yogurts with lutein presented content of riboflavin and total carotenoids detected during the storage time under light; the same occurred for the samples kept in the dark. The type of packaging affected the dissolved oxygen and in the headspace, but did not affect the degradation of riboflavin. The results show that lutein prevented the degradation of riboflavin in yogurt exposed to light, regardless of the type of packaging used. For all yogurts lutein was fairly constant throughout the period of cold storage, allowing the assumption that all added lutein remained available at the end of the storage period.

**Key-words: yogurt, lutein, riboflavin, packaging**

## 1. INTRODUÇÃO

Os carotenóides são pigmentos naturais conhecidos por sua atividade biológica e aplicação como corantes. São sintetizados somente por plantas e por microrganismos e, portanto a sua presença em animais é atribuída à ingestão de alimentos (Minguez-Mosquera et al. 2002). A luteína é um carotenóide que faz parte do grupo das xantofilas, e que se acumula na mácula, parte central da retina humana responsável pela acuidade visual e onde se concentra grande parte dos fotorreceptores. (Landrum et al., 1999). Fontes ricas em luteína incluem espinafre (11,9 mg/100g), brócolis (2,4 mg/100g) e couve (15,8 mg/100g) (Khachik et al., 1995).

Em humanos, acredita-se que a luteína apresenta duas grandes funções protetoras: (1) como filtro de luz azul, e (2) como inativador e sequestrador de espécies reativas de oxigênio foto-induzidas. (Alves-Rodrigues e Shao, 2004). A luz azul (de comprimento de onda ao redor de 450 nm) é a forma de luz visível de maior energia, e é conhecida por induzir o dano foto-oxidativo pela geração de espécies reativas de oxigênio. A luteína, com pico de absorção a 446 nm no espectro visível, filtra a luz azul evitando a formação de espécies reativas de oxigênio.

A este composto são atribuídas propriedades antioxidantes e diversas atividades biológicas contra doenças degenerativas. A luteína está associada principalmente com a diminuição e prevenção da ocorrência de catarata e degeneração macular relacionada à idade (DMRI), que é a principal causa de cegueira irreversível em idosos nos países do ocidente, atingindo 25% da população acima de 75 anos no Brasil (IOG, 2010; CBO, 2010). A ingestão de 6 mg ao dia de luteína é a dose recomendada para a diminuição de mais de 43% do risco de DMRI (Seddon et al., 1994).

Com a crescente valorização de alimentos industrializados funcionais e o aumento da preocupação com a saúde e bem-estar, a aplicação da luteína como ingrediente em bebidas e alimentos pode ser bastante conveniente e atrativa. Nessa busca por alimentos que trazem benefícios à saúde, os produtos lácteos se destacam e são os principais veículos para adição de substâncias funcionais.

Até o momento, poucos estudos sobre a adição de luteína em produtos lácteos foram realizados. Jones et al. (2005) estudaram a estabilidade da luteína durante a maturação de queijo Cheddar. As amostras tinham diferentes concentrações de luteína:

1, 3 e 6 mg / 28 g (porção de queijo). Não houve degradação de luteína durante as 24 semanas de maturação do queijo.

Aryana et al. (2006) verificaram a estabilidade da luteína adicionada ao iogurte de morango. Foram adicionadas concentrações de 0,5; 1,5; e 3,0 mg por 170 g de iogurte. Houve diminuição de cerca de 10% da concentração de luteína durante o período de estocagem refrigerada. Essa diminuição da luteína foi mais acentuada principalmente na quinta semana.

Em um estudo realizado com cream cheese, Tokusoglu (2008) adicionou 0,5; 0,75; 1,5 e 3,0 mg de luteína para cada porção de 170g. Os parâmetros analisados durante 6 semanas de estocagem refrigerada foram estabilidade da luteína, pH, sinérese, viscosidade, contagem microbiana e características sensoriais. O conteúdo de luteína se apresentou inalterado durante o período estudado.

Tanto a luteína como os produtos lácteos são sensíveis à ação da luz e oxigênio. Os produtos lácteos são sensíveis à luz devido à presença da riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>), caracterizada por ser um forte sensibilizador, capaz de absorver a energia luminosa e transferi-la para moléculas de oxigênio altamente reativas, desencadeando uma série de reações de oxidação nos componentes do leite (proteína, lipídeos e vitaminas) que resultam em perdas nutricionais e alterações sensoriais (descoloração e *off-flavors*), sendo assim um indicador de ocorrência de foto-oxidação em produtos lácteos (Borle et al., 2001).

A riboflavina (RBF) possui três faixas de absorção de luz: aproximadamente 250 380 e 450 nm, sendo esta a mais crítica, uma vez que se encontra na região de luz visível emitida por luz fluorescente presente em grande parte dos estabelecimentos comerciais (Alves e Jaime, 2006). A distribuição das formas reativas de oxigênio formadas pela sensibilização da riboflavina depende da disponibilidade de oxigênio, da concentração de riboflavina e da presença de outras substâncias oxidantes ou inativadoras (Choe et al, 2005).

A RBF é altamente fluorescente (com emissão máxima ao redor de 525 nm) assim como os produtos gerados da sua foto-degradação, lumicromo e lumiflavina, os quais apresentam emissão máxima na região de 444 a 479 nm e 516 a 522 nm respectivamente (Fox e Thayer, 1998). Uma das maneiras de avaliar a ocorrência de foto-oxidação em produtos lácteos é a determinação de riboflavina e seus produtos de

degradação através espectroscopia de fluorescência (Andersen et al. 2005, Becker et al., 2003; Wold et al., 2006; Zandomenighi, et al. (2007).

A embalagem pode prevenir diretamente o desenvolvimento de *off-flavors* causados pela foto-oxidação dos componentes dos produtos lácteos, protegendo contra ação de luz e oxigênio (Vassila et al, 2002). As embalagens plásticas têm sido utilizadas no lugar de garrafas de vidro e de cartonadas (Defosse, 2000). Entretanto todos os tipos de embalagens plásticas incluem transmissão de luz e permeabilidade ao oxigênio (Rysstad *et al*, 1998). Atualmente, a maioria dos iogurtes comerciais utiliza embalagens de polipropileno (PP), polietileno (PE) e poliestireno (PS).

Esse trabalho avaliou a influência da adição de luteína na estabilidade oxidativa do iogurte acondicionado em embalagens com diferentes permeabilidades ao oxigênio, na ausência e presença de luz. O teor de carotenóides totais, teor de riboflavina, oxigênio dissolvido na amostra e presente no *headspace* e a degradação da riboflavina foram acompanhados durante os 35 dias de estocagem refrigerada.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

Leite em pó desnatado Molico<sup>®</sup> (Nestlé, Araçatuba, SP - Brasil) foi comprado em supermercado da cidade de Campinas (SP - Brasil), sendo todo do mesmo lote (917946032) e em quantidade suficiente para desenvolver a pesquisa. A cultura láctea mista liofilizada de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* (YO-MIX 505 LYO 200<sup>®</sup>) foi fornecida pela Danisco (Cotia, SP, Brasil). A formulação de luteína 0,3% utilizada foi a Vegex Lutein WS<sup>®</sup> – corante natural de luteína para fins alimentícios, da Christian Hansen (Horsholm - Dinamarca). Além da luteína, a mistura continha ainda na sua composição água desmineralizada, amido modificado, óleo de girassol, maltodextrina, ácido ascórbico, tocoferóis naturais e benzoato de sódio. A água utilizada nos experimentos foi inicialmente bi-destilada e em seguida deionizada (Millipore). Os copos plásticos de polipropileno com e sem barreira utilizados para o envase dos iogurtes foram fornecidos pela Dixie Toga (Votorantim, SP - Brasil). Os iogurtes foram acondicionados sob incidência de luz fluorescente TL8<sup>®</sup> 15 w da OSRAM (Osasco, SP - Brasil).

## 2.2 Preparo dos iogurtes

Os iogurtes foram produzidos a partir de leite desnatado em pó Molico<sup>®</sup>, reconstituído a 10% de sólidos totais e cultura láctea mista liofilizada de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*. Metade do volume de leite foi adicionado de luteína, antes da inoculação da cultura láctea. O teor de luteína adicionado ao leite foi calculado para resultar em um equivalente a 1,5 mg de luteína/120 g de iogurte. O leite adicionado de cultura foi distribuído em copos plásticos de 210 mL que foram selados por termo indução. A quantidade de iogurte adicionada nos copos foi de 120 g, resultando em um volume de *headspace* de aproximadamente 30 mL. Foram utilizados dois tipos de embalagens: de Polipropileno (PP): (a) PPcomum, com baixa barreira ao oxigênio (permeabilidade de 0,39 cm<sup>3</sup> oxigênio/embalagem/dia) e opacidade de 85,36%; (b) Polipropileno com Etileno Vinil Álcool (PPcoex) com barreira média ao oxigênio (permeabilidade de 0,09 cm<sup>3</sup> oxigênio/embalagem/dia) e opacidade de 84m,03%. A fermentação do leite, realizada em estufa Marconi modelo MA 415/S<sup>®</sup> (Piracicaba – SP, Brasil) a 45°C, foi interrompida através de resfriamento dos copos em banho de gelo, quando o pH 4,8 foi atingido. Os copos de iogurte com e sem luteína, acondicionados nos dois tipos de embalagem foram igualmente distribuídos em estufas BOD Marconi modelo MA 415<sup>®</sup> (Piracicaba – SP, Brasil) a 5°C, e armazenados durante 35 dias, na presença e ausência de luz fluorescente (aproximadamente 1.000 lux). As amostras armazenadas sob luz receberam radiação na parte superior, semelhantemente às condições encontradas em supermercados. Em cada dia de análise, as amostras foram retiradas aleatoriamente e em seu lugar foi colocadas embalagens com as mesmas características e igualmente seladas.

A determinação da composição do iogurte foi realizada após 2 dias de fabricação. Análise de teor de carotenóides totais, teor de riboflavina, oxigênio dissolvido na amostra e presente no *headspace* e a degradação da riboflavina por espectrofluorimetria foram realizadas aos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de estocagem refrigerado. As determinações de RBF foram feitas em duplicata e os teores de carotenóides totais, oxigênio dissolvido, oxigênio presente no *headspace* foram realizadas em triplicata. Antes de cada análise, o iogurte foi homogeneizado no próprio copo. Todo o procedimento de preparação do iogurte e as análises subsequentes foram repetidos novamente, resultando em duplicata de processamento.

### **2.3 Composição dos iogurtes**

As análises de composição do iogurte foram realizadas em triplicata. O pH foi determinado por meio de método potenciométrico, em potenciômetro da marca Digimed modelo DM22<sup>®</sup> (São Paulo, SP - Brasil), conforme AOAC (1995). A determinação de acidez foi realizada em triplicata, segundo AOAC (1995). Para os iogurtes sem adição de luteína, determinou-se a acidez por titulação com NaOH 0,01N, e para os iogurtes adicionados de luteína, a acidez foi determinada por meio de titulação com NaOH 0,01N com auxílio de potenciômetro, com agitação constante até pH 8,0 - 8,25, sendo os resultados expressos em graus Dornic.

O teor de extrato seco total foi determinado gravimetricamente, em estufa sob circulação forçada de ar, a 100 °C durante 24 horas, de acordo com AOAC (1995). A determinação do teor de gordura foi realizada segundo método Mojonnier, descrito em AOAC (1995), tendo sido realizadas três extrações com álcool etílico, éter etílico e éter de petróleo. A fase orgânica foi coletada em placas de vidro, as quais permaneceram em placa aquecida até total evaporação dos solventes, sendo posteriormente levadas à estufa à 105 °C durante 50 minutos. Os teores de nitrogênio e proteína foram determinados pelo método de Kjeldahl, segundo AOAC (1995) e Barbano (1991). A porcentagem de proteína total foi obtida pela multiplicação da porcentagem de nitrogênio por 6,38.

### **2.4 Análises realizadas durante a estocagem dos iogurtes**

#### ***2.4.1 Teor de oxigênio***

Realizou-se a medida de oxigênio presente no *headspace* das embalagens antes de serem abertas, em equipamento Mocon Pac Check model 650 Dual Headspace Analyzer<sup>®</sup> (Minneapolis, MN, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Um septo foi utilizado para minimizar a saída de gás durante as medições. A determinação de oxigênio dissolvido nas amostras, em oxímetro Mettler Toledo MO 128 Dissolved Oxygen Meter<sup>®</sup> (Schwerzenbach – Switzerland), foi realizada por meio da imersão do eletrodo diretamente no iogurte. Foram realizadas três medições no mesmo copo, em posições diferentes.

#### ***2.4.2 Carotenóides totais***

Para os iogurtes com adição de corante, 1,0 ± 0,1 g de iogurte foi pesado em tubos de vidro e adicionados de 4 mL de tetrahydrofurano (THF). A extração foi

realizada por meio de agitação em vortex durante 1 minuto, seguida de centrifugação a 1154 g/ 5 minutos a 20 °C, sendo o sobrenadante transferido para um Erlenmeyer de 50 mL. O processo de extração e centrifugação foi repetido 5 vezes até extração exaustiva dos carotenóides presentes no iogurte. Os extratos foram combinados e transferidos para um funil de separação de 500 mL, contendo a mistura de solventes éter etílico:éter de petróleo (2:1, v/v) para a etapa de partição. O extrato foi lavado 10 vezes com água destilada (aproximadamente 5 L), recolhido em Erlenmeyer de 125 mL, e adicionado de sulfato de sódio anidro para retirada de água residual da etapa de lavagem. Em seguida, o extrato foi transferido para balão de fundo redondo e o solvente foi completamente evaporado em evaporador rotatório ( $T \leq 38$  °C). O extrato seco foi então redissolvido em etanol e o volume foi aferido em balão volumétrico de 10 mL. A absorvância do extrato a 445 nm foi medida em espectrofotômetro UV-visível Agilent 8453<sup>®</sup> (Santa Clara, EUA), e a concentração dos carotenóides totais foi calculada como luteína de acordo com a lei de Lambert-Beer (equação. 1).

$$C(\mu\text{g/mL}) = \frac{A \times 10^4}{E_{1\text{cm}}^{1\%}} \quad (1)$$

Onde C é a concentração de carotenóides totais expressos como luteína; A é a absorvância a 445 nm e  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  é a absorvância da luteína a 445 nm (2550 em etanol).

A determinação do teor de carotenóides totais dos iogurtes sem adição de corante (controle) foi realizada da mesma maneira. Entretanto, a quantidade inicial de amostra pesada foi de  $4,0\text{g} \pm 0,1 \text{ g}$  e o extrato seco foi redissolvido em 1 mL de etanol. A análise foi realizada para avaliar o teor de carotenóides totais do iogurte, provindos naturalmente do leite e eventualmente presentes no iogurte. Os resultados mostraram a quase ausência de carotenóides no iogurte, com valores abaixo do limite de detecção do método ( $< 0,05 \mu\text{g/g}$ ), o que era esperado por se tratar de iogurte desnatado. Portanto, os resultados de carotenóides totais obtidos para os iogurtes adicionados de luteína foram expressos como  $\mu\text{g}$  luteína/g iogurte.

### **2.4.3 Determinação de riboflavina**

A determinação de RBF em iogurte foi feita por titulação espectrofluorimétrica da RBF por solução de RBPO, baseado no método descrito por Zandomenighi et al. (2007), otimizado e validado por Domingos et al (resultados ainda não publicados; ver capítulo 2). *Riboflavin binding protein* (RBPO), (forma apo, Sigma R8628) foram adquiridas pela *Sigma Chemical Company* (St. Louis, MO, USA). O espectrofotômetro Cary Eclipse® (Varian, Palo Alto, CA, USA) foi equipado com acessório (Varian Accessory Solid Sample, Melbourne, Australia) capaz de regular a inclinação do ângulo de posicionamento da amostra para permitir medidas em *front-face*, a fim de minimizar a radiação que reflete e se espalha durante a incidência da luz na amostra. O melhor ângulo foi 27° em relação à luz incidente.

Os espectros foram medidos em cubetas de quartzo (1 × 1 cm) com massa medida em balança AE 200® (Mettler Toledo, Zurique, Suíça) de 0,3 g à qual foram adicionados 400 µL de água, para facilitar a homogeneização da amostra adicionada de solução de RBPO durante a titulação. As fendas de excitação e emissão foram iguais (10 nm), o tempo de integração foi 0,5 s e o incremento no comprimento de onda do espectro de varredura foi de 1 nm. A emissão foi medida entre 480 nm a 700 nm, com excitação da amostra a 450 nm. Os experimentos de titulação da RBF foram efetuados pela adição de alíquotas de 10 a 15 µL de RBPO na amostra a fim de suprimir a fluorescência gradualmente. Após cada adição, a cubeta foi agitada vagarosamente em vortex durante 30 segundos, e em seguida se mediu a emissão. Cerca de 15 a 20 adições foram necessárias em cada experimento. As titulações realizadas nos iogurtes durante o período de estocagem foram feitas em duplicata.

O método espectrofluorimétrico para a quantificação de RBF em iogurte foi otimizado e validado para iogurte de acordo com as recomendações da IUPAC (Thompson, 1999, 2002) e da ICH – International Conference of Harmonization (1996) por Domingos et al. (2010) (resultados não publicados), apresentando uma exatidão de (99 ± 2) %. Os experimentos de robustez mostraram que o método é efetivo mesmo quando o produto é analisado após 30 dias de estocagem.

### **2.4.4 Avaliação da degradação de RBF**

Para ilustrar a foto-degradação da RBF nos iogurtes, medidas espectrofluorimétricas foram realizadas no espectrofotômetro Cary Eclipse® (Varian,

Palo Alto, CA, USA). As condições utilizadas foram as mesmas descritas para a determinação da riboflavina, com exceção da emissão que foi medida entre 400 nm e 700 nm, com excitação a 380 nm.

## **2.5 Planejamento experimental e avaliação estatística dos resultados**

Para avaliação da evolução dos teores de riboflavina, oxigênio dissolvido e oxigênio presente no *headspace* com o tempo de estocagem refrigerada, foi adotado um delineamento do tipo *split-split-split-plot*. O fator estudado foi a adição de corante de luteína no iogurte, sendo o tipo de embalagem e tipo de acondicionamento sub-parcelas do corante luteína, e o tempo de estocagem, uma sub-parcela de embalagem e tipo de acondicionamento, como ilustrado na Figura 1. Os ensaios foram realizados em 2 blocos. As diferenças entre os tratamentos das amostras e os tempos de estocagem, e as interações entre elas, obtidas nas avaliações de riboflavina, carotenóides totais, oxigênio dissolvido e oxigênio presente no *headspace* foram avaliadas por ANOVA. Os fatores e/ou interações que apresentaram valores de  $p \leq 0,005$  foram considerados significativamente diferentes. As análises dos resultados (graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades) estão apresentadas nas Tabelas, sendo os valores significativamente diferentes destacados por um (\*).

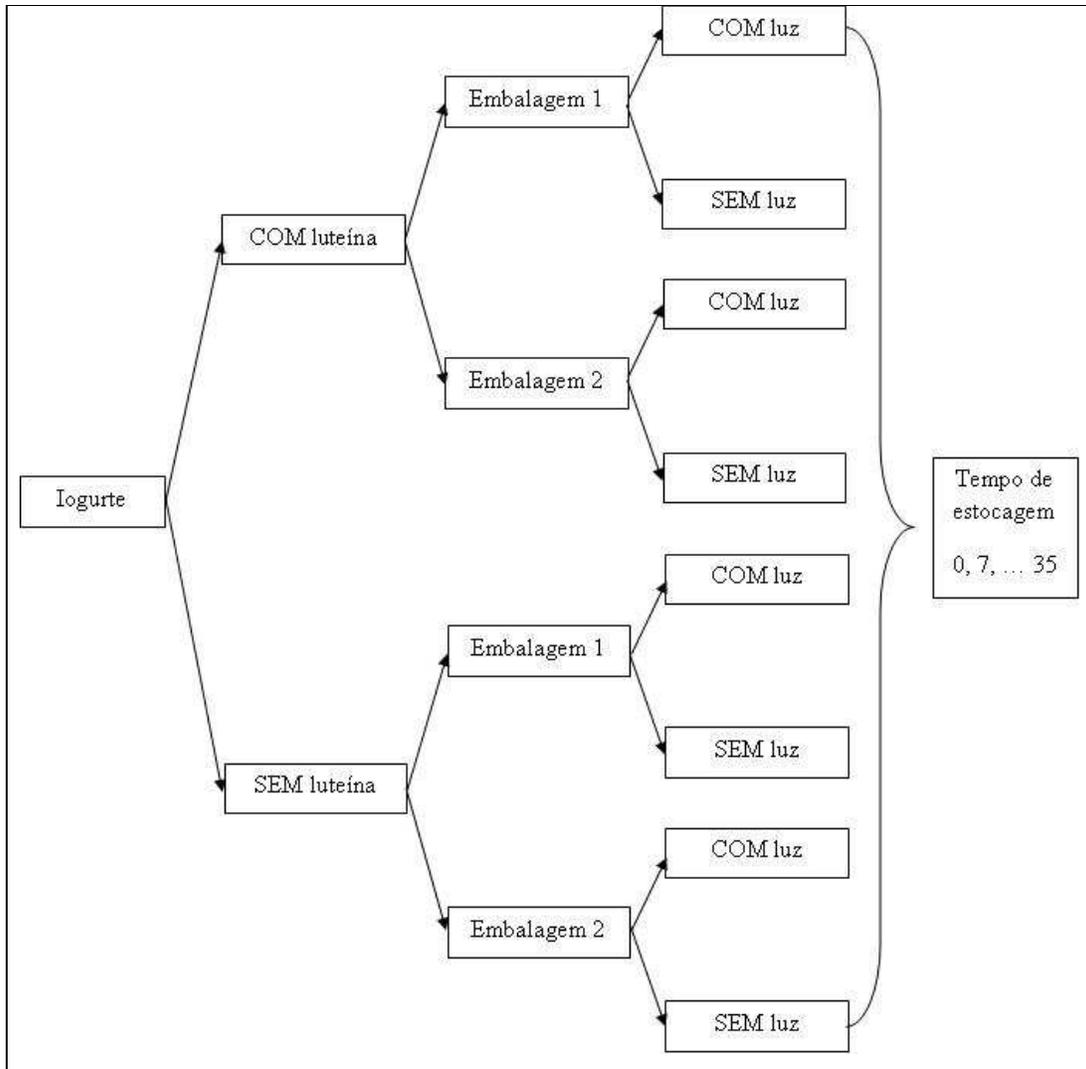


Figura 1. Planejamento experimental: delimitação tipo *split-split-split-plot*.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Composição do iogurte

A composição média dos iogurtes produzidos é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição média dos iogurtes com e sem adição de luteína.

Composição	Sem luteína	Com luteína
pH	4,43 ± 0,11	4,55 ± 0,07
acidez (%ácido láctico)	0,80 ± 0,04	0,71 ± 0,06
Proteína total (%)	3,6 ± 0,34	3,8 ± 0,20
EST (%)	9,4 ± 0,18	9,47 ± 0,06
Gordura (%)	0,06 ± 0,01	0,1 ± 0,01

O Regulamento de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados (MAPA, 2000) preconiza que o iogurte desnatado deve apresentar no máximo 0,5% de gordura, acidez de 0,6 a 2,0 gramas de ácido láctico por 100 gramas de produto, e proteína total de no mínimo 2,9%. A Tabela 1 mostra que os iogurtes produzidos apresentam uma composição típica e que se encontram dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente.

#### 3.2 Influência da luz e da embalagem na estabilidade do corante luteína adicionado ao iogurte

A Tabela 2 apresenta o teor de carotenóides totais nos iogurtes adicionados de corante luteína acondicionados em diferentes embalagens e na presença e ausência de luz.

Tabela 2. Teor de carotenóides totais em iogurtes adicionados de corante luteína.

Carotenóides totais ( $\mu\text{g/g}$ )				
Com luteína				
Dias	PPcoex		PPcomum	
	Com Luz	Sem Luz	Com Luz	Sem Luz
0	$10,67 \pm 0,009$	$10,67 \pm 0,01$	$10,71 \pm 0,36$	$10,75 \pm 0,42$
7	$10,96 \pm 0,28$	$10,84 \pm 0,19$	$10,92 \pm 0,03$	$10,48 \pm 0,14$
14	$11,07 \pm 0,43$	$10,35 \pm 0,36$	$11,28 \pm 0,42$	$10,72 \pm 0,36$
21	$11,24 \pm 0,28$	$10,74 \pm 0,12$	$11,19 \pm 0,32$	$10,71 \pm 0,19$
28	$11,19 \pm 0,45$	$10,80 \pm 0,09$	$10,81 \pm 0,41$	$10,74 \pm 0,15$
35	$10,98 \pm 0,10$	$10,61 \pm 0,23$	$11,53 \pm 0,13$	$10,71 \pm 0,075$

Os resultados mostram que os valores da luteína se mantiveram praticamente constantes durante todo o período de estocagem refrigerado, independente da embalagem utilizada, na presença e ausência de luz.

A Figura 2 mostra o comportamento da luteína na presença e ausência de luz, deixando evidente que nas duas situações, a luteína se manteve estável com o tempo de estocagem do iogurte.

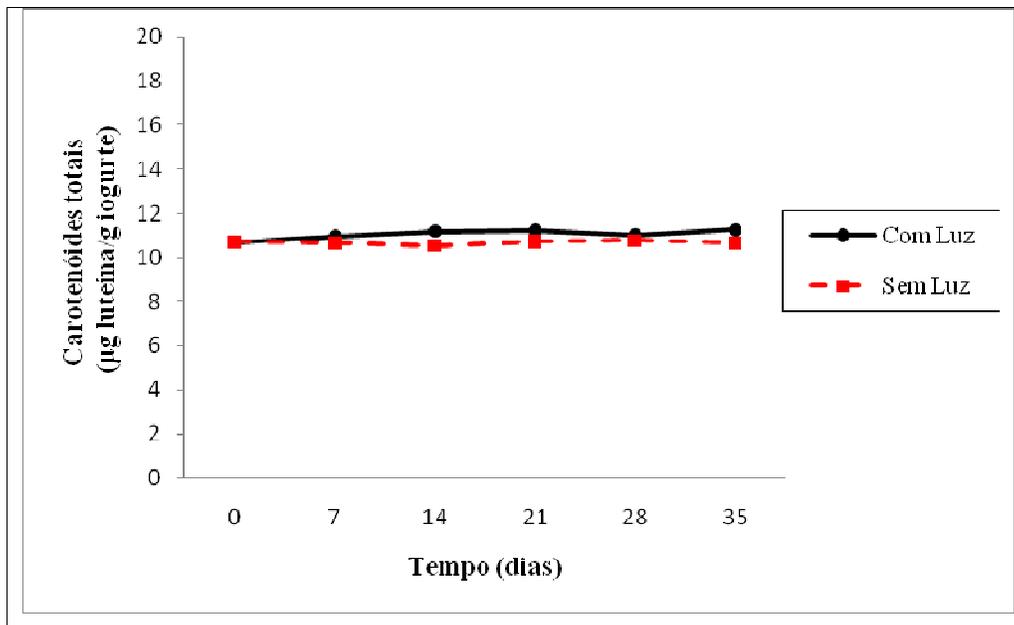


Figura 2. Efeito da luz no teor de luteína dos iogurtes com o tempo de estocagem.

Os resultados mostram que o teor de luteína dos iogurtes permaneceu constante tanto na presença como ausência da luz (aproximadamente 10 µg por grama de iogurte) indicando que a luteína adicionada ao iogurte não foi degradada pela ação da luz. Outros autores (Jones et al., 2005; 2006; Tokusoglu, 2008) também observaram que a luteína se manteve estável durante a estocagem e não foi degradada quando adicionada a produtos lácteos. Segundo Mercadante (2008), a presença de macromoléculas oferece certa fotoproteção aos carotenóides em alimentos, através da complexação destas com os carotenóides ou podem agir como filtro, o que reduz a incidência de luz, que poderia foto-degradar os carotenóides.

### 3.3. Influência da luz e da embalagem na estabilidade do teor de riboflavina dos iogurtes

A Tabela 3 indica os valores de riboflavina nos iogurtes acondicionados em diferentes embalagens e na presença e ausência de luz.

Tabela 3. Valores de RBF em iogurtes com e sem adição de corante luteína.

RBF (mg/100g)								
Dias	Sem luteína				Com luteína			
	PPcoex		PPcomum		PPcoex		PPcomum	
	Com luz	Sem luz	Com luz	Sem luz	Com luz	Sem luz	Com luz	Sem luz
0	0,23 ± 0,03	0,23 ± 0,03	0,23 ± 0,0001	0,27±0,06	0,24 ± 0,02	0,23 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,22 ± 0,007
7	0,20 ± 0,01	0,24 ± 0,003	0,22 ± 0,005	0,25 ± 0,001	0,24 ± 0,002	0,23 ± 0,01	0,26 ± 0,03	0,23 ± 0,002
14	0,19 ± 0,01	0,23 ± 0,005	0,19 ± 0,0004	0,25 ± 0,002	0,23 ± 0,0007	0,22 ± 0,002	0,22 ± 0,001	0,24 ± 0,006
21	0,16 ± 0,02	0,25 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,24 ± 0,003	0,24 ± 0,001	0,24 ± 0,001	0,24 ± 0,006	0,24 ± 0,002
28	0,12 ± 0,001	0,24 ± 0,008	0,13 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,22 ± 0,007	0,24 ± 0,005	0,23 ± 0,007	0,23 ± 0,02
35	0,11 ± 0,03	0,24 ± 0,005	0,095 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,22 ± 0,002	0,24 ± 0,005	0,21 ± 0,02	0,23 ± 0,01

A partir da análise da Tabela 3, é possível observar que os teores de riboflavina diminuíram nos iogurtes sem adição de corante e que ficaram expostos à luz, tanto para os iogurtes em embalagem de PPcomum quando para de PPcoex. Entretanto, para os iogurtes sem corante acondicionados no escuro e para os iogurtes adicionados de corante, os teores de RBF permaneceram praticamente constantes.

A Tabela 4 apresenta a avaliação estatística do efeito da adição de luteína, da exposição à luz, do tipo de embalagem e do tempo de estocagem no teor de riboflavina dos iogurtes.

Tabela 4. Quadrados médios e probabilidades para riboflavina dos iogurtes durante o tempo de estocagem.

Fatores	Riboflavina		
	GL	QM	P
Tempo	4	0,00266641	0,0001*
Luteína*tempo	4	0,00202937	0,0009*
Embalagem*tempo	4	0,00017052	0,7521
Luz*tempo	4	0,00223784	0,0004*
Luteína	1	0,00775569	0,1016
Embalagem	1	0,00068472	0,3700
Luteína*embalagem	1	0,00029294	0,5014
Luz	1	0,01672010	0,0005*
Luteína*luz	1	0,02200305	0,0003*
Embalagem*luz	1	0,00000191	0,9168

GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; p = probabilidade

Como pode ser visto na Tabela 4, o tipo de embalagem não influenciou o teor de RBF dos iogurtes com ou sem luteína, na presença ou ausência de luz, durante o tempo de estocagem refrigerado ( $p > 0,05$ ). As embalagens apresentavam diferenças na barreira ao oxigênio, o que significou que a concentração de oxigênio não teve nenhum efeito na degradação da RBF. Mesmo apresentando diferentes barreiras ao oxigênio, a concentração de oxigênio no iogurte não surtiu efeito na degradação da RBF.

O teor de oxigênio no *headspace* só variou significativamente ( $p < 0,05$ ) com o tempo de estocagem. Após a fabricação do iogurte, o teor de oxigênio no *headspace*, que era em média 15,8 %, diminuiu para cerca de 11 % de  $O_2$  após 7 dias de estocagem e permanecendo praticamente constante com o tempo. Houve pequenas diferenças no teor de oxigênio dissolvido (1,7 a 1,2 ppm  $O_2$ ) em função do tempo, luz e embalagem com o tempo. Entretanto, apesar dessas diferenças serem estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), a maior ou menor concentração de oxigênio não afetou a degradação da riboflavina.

O tempo de estocagem e a luz exerceram influência significativa sobre o teor de riboflavina. Entretanto, as interações tempo\*luteína, tempo\*luz e luteína\*luz também foram significativas. Quando a interação de duas variáveis exerce influência sobre o parâmetro analisado, deve-se analisar o efeito da interação, e não das variáveis independentemente. Assim apenas as interações foram analisadas. As Figuras 3, 4 e 5 indicam o efeito da interação da luz com o tempo, da luteína com a luz e da luteína com o tempo, respectivamente no teor de RBF dos iogurtes.

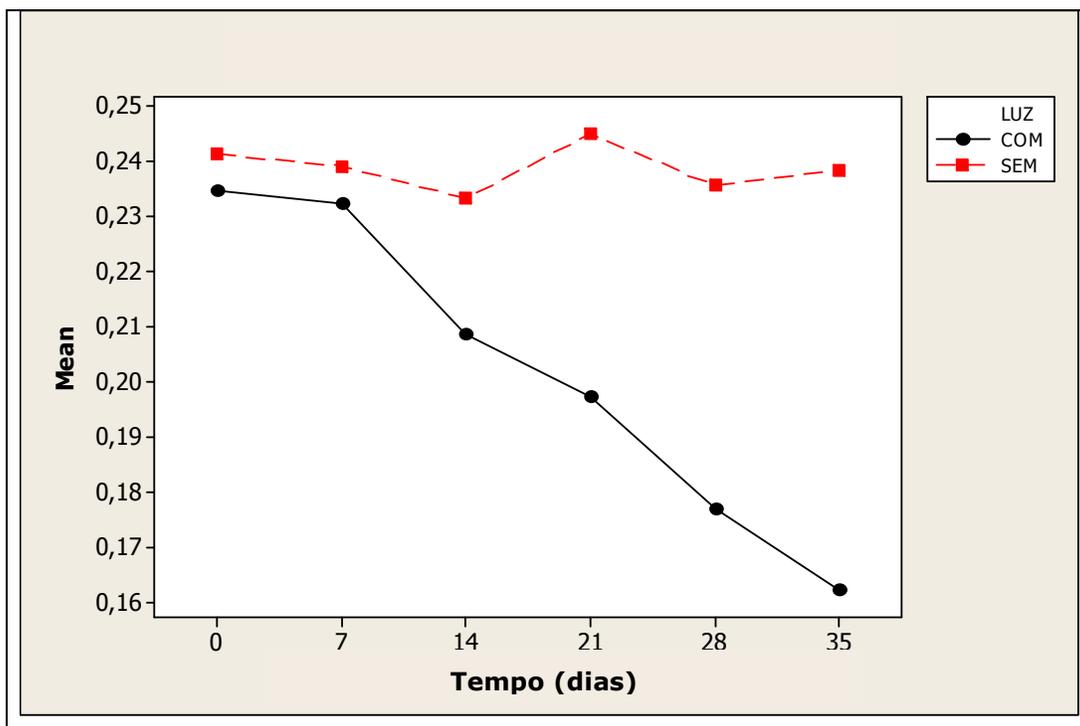


Figura 3. Interação dos fatores luz e tempo sobre os teores de RBF.

A Figura 3 mostra o efeito da luz e do tempo no teor de RBF. As amostras que não ficaram expostas à luz apresentaram teor de RBF praticamente constante durante o período de estocagem (aproximadamente 0,24 mg de RBF por 100 g de iogurte). Entretanto, os iogurtes expostos à luz sofreram queda nos teores de RBF durante a estocagem (de aproximadamente 0,24 mg para 0,17 mg de RBF por 100g de iogurte), mostrando a ocorrência de foto-oxidação da riboflavina, e que ela aumenta com o tempo de exposição à luz.

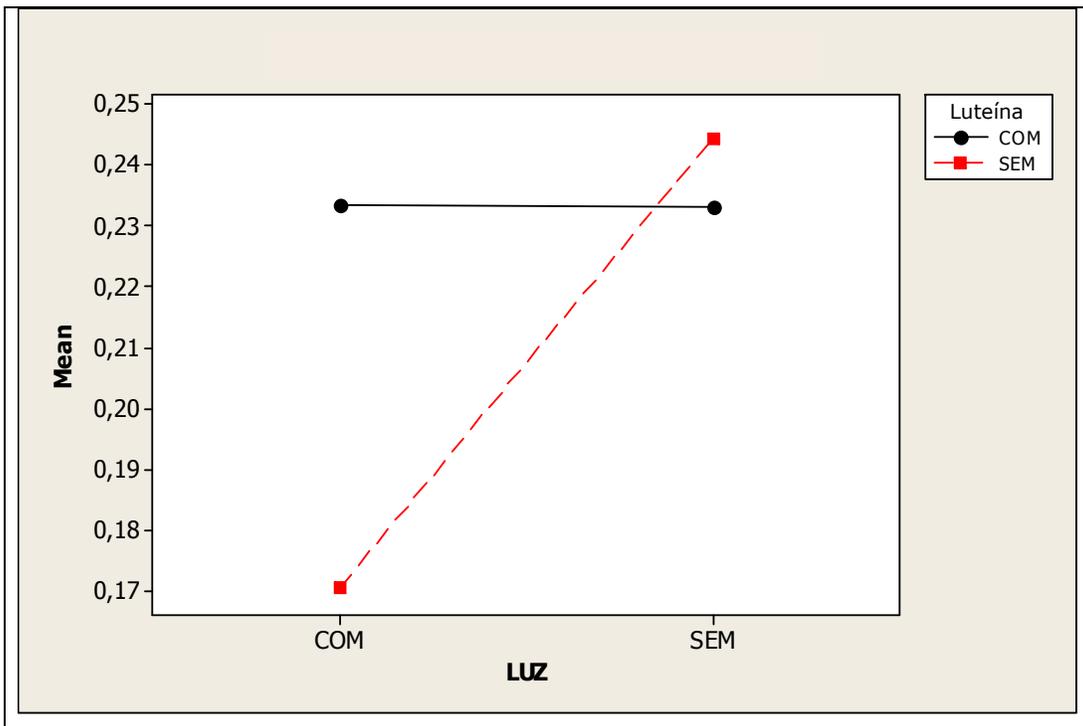


Figura. 4. Efeito da interação luz e luteína sobre o teor de RBF. Efeito da interação luz e luteína sobre o teor de RBF.

Os iogurtes adicionados de luteína não apresentaram variação no conteúdo de RBF, independente da presença ou ausência de luz, permanecendo entre 0,23 e 0,24 mg de RBF por 100g de iogurte (Figura 4). Os iogurtes sem adição de luteína mostraram um comportamento diferente. Quando expostos à luz, o teor de RBF diminuiu sensivelmente (aproximadamente 0,17 mg de RBF por 100 g de iogurte) em relação aos que ficaram no escuro (0,25 mg de RBF por 100 g), mostrando que a luteína protegeu a riboflavina da foto-oxidação.

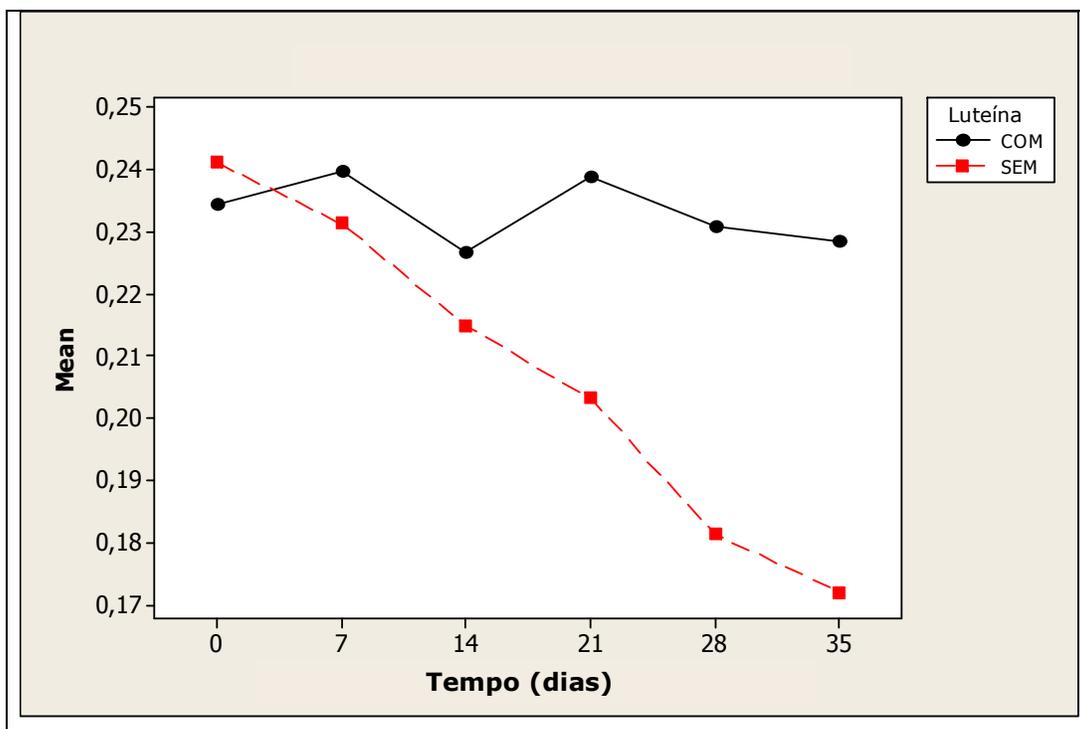


Figura 5. Interação dos fatores tempo e luteína sobre o teor de RBF.

A Figura 5 mostra que os iogurtes adicionados de luteína apresentaram pouca oscilação no teor de RBF durante o período de estocagem, permanecendo entre 0,23 e 0,24 mg de RBF por 100 g de iogurte. Quando não houve adição da luteína, os iogurtes apresentaram uma diminuição acentuada nos teores de RBF com o aumento do tempo de estocagem, de 0,24 mg para 0,17 mg de RBF por 100 g de iogurte. Esses resultados mostram que, na ausência de luteína, a degradação da riboflavina se acentua com o tempo, o que significa que ela foi sensibilizada pela luz. Ao atuar como sensibilizador, a riboflavina promove a foto-oxidação de proteínas e gordura, diminuindo a qualidade sensorial do iogurte com o tempo. Quando a luteína estava presente, o teor de RBF se manteve praticamente inalterado durante os 35 dias de estocagem refrigerada. O tempo de vida de prateleira de um iogurte comercial é geralmente de 30 dias. Isso significa que um iogurte adicionado de luteína, além de poder ser um produto funcional com benefícios à saúde, mantém seu valor nutricional e, provavelmente, a qualidade sensorial.

### 3.3.1 Degradação da riboflavina

A Figura 6 ilustra que durante o período de estocagem refrigerada sob incidência de luz, há redução da fluorescência ao redor de 525 nm, indicando degradação da RBF. A degradação da RBF resulta na formação de compostos fluorescentes como o lumicromo e a lumiflavina os quais emitem na região de 444 a 479 nm e a 516 a 522 respectivamente. A análise do espectro fluorescente da Figura 6 indica um aumento da fluorescência na região de 414 a 490 nm, que pode ser decorrência da formação de lumicromo. É possível observar que há aumento da formação deste composto com o aumento do tempo de estocagem do iogurte. Um perfil semelhante de redução de fluorescência da RBF foi observado por Wold *et al.* (2002, 2006) e Andersen *et al.* (2005) durante a avaliação de foto-oxidação em produtos lácteos.

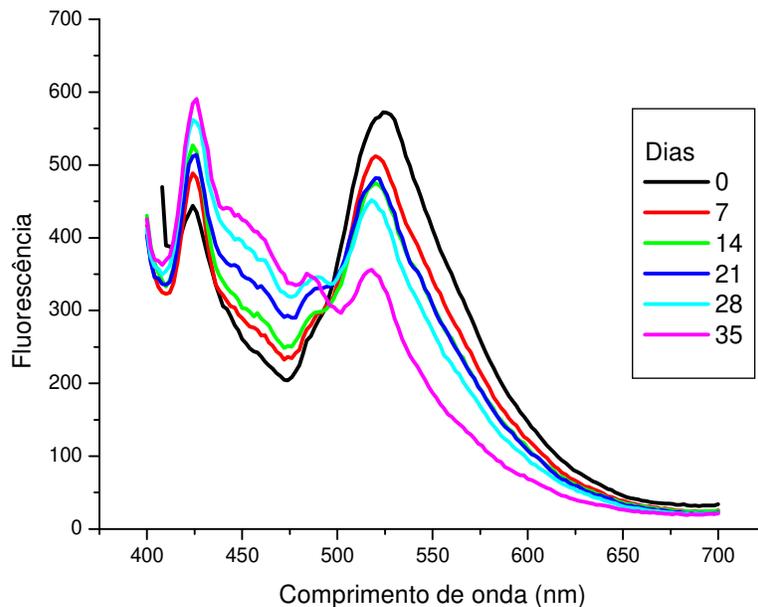


Figura 6. Espectro fluorescente dos iogurtes sem adição de corante luteína após exposição à luz durante 35 dias.

#### **4. CONCLUSÃO**

Iogurtes adicionados de luteína apresentaram estabilidade oxidativa. Quando expostos à luz, não houve diminuição do teor de riboflavina durante os 35 dias de estocagem refrigerada, como ocorreu nos iogurtes sem luteína que apresentaram degradação da riboflavina e formação de compostos de oxidação. As diferentes permeabilidades ao oxigênio das embalagens utilizadas não influenciaram a foto-oxidação do iogurte, o que permite o uso de embalagens mais baratas, sem barreira ao oxigênio. O teor de luteína permaneceu praticamente inalterado com o tempo de exposição à luz, independente da embalagem utilizada. Isso significa que toda a luteína suplementada ao iogurte estará disponível no produto consumido durante o tempo de vida de prateleira que é geralmente de 4 semanas.

#### **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Alves-Rodrigues, A., Shao, A. 2004. The science behind lutein. *Toxicology Letters*. 150: 57 – 83.
- Alves, R., Jaime, S. B. M. 2006. Embalagem para requeijão cremoso e outros tipos de requeijão. In: Van Dender, F. G. A. *Requeijão cremoso e outros queijos fudidos: tecnologia de fabricação, controle de processo e aspectos de mercado*. São Paulo, Brasil.
- Andersen, C. M., Vishart, M., Holm, V. K. 2005. Application of fluorescence spectroscopy in the evaluation of light-induced oxidation in cheese. *J. Agric. Food Chem.* 53: 9985 – 9992.
- Aryana, K. J., Barnes, H. T., Emmick, T. K., McGrew, P., Moser, B. 2006. Lutein is stable in strawberry yogurt and does not affect its characteristics. *J. Food Sci.* 71: 6: S467 –S472.
- AOAC.1995. *Official Methods of Analysis*. Vol II. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Barbano, D.M., Lynch, J.M., Fleming, J.R. 1991. Direct and indirect determination of true protein content of milk by Kjeldahl analysis: collaborative study. *JAOAC.* 74:281.

- Becker, E. M., Christensen, J., Frederiksen, C. S., Haugaard, V. K. 2003. Front-face fluorescence spectroscopy and chemometrics in analysis of yogurt: Rapid analysis of riboflavin. *J. Dairy Sci.* 86: 2508 – 2515.
- Borle F., Sieber, R., BOSSET, J. O. 2001. Photo-oxidation and photoprotection of foods, with particular reference to dairy products: An update, of a review article (1993-2000). *Sciences des Aliments.* 21: 571-590.
- Choe, E., Huang, R., Min, D. B. 2005. Chemical reactions and stability of riboflavin in foods. *J. Food Sci.* 70: 28 – 36.
- Conselho Brasileiro de Oftalmologia. 2010. Degeneração macular relacionada a idade (DMRI). [http://www.cbo.com.br/site/index.php?mostra=7demaio\\_dmri](http://www.cbo.com.br/site/index.php?mostra=7demaio_dmri). Acesso em Jun, 28, 2010.
- Defosse, M. 2000. Novel milk bottle designs keep blow molders on top. *Mod. Plast. Int.* v.10: 114-116.
- Fox, J. B.; Thayer, D. W. 1998. Radical oxidation of riboflavin. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 68: 174-180.
- Instituto de Olhos de Guarapuava. 2010. Degeneração macular relacionada a idade (DMRI). [http://www.cbo.com.br/site/index.php?mostra=7demaio\\_dmri](http://www.cbo.com.br/site/index.php?mostra=7demaio_dmri). Acesso em Jun, 28, 2010.
- International Conference on Harmonisation (ICH). 1996. Topic Q2B, Validation of Analytical Procedures: Methodology, Proceedings of the Commission of the European Communities.
- Jones, S. T., Aryana, K. J. Lasso, J. N. 2005. Storage and stability of lutein during ripening of cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 88: 1661 – 1670.
- Khachik, F., Beecher, G.R., Smith, J.C., Jr. 1995. Lutein, lycopene, and their oxidative metabolites in chemoprevention of cancer, *J. Cell. Biochem.*, 22: 236–246.
- Landrum, J. T., Bone, R. A., Chen, Y., Herrero, C., Llerena, C. M., Twarowska, E. 1999. Carotenoids in human retina. *Pure Appl. Chem.* 71: 2237 – 2244.
- Mercadante, A. M. 2008. Carotenoids in foods: sources and stability during processing and storage. In. SOCACIU, C. **Food Colorants – Chemical and Functional Properties.**
- Minguez-Mosquera, M. I.; Hornero-Mendez, D; Perez-Galvez, A. 2002. Carotenoids and provitamin A in functional foods. Pages 101 – 157 in W. J. Hurst. *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals.* Boca Raton, New York, Washington.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2000. RESOLUÇÃO Nº 5, DE 13 DE NOVEMBRO DE 2000. Padrão de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Disponível em: < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis->

consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=3285 >. Acesso em: 27 jul 2010.

- Rysstad, G., Ebbesey, A., Eggestad, J. 1998. Sensory and chemical quality of UHT milk stored in paperboard cartons with different oxygen and light barriers. *Food Additives and Contaminants*. 15: 112-122.
- Saint-Eve, A., Lévy, C., Moigne, M. LE., Ducruet, V., Souchon, I. Quality changes in yogurt during storage packaging materials. *Food Chem*. 110: 285 – 293.
- Seddon, J. M.; Ajani, U. A.; Sperduto, R. D.; *et al.*, 1994 Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group. *JAMA*. v. 272, p. 1413 – 1320.
- Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Fajgeld, Willetts, A. P.; Wood, R. 1999. Harmonized Guidelines For the Use of Recovery Information in Analytical Measurement (IUPAC Technical Report) *Pure Appl. Chem*. 71, 2, 337–348.
- Thompson, M., Ellison, S. L. R., Wood, R. 2002. Harmonized Guidelines For Single Laboratory Validation Of Methods Of Analysis - (IUPAC Technical Report) *Pure Appl. Chem*. 74, 5, 835–855.
- Tokusoglu, Ö. 2008. Lutein fortified nutraceutical cream cheese: Psychochemical, microbiological and sensory quality characteristics of the new developed dairy product. Books of Abstracts IFT.
- Vassila, E., Badeka, A., Kondyli, E., Savvaidis, I., Kontominas, M. G. 2002. Chemical and microbiological changes in fluid milk as affected by packagins conditions. *Int. Dairy J.*12: 715-722.
- Wold, J. P., Jørgensen, K., Lundby, F. 2002. Nondestructive measurement of light-induced oxidation in dairy products by fluorescence spectroscopy and imaging. *J. Dairy Sci*. 85: 1693-1704.
- Wold, J. P., Veberg, A., Lundby, F., Nilsen, A. N., Moan, J. 2006. Influence of storage time and color of light on photooxidation in cheese: A study based on sensory analysis and fluorescence spectroscopy. *Int. Dairy J*. 16: 1218 – 1226.
- Zandomeneghi, M., Carbonaro, L., Zandomeneghi, G. 2007 Biochemical fluorimetric method for the determination of riboflavin in milk. *J. Agric. Food Chem*. 55: 5990- 5994.

## CONCLUSÃO GERAL

Um método fluorimétrico, aliado a técnica de *front face*, para determinação de RBF em iogurte foi otimizado e validado. A validação mostrou que o método é seletivo, linear, robusto, preciso e exato, e totalmente aplicável para determinação de RBF em iogurte. Além disso, o uso da técnica de *front-face* dispensou as etapas morosas e cansativas de preparação e purificação de amostra, como descrito no método oficial da AOAC (2006).

Iogurtes adicionados de luteína apresentaram estabilidade oxidativa. Quando expostos à luz, não houve diminuição do teor de riboflavina durante os 35 dias de estocagem refrigerada, como ocorreu nos iogurtes sem luteína que apresentaram degradação da riboflavina. As diferentes permeabilidades ao oxigênio das embalagens utilizadas não influenciaram a fotoxidação do iogurte, o que permite o uso de embalagens mais baratas, sem barreira ao oxigênio. O teor de luteína permaneceu praticamente inalterado com o tempo de exposição à luz, independente da embalagem utilizada. Isso significa que toda a luteína suplementada ao iogurte estará disponível no produto consumido durante o tempo de vida de prateleira que é geralmente de 4 semanas.