

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

**ESTABILIDADE OXIDATIVA DE QUEIJO PRATO
ADICIONADO DE LUTEINA**

Diogo Maus

Bacharel em Química de Alimentos

Walkiria Hanada Viotto

Orientadora

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

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M448e Maus, Diogo
Estabilidade oxidativa de queijo prato adicionada de luteína /
Diogo Maus. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Walkiria Hanada Viotto
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Queijo prato. 2. Luteína. 3. Embalagem. 4. Estabilidade oxidativa. I. Viotto, Walkiria Hanada. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Oxidative stability of cheese prato added with lutein

Palavras-chave em inglês (Keywords): Cheese Prato, Lutein, Packaging, Oxidative stability

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Walkiria Hanada Viotto

Adriana Zerlotti Mercadante

Roseli Aparecida Ferrari

Data de defesa: 20/04/2011

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto
(Orientadora)**

**Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
(Membro)**

**Dra. Leila Maria Spadoti
(Membro)**

**Dra. Roseli Aparecida Ferrari
(Membro)**

**Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
(Membro)**

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida em __/__/__ por Diogo Maus aprovado pela comissão julgadora em __/__/__.

*Não há fatos eternos,
como não há verdades absolutas.
(Friedrich Nietzsche)*

*Aos meus pais,
pelo incentivo e confiança.*

AGRADECIMENTOS

À vida.

À minha família, pelo apoio, confiança e por sempre acreditarem em mim. Em especial a minha mãe, Lúcia, pelo carinho, apoio e exemplo. Ao meu pai, Derlí, pelos conselhos e apoio. Obrigado por estarem presentes sempre que precisei.

À Professora Walkiria, pela orientação, dedicação, confiança, conhecimentos transmitidos e exemplo profissional. Muito obrigado!

À Professora Neura Bragagnolo e ao Professor Renato Atílio Jorge, pelo apoio e dedicação para a realização das análises do projeto.

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

Aos membros da banca examinadora pelas correções e sugestões.

Ao CNPQ, pela bolsa de pesquisa concedida, e à FAPESP pelo financiamento do projeto.

À Bete, técnica do laboratório de leite pela amizade, suporte e atenção na realização desse projeto.

À Claudia Martelli pela contribuição para o desenvolvimento das análises.

À Renata Celeghini pela atenção e dúvidas esclarecidas.

À Mirian pelo apoio, dedicação, paciência e amizade. Sua ajuda foi essencial para a realização desse projeto.

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

Aos amigos do Laboratório de Leites: Cecília, Lígia, Mônica, Veridiana, Clarice, Karina por toda ajuda, amizade e alegrias compartilhadas.

À Simone, pela grande ajuda, amizade e momentos compartilhados. À Saory pela amizade e convivência.

À Graciela e Karol pela amizade, ajuda e momentos compartilhados. À Noelia pela alegria e bom humor.

Ao Hugo e Margarita, pela amizade, apoio e muitos momentos compartilhados.

À Fernanda e Ingrid pela amizade, apoio e conselhos nas horas difíceis. Ao Daniel pelo apoio, compreensão e companheirismo. Mesmo distantes vocês foram muito importantes nessa trajetória.

À Spel pelo fornecimento das embalagens utilizadas nesse trabalho. À Sacco pelo fornecimento da cultura lática para fabricação do queijo Prato.

A todos que de alguma forma contribuíram e fizeram parte dessa caminhada.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	x
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Figuras.....	xii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	3
2.1 Carotenóides.....	3
2.1.1 Luteína.....	4
2.2 Queijo Prato.....	7
2.3 Mecanismo de Foto-oxidação.....	7
2.3.1 Riboflavina.....	9
2.3.2 Oxidação lipídica.....	12
3. OBJETIVOS.....	14
3.1 Objetivo Geral.....	14
3.2 Objetivos Específicos.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1. Fabricação do queijo Prato.....	15
4.2. Procedimento de amostragem.....	18
4.3 Determinação da composição do leite e do queijo Prato.....	19
4.4 Estabilidade oxidativa do queijo Prato.....	20
4.4.1 Avaliação da degradação de riboflavina.....	20
4.4.2 Análise de luteína.....	20
4.4.3 Análise de dienos conjugados.....	21
4.4.4 Análise de peróxidos.....	22

4.4.5 Análise de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)	22
4.5 Planejamento experimental e análise estatística dos resultados.....	23
4.6 Aceitação sensorial e Intenção de compra	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1 Composição do leite pasteurizado	27
5.2 Composição do queijo Prato	28
5.3 Estabilidade oxidativa do queijo Prato	29
5.3.1 Degradação da riboflavina	29
5.3.2 Estabilidade da Luteína.....	33
5.3.3 Dienos conjugados.....	36
5.3.4 Peróxidos	40
5.3.5 Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	44
5.4 Aceitação sensorial e Intenção de compra	48
5.4.1 Aceitação sensorial	48
5.4.2 Intenção de compra.....	49
6. CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52
ANEXO 1	61
ANEXO 2.....	63
ANEXO 3.....	65
ANEXO 4.....	66

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição média do leite pasteurizado com e sem adição de formulação de luteína (n=2) *	27
Tabela 2 - Composição média dos queijos Prato com e sem adição de formulação de luteína (n=2) *	28
Tabela 3 - Teores de luteína no queijo Prato adicionado de formulação de luteína, acondicionado em diferentes embalagens, na ausência e presença de luz (n=2)*	33
Tabela 4 - Quadrados médios e probabilidades para teor de luteína dos queijos durante o tempo de estocagem.....	34
Tabela 5 - Teor de dienos conjugados em queijo Prato adicionado de formulação de luteína, acondicionado em diferentes embalagens, na ausência e presença de luz (n=2)*	37
Tabela 6 - Quadrados médios e probabilidades para teor de dienos dos queijos durante o tempo de estocagem.....	38
Tabela 7 - Teor de peróxido em queijo Prato com e sem adição de formulação de luteína, acondicionado em diferentes embalagens, na ausência e presença de luz (n=2) *	41
Tabela 8 - Quadrados médios e probabilidades para teor de peróxidos dos queijos durante o tempo de estocagem.....	42
Tabela 9 - Teor de TBARS em queijo Prato com e sem adição de formulação de luteína, acondicionado em diferentes embalagens, na ausência e presença de luz (n=2)*	45
Tabela 10 - Quadrados médios e probabilidades para teor de TBARS dos queijos durante o tempo de estocagem.....	46

Tabela 11 - Médias de aceitação sensorial dos queijos Prato com adição de formulação de luteína, sem adição de formulação de luteína e comercial em relação a sabor, textura, aparência e cor.....	48
--	----

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura da luteína e zeaxantina.....	4
Figura 2. Mecanismos de sensibilização da riboflavina.....	10
Figura 3 - Desativação do oxigênio singlete.....	11
Figura 4 - Representação esquemática das espécies reativas formadas a partir da sensibilização da riboflavina (MONTENEGRO et al., 2007).....	13
Figura 5. Leite adicionado de luteína para fabricação de queijo Prato e soro de queijo resultante.....	16
Figura 6. Queijos armazenados na presença de luz em BOD adaptada.....	18
Figura 7. Planejamento experimental: delineamento tipo split-split-split-plot.	24
Figura 8. Fichas de aceitação aplicada aos provadores.	26
Figura 9. Degradação da riboflavina com o tempo nos queijos sem a adição de formulação de luteína. (a) embalagem pigmentada na presença de luz; (b) embalagem pigmentada na ausência de luz; (c) embalagem transparente na presença de luz; (d) embalagem transparente na ausência de luz.....	30
Figura 10. Degradação da riboflavina com o tempo nos queijos adicionados de luteína. (a) embalagem pigmentada na presença de luz; (b) embalagem pigmentada na ausência de luz; (c) embalagem transparente na presença de luz; (d) embalagem transparente na ausência de luz.	32
Figura 11. Influência da luz e do tipo de embalagem sobre o teor de luteína no queijo Prato durante o armazenamento refrigerado.....	35
Figura 12. Efeito do tempo no teor de dienos conjugados.	39

Figura 13. Efeito da interação luteína e tempo de estocagem no teor de peróxido.....	43
Figura 14 - Efeito da interação entre embalagem e luz no teor de TBARS.....	47
Figura 15. Histograma da intenção de compra do queijo Prato com adição de luteína, sem luteína e comercial em relação aos atributos sabor e textura.....	49
Figura 16. Histograma da intenção de compra do queijo Prato com adição de luteína comercial em relação aos atributos aparência e cor.	50

Resumo

A luteína 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 queijo Prato é uma opção de suplementação da luteína na dieta, além de poder atuar na prevenção de foto-oxidação. As condições de estocagem de queijos em supermercados pode levar à alterações no produto devido à presença de riboflavina (RBF), que sob estímulo da luz promove a oxidação de lipídios e proteínas, levando a formação de *off-flavors*. O presente trabalho avaliou a estabilidade oxidativa de queijo Prato adicionado de luteína em embalagem pigmentada e transparente durante 56 dias de estocagem refrigerada, na presença e ausência de luz. Os queijos foram analisados em relação ao comportamento da riboflavina e da luteína, e formação de compostos primários e secundários oriundos da oxidação lipídica (dienos conjugados, peróxidos e substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)) durante a estocagem. Houve degradação de até 35,3 % da riboflavina nos queijos sem adição de luteína expostos à luz. Nos queijos adicionados de luteína não houve degradação da riboflavina e a luteína permaneceu estável durante o período de estocagem, na ausência e presença de luz. O tipo de embalagem não influenciou a estabilidade oxidativa dos queijos Pratos com ou sem adição de luteína. Os resultados mostraram que a luteína impediu a foto-degradação da riboflavina no queijo Prato exposto à luz, independente do tipo de embalagem utilizada. Todos os queijos apresentaram teores de luteína praticamente constantes durante todo o período de estocagem refrigerada, indicando que toda a luteína adicionada permaneceu disponível ao final do período de estocagem. Ajustes na quantidade de luteína adicionada podem ser uma boa opção para aumentar a aceitação sensorial e a intenção de compra do queijo Prato com luteína, que foi menor que a do queijo Prato comercial.

Palavras-chave: Queijo Prato, luteína, embalagem, estabilidade oxidativa.

Abstract

Lutein is associated with the reduction and prevention of age-related macular degeneration (ARMD), the main cause of irreversible blindness in the elderly. As this carotenoid is not synthesized by the human organism, its addition in cheese Prato is an option to lutein supplementation in the diet, beyond being able to act in the prevention of photo-oxidation. The storage conditions of cheeses in supermarkets can lead to changes in the product due to presence of riboflavin (RBF), which under light stimulus promotes oxidation of lipids and proteins, leading to the formation of off-flavors. The present work evaluated the oxidative stability of cheese Prato added with lutein in pigmented and transparent packaging, in the presence and absence of light, during 56 days of refrigerated storage. The cheeses were analyzed with regard to the degradation of the riboflavin, stability of lutein and formation of compounds from the lipid oxidation (conjugated dienes, peroxides and TBARS) during the storage. There was riboflavin degradation in cheeses without lutein and exposed to light. In cheeses with lutein addition, there was not riboflavin degradation and the lutein was stable during the storage in presence and absence of light. The type of packing did not influence on the oxidative stability of the cheeses Prato with or without lutein. The results shown that lutein prevented the riboflavin degradation in Prato cheese exposed to light, regardless of the type of packaging used. In all the cheeses, the lutein contents were fairly constants throughout the period of refrigerated storage, allowing the assumption that all the added lutein remained available until the end of the storage period. Adjustments in the amount of lutein to be added to cheese can be a good option to increase the sensorial acceptance and the intention of purchase of the cheese Prato with lutein, which was lower than the commercial Prato cheese.

Keywords: Cheese Prato, lutein, packaging, oxidative stability.

1. INTRODUÇÃO

Os carotenóides são pigmentos naturais conhecidos por sua atividade antioxidante e aplicação como corantes (OLIVEIRA, 2006). Entre os carotenóides importantes para a saúde, destaca-se a luteína (3,3-dihidroxi- α -caroteno), uma xantofila que se acumula na mácula, parte central da retina humana responsável pela acuidade visual. A luteína, juntamente com a zeaxantina, são as responsáveis pela pigmentação amarela característica dessa região ocular (BONE *et al.*, 1988; HANDELMAN *et al.*, 1988).

Estudos verificaram que existe uma associação entre a ingestão de luteína e a diminuição da ocorrência de catarata e degeneração macular relacionada à idade (DMRI) (SEDDON *et al.*, 1994). A degeneração macular relacionada à idade atinge 25% da população acima de 75 anos no Brasil e é a principal causa de cegueira irreversível em idosos nos países do ocidente, pois esta doença em estágio avançado não tem tratamento efetivo (FINE *et al.*, 2000). 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 o aumento da expectativa de vida da população, e conseqüentemente, o maior número de idosos no mundo, a utilização da luteína como forma de combate e prevenção de doenças degenerativas é uma alternativa bastante interessante. 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, em cápsulas. 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.

Os queijos são alimentos amplamente consumidos no mundo inteiro. O queijo Prato possui grande popularidade no Brasil e é fabricado em todas as regiões brasileiras, sendo o único queijo brasileiro adicionado de corante. É um queijo

maturado, de média umidade e massa semicozida, com sabor e aroma suaves e consistência semi-dura ou elástica (CICHOSCKI *et al.*, 2002). A coloração amarelada ou amarelo-palha é conferida pelo urucum, corante tradicionalmente utilizado na fabricação do queijo Prato, sendo possível substituí-lo pela luteína como corante e aproveitar a sua possível ação como ingrediente funcional.

Durante o período de maturação o queijo Prato sofre alterações 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). Baseado nisso, o presente trabalho propõe a adição de uma formulação de luteína ao queijo Prato, como outra opção para a ingestão de luteína, e a avaliação da influência da luteína nos processos oxidativos do queijo Prato.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 Carotenóides

Os carotenóides são pigmentos amplamente distribuídos na natureza e ocorrem 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 (HAVAUX, 2003; MINGUEZ-MOSQUERA *et al.*, 2002; POTT *et al.*, 2003).

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 derivados que geralmente contêm grupos hidroxila, epóxido e aldeído (ELBE & SCHWARTZ, 1996).

Todas as classes de carotenóides apresentam características lipofílicas, e, portanto, são solúveis 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 absorvem luz em comprimentos de onda de aproximadamente 400 a 500 nm. Por apresentarem uma estrutura altamente insaturada e conjugada, os produtos de degradação dos carotenóides são bastante complexos.

Sies (1997) estudou as funções biológicas dos carotenóides em seres humanos. Segundo ele, esses compostos podem ser importantes na proteção de células, atuando como antioxidantes contra radicais livres e seqüestrando oxigênio singlete, devido ao seu longo sistema de ligações duplas conjugadas.

No entanto, é sabido que as ligações duplas conjugadas dos carotenóides, tão importantes para suas propriedades funcionais, são ao mesmo tempo, as responsáveis pela susceptibilidade à isomerização e oxidação, o que gera perda de cor e diminuição

da atividade biológica. Na presença de ácidos, exposição à luz ou processamento térmico, as ligações duplas podem mudar de configuração. A oxidação dos carotenóides ocorre na presença de oxigênio e é acelerada pela luz, calor, metais, pró-oxidantes e enzimas (OLIVEIRA, 2006).

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).

2.1.1 Luteína

A luteína é a xantofila dominante em vegetais amarelos, folhas verdes e plasma humano. A zeaxantina é um isômero da luteína, diferindo estruturalmente na posição de uma ligação dupla (LANDRUM & BONE, 2001) (Figura 1). A luteína apresenta grupos terminais β e ϵ , enquanto a zeaxantina é simétrica e possui dois grupos terminais β . Tanto a luteína quanto a zeaxantina são dihidroxicarotenóides com grupos hidroxila localizados nos carbonos 3 e 3'. 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).

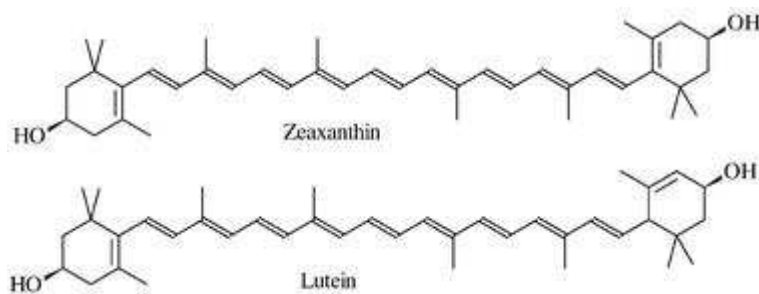


Figura 1. Estrutura da luteína e zeaxantina.

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 & 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 fotooxidativo 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.

Segundo ALVES-RODRIGUES e SHAO (2004), este pigmento protege fotoreceptores ao filtrar a luz azul prejudicial à mácula, reduzindo em 40% a incidência da luz danosa à retina. A perda da sensibilidade visual, ocorrida em pessoas com idade avançada e baixa densidade do pigmento macular nos tecidos oculares, pode ser a precursora de algumas doenças dos olhos, incluindo a degeneração macular relacionada à idade (DMRI).

Dos principais benefícios associados à luteína, além das evidências na redução do risco de desenvolvimento da DMRI, destacam-se os efeitos benéficos na proteção contra a aterosclerose, a catarata, o câncer e outras doenças. Estudos realizados com animais e humanos demonstram que a concentração de luteína no sangue e nos tecidos está estreitamente relacionada com o consumo de alimentos ricos neste carotenóide, tais como frutas e hortaliças de folhas verdes (CARVALHO, 2000).

Há uma associação entre a ingestão de luteína e a diminuição da ocorrência de catarata e degeneração macular relacionada à idade (DMRI). 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).

Por serem lipossolúveis, a luteína e a zeaxantina, assim como os carotenóides, são absorvidos no intestino da mesma maneira que os lipídios ingeridos na dieta. Acredita-se que os carotenóides sejam absorvidos no intestino delgado por processo de

difusão passiva (DURING *et al.*, 2005). Dessa forma, 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).

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 & CARLE, 2005). Calor, luz, presença de sensibilizadores no estado triplete (riboflavina) e de compostos eletrofílicos (quinonas) (DE RIGAL, *et al.*, 2000) são fatores que geralmente afetam a isomerização de carotenóides em alimentos.

De acordo com ALVES-RODRIGUES & SHAO (2004), a luteína pode ser empregada na indústria de alimentos funcionais, para enriquecimento de produtos como bebidas lácteas, cereais, biscoitos, molhos e sopas. Como corante natural, pode ser utilizada para colorir alimentos como óleos comestíveis, margarina, maionese, mostarda, molhos de salada, iogurte, bolos, sorvete e produtos lácteos. A luteína pode ser empregada em alimentos na forma de micro-emulsões, as quais podem servir como um eficiente veículo de transporte, reduzindo problemas de solubilidade, e viabilizando o emprego deste carotenóide em bebidas com características translúcidas.

O enriquecimento de alimentos pode ser realizado com êxito sem que ocorram mudanças nos demais ingredientes e sem nenhum impacto às propriedades sensoriais do produto final. Assim, a ingestão de alimentos enriquecidos com luteína pode elevar o consumo diário de luteína a níveis suficientes para redução das doenças degenerativas.

2.2 Queijo Prato

Os queijos são alimentos amplamente consumidos no mundo inteiro. O queijo Prato possui grande popularidade no país e é fabricado em todas as regiões brasileiras, possuindo um protocolo de produção bem padronizado.

Segundo a portaria nº 358, de 04 de setembro de 1997, que define o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Prato, este é um queijo maturado, obtido por coagulação enzimática do leite, complementada pela ação de bactérias lácticas específicas. É classificado como um queijo gordo, de média umidade e de massa semi-cozida. O produto deve apresentar consistência elástica, textura macia e compacta, podendo apresentar pequenas olhaduras bem distribuídas. Além disso, deve ser maturado por no mínimo 25 dias. Atualmente, o queijo tem sido bastante utilizado no preparo de sanduíches e lanches diversos. Sua produção média é de aproximadamente 70 mil toneladas, ocupando o segundo lugar em produção e terceiro lugar em consumo, no Brasil (CICHOSCKI *et al.*, 2002).

O mercado de queijos cresceu nos últimos 10 anos, no Brasil. A expansão deveu-se aos aumentos da renda *per capita* e do consumo de queijos em pratos prontos e em lanches. Os queijos normalmente são comercializados em gôndolas, expostos à luz, o que pode favorecer reações de foto-oxidação, através da sensibilização da riboflavina pela ação da luz.

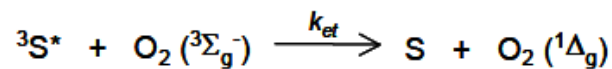
2.3 Mecanismo de Foto-oxidação

Sensibilizadores (S), cujo estado fundamental é singlete (1S), são substâncias capazes de captar luz ($h\nu$) e com isso atingir seu primeiro estado excitado e em seguida, passar ao estado tripleto, de acordo com a equação 1.



(Equação 1)

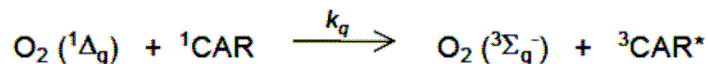
A foto-oxidação ocorre na presença de um sensibilizador (1S), oxigênio triplete ($O_2 ({}^3\Sigma_g^-)$) e luz na região do visível, formando o sensibilizador no estado triplete (${}^3S^*$). Este sensibilizador (${}^3S^*$) pode ser desativado através de dois mecanismos. O conhecido como Tipo I consiste na associação direta do sensibilizador com outra molécula formando radicais livres, enquanto que no Tipo II ocorre formação de oxigênio singlete ($O_2 ({}^1\Delta_g)$), pela transferência de energia do sensibilizador excitado para o $O_2 ({}^3\Sigma_g^-)$ (Equação 2) (BRADLEY & MIN, 1992).



(Equação 2)

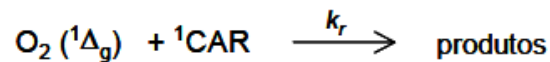
A desativação do oxigênio $O_2 ({}^1\Delta_g)$ por compostos presentes nos alimentos, como carotenóides, pode ocorrer por um processo de transferência de energia ou através de reações químicas.

A desativação física (Equação 3) envolve a transferência de energia de excitação do $O_2 ({}^1\Delta_g)$ para o carotenóide, resultando em formação de oxigênio no seu estado fundamental ($O_2 ({}^3\Sigma_g^-)$) e estado triplete excitado do carotenóide (${}^3CAR^*$). A energia do ${}^3CAR^*$ é dissipada através de interações rotacionais e vibracionais entre o ${}^3CAR^*$ e o solvente para recuperar o estado fundamental do mesmo, sem ocorrer degradação (STAHL & SIES, 1993).



(Equação 3)

Em contraste com a desativação física (k_q), o processo químico (k_r) resulta em destruição do cromóforo e na formação de produtos de oxidação (STRATTON et al., 1993), como mostra a Equação 4.



(Equação 4)

Os carotenóides são conhecidos como excelentes desativadores de oxigênio singlete, sendo o número de ligações duplas conjugadas um eficiente parâmetro para avaliar sua habilidade em desativar oxigênio singlete (HIRAYAMA et al., 1994).

2.3.1 Riboflavina

A interação entre a luz, oxigênio e compostos denominados sensibilizadores, tais como a riboflavina (Rf) presente em leite (AURAND et al., 1977) e clorofila em óleos vegetais (LEE & MIN, 1990), causa foto-oxidação em alimentos, através da produção de radicais livres e oxigênio molecular singlete ($\text{O}_2(^1\Delta_g)$) que podem oxidar os constituintes dos alimentos levando a perdas significativas de nutrientes, como as vitaminas e aminoácidos, à oxidação lipídica, à descoloração, assim como à formação de *off-flavors* (BORLE et al, 2001).

A riboflavina é relativamente estável ao tratamento térmico, mas bastante sensível à ação da luz (LASSEN *et al*, 2002). O grau de alteração depende de fatores tais como comprimento de onda e intensidade da luz, tempo de exposição, tipo de embalagem, área superficial exposta e, temperatura (NUNES, 2005).

A luz fluorescente ($\lambda_{\text{emissão}} > 350 \text{ nm}$) usada nas gôndolas expositoras proporciona condições ótimas para a promoção de reações deteriorantes iniciadas pela riboflavina (Rf), nas quais por absorção de luz o estado singlete fundamental da riboflavina (^1Rf) passa para o estado singlete excitado ($^1\text{Rf}^*$), que é convertido no estado triplete excitado ($^3\text{Rf}^*$), pelo cruzamento entre sistemas (Figura 2).

A $^3\text{Rf}^*$ pode seguir dois mecanismos de reação, Tipo I ou Tipo II (FOOTE, 1968). No mecanismo Tipo I, $^3\text{Rf}^*$ reage com um substrato (Q), como proteínas ou ácidos

graxos para produzir radicais livres e íons radicais. No mecanismo Tipo II o $^3\text{Rf}^*$ reage com oxigênio molecular fundamental triplete, $\text{O}_2(3\Sigma_g^-)$, para produzir $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ excitado.

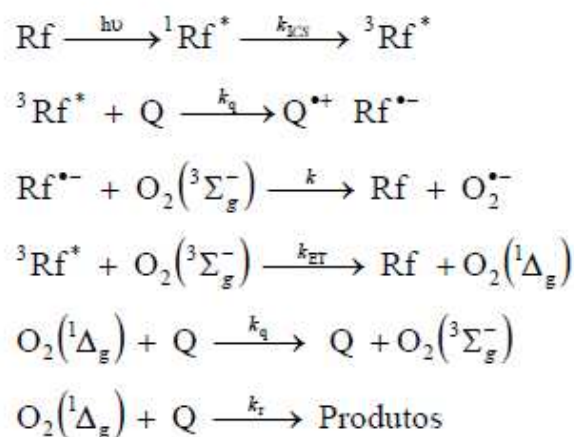


Figura 2. Mecanismos de sensibilização da riboflavina.

O $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ pode ser desativado de forma unimolecular, dissipando energia para o meio, ou bimolecular por um mecanismo de transferência de energia conhecido como desativação física ou por desativação química que corresponde à reação com compostos ricos em elétrons (Q) tais como ácidos graxos, vitaminas lipossolúveis, aminoácidos, conduzindo à degradação destes compostos (Figura 3).

O caráter eletrofílico do oxigênio singlete explica as reações de adição com todas as espécies químicas caracterizadas por ligações duplas, 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).

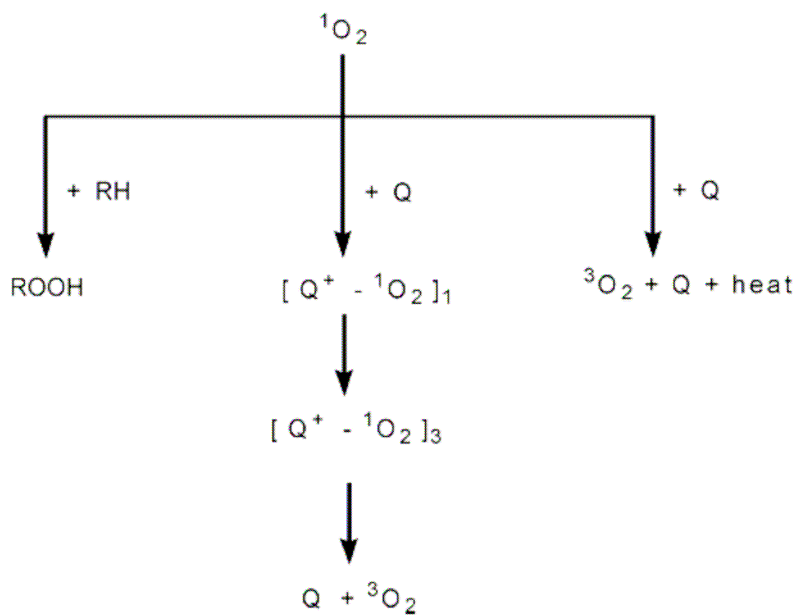


Figura 3. Desativação do oxigênio singlete.

A ação protetora dos carotenóides sobre a degradação por foto-oxidação de compostos de interesse biológico se deve ao fato da constante de desativação física (k_q) dos carotenóides ser de várias ordens de magnitude maior que a química (k_r), exercendo uma ação catalítica nos processos de desativação de $O_2 (^1\Delta_g)$, uma vez que o estado triplete excitado do carotenóide ($^3Car^*$) pode regressar a seu estado fundamental por liberação de calor.

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. A luz visível com comprimentos de

onda entre 420 e 520 nm é a maior causadora de problemas de degradação em produtos lácteos (ALVES & 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 (ao redor de 450 nm), a qual favorece degradação (ALVES & JAIME, 2006).

2.3.2 Oxidação lipídica

Ácidos graxos insaturados geralmente são alvos do ataque de radicais livres e de oxigênio singlete, seguido pela formação de peróxidos ou hidroperóxidos. Leite embalado em embalagem transparente e armazenado sob luz fluorescente apresenta altos níveis de hexanal e ácido tiobarbitúrico (TBA), resultante da foto-oxidação lipídica, comparado com o leite armazenado em embalagem opaca ou cartonada (ERICKSON, 1997).

A oxidação lipídica pela riboflavina sensibilizada é um importante fator no desenvolvimento de off-flavor, embora a taxa de degradação lipídica pela riboflavina seja relativamente baixa quando comparada com a oxidação de proteínas (AURAND *et al*, 1966; DIMICK, 1982). O *off-flavor* de ranço é causado pela oxidação de lipídios devido à ação do oxigênio singlete com formação de hidroperóxidos. Esses produtos são instáveis e originam compostos voláteis como aldeídos, cetonas e ácidos graxos de cadeia curta, responsáveis pelo off-flavor de ranço.

Várias condições devem ser cumpridas para proteger suficientemente os alimentos contra a foto-oxidação. Dentre elas, deve-se controlar as condições de armazenamento, o espectro de emissão da fonte de luz utilizada, o espectro de

transmissão, assim como a permeabilidade da embalagem ao oxigênio (BORLE, *et al*, 2001).

A luz fluorescente é comumente utilizada em supermercados para expor produtos lácteos e provê boas condições para absorção de luz pela riboflavina (VITERI *et al*, 2003). A distribuição das formas reativas de oxigênio (Figura 4) formadas pela sensibilização da riboflavina depende da disponibilidade de oxigênio, da concentração de riboflavina e outras substâncias oxidantes ou inativadoras (CHOE *et al*, 2005).

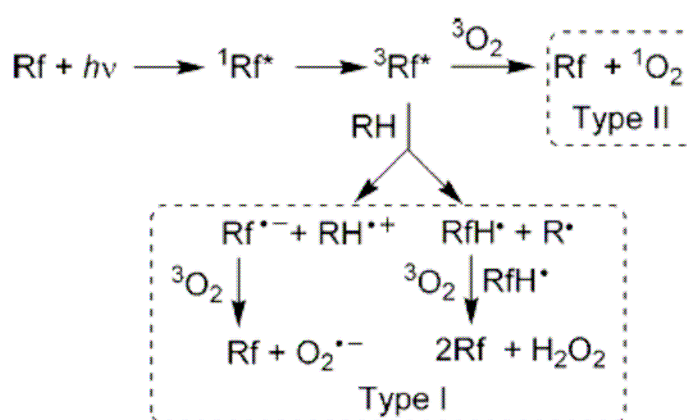


Figura 4. Representação esquemática das espécies reativas formadas a partir da sensibilização da riboflavina (MONTENEGRO *et al.*, 2007).

A embalagem pode prevenir diretamente o desenvolvimento de off-flavor, protegendo o conteúdo contra ação de luz e oxigênio (VASSILA *et al*, 2002). Porém, os problemas com todos os tipos de embalagens plásticas incluem alta transmissão de luz e permeabilidade ao oxigênio (RYSSTAD *et al*, 1998).

Não há até o momento, pesquisas que avaliem a interação entre a luteína e a foto-oxidação que ocorre em produtos lácteos durante estocagem refrigerada comercial, em decorrência da ação da riboflavina sensibilizada pela luz.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a estabilidade oxidativa do queijo Prato adicionado de luteína, acondicionado em embalagem termoencolhível, transparente e pigmentada, durante armazenamento refrigerado, e sob incidência de luz.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a estabilidade da luteína no queijo Prato;
- Avaliar o comportamento da riboflavina no queijo Prato;
- Monitorar o desenvolvimento de produtos primários e secundários provenientes da oxidação lipídica do queijo Prato;
- Verificar a aceitação sensorial e intenção de compra do queijo Prato adicionado de luteína.
- Avaliar a influência da presença de luteína no processo de oxidação lipídica do queijo Prato.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Fabricação do queijo Prato

O leite cru (300 litros) utilizado na fabricação do queijo Prato foi obtido no Laticínio Ati latte (Itatiba, SP), transportado em latões até a planta piloto do laboratório de Leite e Derivados do DTA/FEA/UNICAMP e mantido sob refrigeração (5 ± 2 °C) em câmara-fria para posterior análise e processamento. O leite foi pasteurizado em trocador de calor a placas a 72 °C/ 15 s, resfriado a 4 ± 1 °C, armazenado em latões de 50 litros e mantido em câmara fria a temperatura menor que 5 °C por uma noite.

O leite pasteurizado foi dividido em duas partes iguais (150 litros), uma para cada tipo de tratamento. O primeiro tratamento consistiu na fabricação de um queijo controle (QC), sem adição de corante, e o segundo tratamento consistiu na adição de uma formulação comercial contendo 20% de luteína, de grau alimentício, Lutein 20% FS, adquirida da DSM Nutritional Products. A formulação contém cristais micronizados de luteína (extraídos da flor *Tagetes erecta*) dispersos em óleo de milho, e adicionado de dl- α -tocoferol como antioxidante (Anexo 1). Para a produção dos queijos Prato, utilizou-se cultura láctica Lyofast MOS 062 E (Sacco Brasil, Campinas, SP, Brasil) composta de *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e/ou subsp. *cremoris*, na proporção de 4:4:2 respectivamente.

Dois tanques de queijo foram fabricados por dia, um para cada tratamento, resultando num total de quatro ensaios, previamente aleatorizados. Cada parte de leite foi transferida para o tanque de fabricação automático (Biosinox, Lambari, MG, Brasil), com capacidade para 150 litros, composto de lira para corte e agitação ajustável. O leite foi inicialmente aquecido a 35°C, sendo então adicionados, a cultura, cloreto de cálcio 50% (200 ppm), formulação de luteína (0,04%) e 0,06% de polissorbato 80 (Oxiten, São Paulo, SP, Brasil, Anexo 2) como emulsificante para a dispersão da formulação oleosa de luteína no leite.

O uso de emulsificante foi necessário para a dispersão da luteína lipossolúvel já que o leite é constituído em média por 87,3 % de água e 3,9 % de gordura (WALSTRA & JENNESS, 1984). Uma série de testes foi realizada preliminarmente, com a adição de diferentes emulsificantes alimentícios em concentrações distintas. Os emulsificantes testados foram lecitina, lecitina modificada e polissorbato 80, que possuem, respectivamente, um HLB (Balanço hidrofílico-lipofílico) crescente. A escolha do emulsificante foi baseada nos resultados de menor perda de luteína no soro e, conseqüentemente, maior incorporação de luteína à massa de queijo. O polissorbato 80, na concentração de 0,06%, foi o que apresentou resultados mais satisfatórios, como mostra a Figura 5.



Figura 5. Leite adicionado de luteína para fabricação de queijo Prato e soro de queijo resultante.

Para a coagulação do leite, foi utilizado coalho bovino em pó (Chr. Hansen, Valinhos, SP, Brasil), em quantidade suficiente para coagular o leite em 35 minutos. Após a verificação do ponto de corte, o gel foi cortado durante 10 minutos, o que resultou em cubos com aproximadamente 1,0 cm de aresta. Iniciou-se, então, uma agitação lenta por cerca de 15 minutos (1ª mexedura), seguida pelo aquecimento indireto da coalhada com aumento progressivo da agitação (2ª mexedura) para o semicozimento da massa até 42°C, na proporção de 1° C a cada 2-3 minutos. Após o término do aquecimento, o soro foi drenado, a massa colocada em formas retangulares de 1,0 Kg, e levadas para a prensa vertical pneumática (Inoxmilk, Lambari, MG, Brasil). A prensagem foi realizada em três etapas: a primeira, por 15 minutos à pressão de 20 psi, a segunda, por 30 minutos à pressão de 40 psi e a terceira por mais 90 minutos à

pressão de 50 psi. Durante a prensagem, os queijos foram virados na forma e mudados de posição na prensa.

Ao final da prensagem os queijos foram cortados ao meio e encaminhados para a etapa de salga em salmoura (5 °C e 20% de sal) por 12 horas. Após a salga, os queijos foram secos a 12 °C por 48 horas e, então, embalados a vácuo em sacos plásticos termoencolhíveis, constituídos de co-extrudados de poliamidas e poliolefinas, fornecidos pela SPEL (São Paulo, SP, Brasil). Metade dos queijos foram embalados em embalagens pigmentadas (cor vermelha) e a outra metade em embalagens transparentes. O Anexo 3 apresenta o espectro de transmitância das embalagens. Depois de embalados, os queijos foram igualmente distribuídos em estufas BOD Marconi modelo MA 415® (Piracicaba – SP, Brasil) e estocados na presença e ausência de luz fluorescente (1000 ± 100 lux). A lâmpada fluorescente TL8® 15 W da OSRAM (Osasco, SP - Brasil) foi instalada na BOD de forma que a incidência de luz fosse perpendicular às estantes, onde os queijos foram armazenados. As amostras armazenadas sob luz receberam radiação na parte superior, em condições semelhantes às encontradas em supermercados (Figura 6). Os queijos foram virados a cada 7 dias, durante o período de maturação. As amostras foram mantidas a 12°C, durante os 56 dias de estocagem, sendo escolhidas aleatoriamente e avaliadas periodicamente para determinação dos teores de luteína, degradação da riboflavina e dos produtos oriundos da oxidação de gordura do queijo.



Figura 6. Queijos armazenados na presença de luz em BOD adaptada.

4.2. Procedimento de amostragem

No momento da chegada do leite cru integral na planta piloto do laboratório de Leite e Derivados foram retiradas amostras, após devidamente misturado com ajuda de agitador de aço inoxidável perfurado, para análise de pH, acidez e teste do álcool, antes de submetê-lo à pasteurização.

O leite pasteurizado foi avaliado quanto ao pH, acidez titulável, extrato seco total, gordura, cinzas e nitrogênio total. A eficiência da pasteurização foi avaliada através da atividade das enzimas lactoperoxidase e fosfatase alcalina.

As amostras para as análises de composição dos queijos foram coletadas após 5 dias de fabricação do queijo. As peças de queijos tomadas aleatoriamente, e divididas em três partes, sendo duas laterais e uma central. A parte central foi cortada em cubos menores, triturada em multiprocessador e homogeneizada manualmente. O material assim obtido foi acondicionado em frascos plásticos, sem espaço livre. As amostras foram mantidas sob refrigeração a 5 °C até sua utilização.

Para o acompanhamento da estabilidade oxidativa da luteína e da gordura durante a estocagem, as amostras foram randomicamente escolhidas, trituradas em multiprocessador e homogeneizadas para a constituição de uma amostra representativa. As amostras foram avaliadas aos 0, 14, 28, 42, 56 dias de estocagem refrigerada quanto aos teores de dienos conjugados, peróxidos, substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). Antes da trituração das amostras, foram retiradas uma fatia central do queijo (1cm de espessura) para realizar a determinação de cor e outra fatia (0,3 cm de espessura) para a determinação da degradação de riboflavina. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.3 Determinação da composição do leite e do queijo Prato

As análises de composição do queijo Prato foram realizadas em triplicata. O pH foi determinado por meio de método potenciométrico, em potenciômetro da marca Digimed modelo DM22[®] (São Paulo, SP - Brasil), conforme AOAC 935.17 (1995). A determinação de acidez foi realizada em triplicata, segundo AOAC (1995) e expressa em % de ácido láctico. O teor de extrato seco total (EST) foi determinado gravimetricamente, em estufa sob circulação forçada de ar, a 100 °C durante 24 horas, de acordo com AOAC 925.23 (1995). A determinação do teor de gordura para o leite foi realizada segundo o método Mojonnier, descrito em AOAC 989.05 (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 a 105 °C, durante 50 minutos. Para determinar o teor de gordura do queijo foi utilizado o método de Gerber (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985), sendo utilizado butiromêtro de Gerber especial para amostras sólidas, com uso de ácido sulfúrico para digestão da amostra (menos a gordura) e separação em centrífuga com adição de álcool iso-amílico para auxiliar na separação das fases aquosa e gordurosa. Os teores de nitrogênio e proteína foram determinados pelo método de Kjeldahl, segundo AOAC 991.20 (1995) e BARBANO (1991), sendo utilizado o método de micro-Kjeldhal para leite e macro-

Kjeldhal para queijo. A porcentagem de proteína total foi obtida pela multiplicação da porcentagem de nitrogênio por 6,38. Para análise do teor de sal dos queijos foi empregado o método de Volhard. Todas as análises físico-químicas foram realizadas em triplicata.

4.4 Estabilidade oxidativa do queijo Prato

4.4.1 Avaliação da degradação de riboflavina

A determinação da degradação de riboflavina (RBF) foi realizada em espectrofluorímetro Cary Eclipse® (Varian, Palo Alto, CA, USA) 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 35° em relação à luz incidente. Uma amostra circular de queijo (0,5 cm de diâmetro x 0,3 cm de espessura) foi acoplada ao acessório para amostras sólidas do espectrofluorímetro. As fendas de excitação e emissão foram iguais (5 nm), o tempo de integração foi 0,1 s e o incremento no comprimento de onda do espectro de varredura foi de 2 nm. A emissão foi medida entre 400 nm a 700 nm, com excitação da amostra a 380 nm.

4.4.2 Análise de luteína

Foi pesado $0,20 \pm 0,01$ g de amostra de queijo homogeneizado em cápsulas de porcelana, e adicionada a mesma quantidade de *hyflosupercel*. Em seguida, adicionou-se acetato de etila e a amostra foi macerada com o auxílio de pistilo. O extrato foi transferido para tubo de vidro, centrifugado a 3500 *g*/ 5 minutos a 20°C, sendo o sobrenadante transferido para um erlenmeyer. O processo de extração e centrifugação foi repetido 5 vezes, para extração exaustiva dos carotenóides presentes no queijo. Os

extratos foram combinados e transferidos para um funil de separação contendo a mistura de éter etílico:éter de petróleo (2:1, v/v) para a etapa de partição. O extrato foi lavado com 4 L de água destilada, recolhido em erlenmeyer e adicionado de sulfato de sódio anidro para adsorção de resíduos de água da etapa de lavagem. Em seguida, o extrato foi transferido para um balão de fundo redondo e o solvente foi completamente evaporado em evaporador rotatório ($T \leq 38 \text{ }^\circ\text{C}$). O extrato seco foi então redissolvido em etanol e o volume foi aferido em balão volumétrico de 10 mL, de onde uma alíquota de 1,7 mL foi retirada e diluída novamente para volume de 10 mL. A absorbância do extrato a 445 nm foi medida em espectrofotômetro UV-visível (Agilent 8453, Santa Clara, EUA) e a concentração dos carotenóides totais foi calculada de acordo com a lei de Lambert-Beer (equação 5).

$$C(\mu\text{g/mL}) = \frac{A \times 10^4}{E_{1\text{cm}}^{1\%}} \quad (\text{equação 5})$$

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

O teor de luteína do queijo Prato, adicionado de formulação de luteína, foi calculado pela diferença entre os teores de carotenóides totais do queijo Prato com luteína e do queijo Prato sem adição de luteína e expressos em micrograma de luteína por grama de queijo.

4.4.3 Análise de dienos conjugados

A quantificação de dienos conjugados foi realizada de acordo com a metodologia da AOAC (1984), com modificações (LUGASI et al, 2007). Foram pesados 1g de amostra homogeneizada, adicionados 20 mL de iso-octano, e homogeneizados durante dois minutos, em vortex. As amostras foram filtradas em filtro de acetato de celulose. Uma alíquota de 2 mL foi transferida para balão de 25 mL e o volume ajustado com iso-

octano. As leituras de absorvância foram realizadas a 233 nm em espectrofotômetro UV-visível Agilent 8453[®].

4.4.4 Análise de peróxidos

A determinação de peróxidos foi realizada pelo método do IDF (International Dairy Federation) 74A:1991 (IDF, 1991). Para a quantificação uma amostra de 20g de queijo foi centrifugada a 13500 rpm em centrifuga Beckman Coulter Allegra 64R (Califórnia, EUA), durante 60 minutos, para extração lipídica. Uma alíquota de 200 µL de gordura para o queijo com luteína e de 800 µL de gordura para o queijo sem luteína foi retirada e colocada em tubo de ensaio para reação com tiocianato de amônio e solução de Fe⁺². A leitura da absorvância em espectrofotômetro UV-visível Agilent 8453[®], foi feita após 5 minutos de reação no comprimento de onda de 500 nm. Os resultados foram expressos em miliequivalentes de O₂ por quilo de gordura.

4.4.5 Análise de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação das substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico foi realizada segundo Bragagnolo, Danielsen e Skibsted (2005). Foram pesados 25,0 ± 0,20g de amostra homogeneizada em tubo de centrífuga, e a centrifugação realizada a 12500 rpm durante 60 minutos para a extração lipídica. Todo sobrenadante foi transferido quantitativamente para tubo cônico, tipo falcon, adicionado de 10 mL de solução contendo ácido tricloroacético 7,5% (TCA), ácido etilenodiaminotetracético 0,1% (EDTA) e galato de propila 0,1% (PG), e homogeneizado em agitador tipo vortex, por 45 segundos. O homogeneizado foi filtrado para um béquer em filtro de acetato de celulose. Do filtrado, foram pipetados 5,0 mL para um tubo de 30 mL com tampa rosqueada e adicionados 5,0 mL de solução de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,02 mol/L. Foi preparado um branco com 5,0mL de solução de TBA e 5,0 mL de solução contendo TCA 7,5%, EDTA 0,1% e PG 0,1%. Em seguida, as amostras foram novamente homogeneizadas em vortex, por 10 segundos. Os tubos foram aquecidos em banho de

água em ebulição por 40 minutos, resfriados em banho de gelo, e a absorbância foi lida em espectrofotômetro UV-visível Agilent 8453[®] a 450 nm.

Aplicando a análise de TBARS ao queijo Prato foi observada a formação de cor amarela na solução da análise com um máximo de absorbância a 450 nm, e não o aparecimento da cor vermelha com absorbância em torno de 530 nm, normalmente encontrada nessa análise. O aparecimento da coloração amarela, ao invés do vermelho é típico em produtos lácteos, e é normalmente atribuída ao alto teor de gorduras saturadas e ácidos graxos monoinsaturados presentes na gordura do leite, resultando principalmente na formação de aldeídos monoinsaturados durante a oxidação (HOYLAND E TAYLOR, 1991). Os resultados para TBARS foram expressos em ABS₄₅₀ por grama de gordura em base seca.

4.5 Planejamento experimental e análise estatística dos resultados

Um delineamento do tipo *split-split-split-plot* foi adotado para avaliação da evolução dos teores de dienos conjugados, peróxidos, substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e luteína com o tempo de estocagem refrigerada. O fator estudado foi a adição da formulação de luteína no queijo, sendo o tipo de embalagem e exposição à luz sub-parcelas do corante luteína, e o tempo de estocagem, uma sub-parcela do tipo de embalagem e da exposição à luz, como ilustrado na Figura 7. 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 luteína, dienos conjugados, peróxidos e TBARS foram avaliadas por análise de variância (ANOVA). As comparações entre os níveis significativos dos fatores envolvidos e os gráficos foram feitos com auxílio do programa *Statistica* versão 7.0 Statsoft[®].

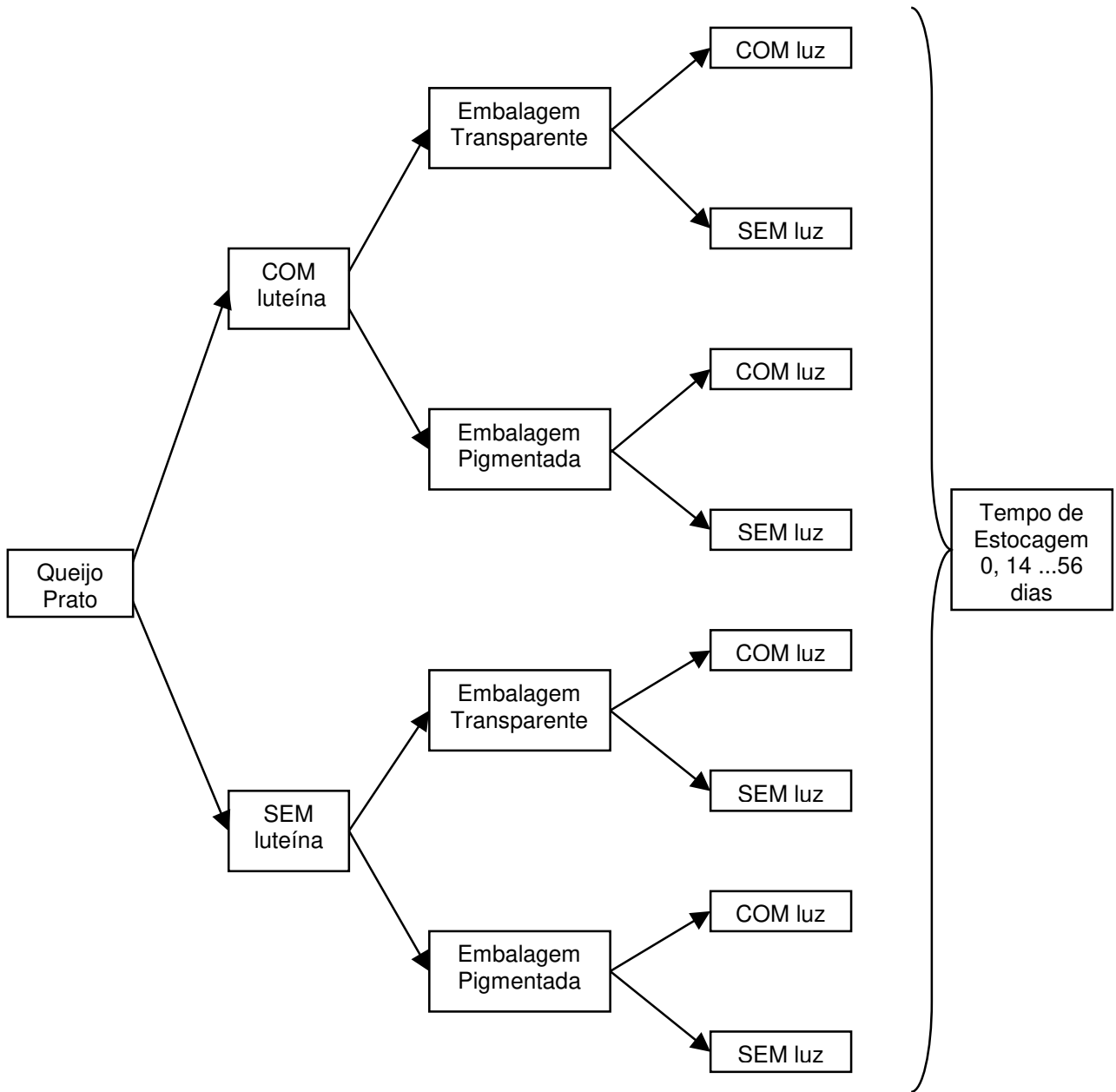


Figura 7. Planejamento experimental: delineamento tipo split-split-split-plot.

4.6 Aceitação sensorial e Intenção de compra

A análise sensorial do queijo Prato foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial do DTA, FEA, UNICAMP, no 30º dia de estocagem refrigerada, aplicando um teste de aceitação a 103 provadores não treinados consumidores de queijo Prato. A realização da análise sensorial do queijo Prato foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP sob número de protocolo 858/2009.

A análise sensorial foi realizada em duas etapas. Na primeira, foi realizada uma análise de aceitação com amostras de queijo Prato com luteína, sem luteína e uma amostra comercial, para os atributos sabor e textura, sob luz vermelha para não haver influência da cor na resposta dos provadores. Na segunda parte, foi realizada uma análise de aceitação visual dos queijos Prato adicionado de luteína e comercial para os atributos aparência e cor, sob luz branca. Todos os queijos estavam no trigésimo dia de maturação.

Os testes foram realizados em cabines individuais e os queijos Prato com luteína, sem luteína e comercial foram servidos na forma de cubos com aproximadamente 20g. As amostras foram apresentadas, uma a uma, controlando os efeitos de posição (*carry-over*), conforme proposto por Macfie e Bratchell (1989). As amostras foram servidas acompanhadas de biscoito *cream cracker* e água mineral à temperatura ambiente, para remoção do sabor residual entre as amostras.

Foi utilizada escala hedônica estruturada mista de nove pontos (1 = desgostei extremamente; 5 = nem gostei/nem desgostei; 9 = gostei extremamente) para avaliar o produto quanto à cor, aparência, sabor e textura (STONE & SIDEL, 1993). Para avaliar a intenção de compra foi empregada escala hedônica de cinco pontos (1 = certamente não compraria; 3 = talvez comprasse/talvez não comprasse; 5 = certamente compraria). Também foi entregue um questionário sobre consumo de queijo Prato aos provadores junto com o termo esclarecido de livre consentimento na participação da pesquisa. As Fichas de Aceitação Sensorial dos queijos Prato que foram apresentadas aos provadores estão apresentadas na Figura 8.

AVALIAÇÃO SENSORIAL DE QUEIJO PRATO

Nome: _____ Data: _____

Você está recebendo uma amostra de queijo Prato. Por favor, prove a amostra e avalie o quanto você gostou ou desgostou da amostra em relação à **sabor e textura** utilizando a escala fixada na mesa.

AMOSTRA: _____

Sabor	Textura

Comentários: _____

Por favor, **INDIQUE COM UM CIRCULO**, qual a sua **INTENÇÃO DE COMPRA** em relação ao produto:

5. Certamente compraria este produto
4. Provavelmente compraria este produto
3. Tenho dúvidas se compraria ou não este produto
2. Provavelmente não compraria este produto
1. Certamente não compraria este produto

AVALIAÇÃO SENSORIAL DE QUEIJO PRATO

Nome: _____ Data: _____

Você está recebendo uma amostra de queijo Prato. Por favor, **avale visualmente** o quanto você gostou ou desgostou da amostra em relação à **aparência e cor** utilizando a escala fixada na mesa.

AMOSTRA: _____

Aparência	Cor

Comentários: _____

Por favor, **INDIQUE COM UM CIRCULO**, qual a sua **INTENÇÃO DE COMPRA** em relação ao produto:

5. Certamente compraria este produto
4. Provavelmente compraria este produto
3. Tenho dúvidas se compraria ou não este produto
2. Provavelmente não compraria este produto
1. Certamente não compraria este produto

Figura 8. Fichas de aceitação aplicada aos provadores.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição do leite pasteurizado

A Tabela 1 apresenta os resultados para a composição dos leites pasteurizados com luteína e sem luteína, utilizados para a fabricação do queijo Prato.

Tabela 1. Composição média do leite pasteurizado com e sem adição de formulação de luteína (n=2) *.

COMPOSIÇÃO	Leite pasteurizado sem luteína	Leite pasteurizado com adição de luteína
pH	6,76 ± 0,12	6,68 ± 0,18
Acidez (% Ac. Lático)	15,45 ± 1,06	16,31 ± 0,81
Gordura (%)	3,16 ± 0,12	3,23 ± 0,03
EST (%)	11,65 ± 0,22	11,72 ± 0,64
Proteína (%)	3,11 ± 0,05	3,03 ± 0,13
Cinzas (%)	0,71 ± 0,03	0,72 ± 0,01

*Médias e desvio padrão análises em triplicata; n= n° de replicatas de processamento
EST: Extrato seco total

Os resultados mostraram teores levemente maiores de gordura e EST no leite adicionado de luteína, fato já esperado, uma vez que a formulação de luteína utilizada era uma suspensão oleosa (96,05% de gordura) de cristais de luteína. Em geral, a composição dos leites apresentou valores dentro dos limites estabelecidos pela Instrução Normativa 51 (BRASIL, 2002) que define mínimo de 3% de gordura para leite pasteurizado. Os valores de pH entre 6,6 - 6,8 e a acidez titulável na faixa de 15 – 16 % de ácido láctico indicam um leite de boa qualidade.

5.2 Composição do queijo Prato

Na Tabela 2 são apresentados os valores de composição dos queijos Prato com e sem adição de formulação de luteína.

Tabela 2. Composição média dos queijos Prato com e sem adição de formulação de luteína (n=2) *.

COMPOSIÇÃO	Queijo Prato sem luteína	Queijo Prato com luteína
pH	5,11 ± 0,12	5,24 ± 0,04
Acidez (% ác. láctico)	0,39 ± 0,05	0,38 ± 0,03
Gordura (%)	26,50 ± 0,12	27,00 ± 0,05
GBS (%)**	57,00 ± 1,20	59,20 ± 1,50
Umidade (%)	46,42 ± 0,91	44,86 ± 1,19
Proteína (%)	20,13 ± 0,06	21,79 ± 0,93
Cinzas (%)	4,12 ± 0,07	4,13 ± 0,08
Sal (%)	1,77 ± 0,14	1,83 ± 0,18

* Médias e desvio padrão análises em triplicata; n= nº de replicatas de processamento;

** GBS: Gordura em base seca.

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Prato (BRASIL, 1997) classifica o queijo Prato como um queijo gordo, que deve possuir entre 45 e 59,9% de matéria gorda no extrato seco e entre 36 e 45,9% de umidade. A Tabela 2 mostra que os queijos Prato encontram-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente.

O queijo Prato com luteína apresentou maior teor de gordura e extrato seco quando comparado com o queijo Prato sem a adição de luteína, reflexo do maior teor de gordura do leite com luteína (Tabela 1). A fabricação do queijo é um processo de concentração de gordura e proteína do leite e, portanto, o maior teor de GBS do queijo com luteína é consequência desse processo de concentração da gordura do leite.

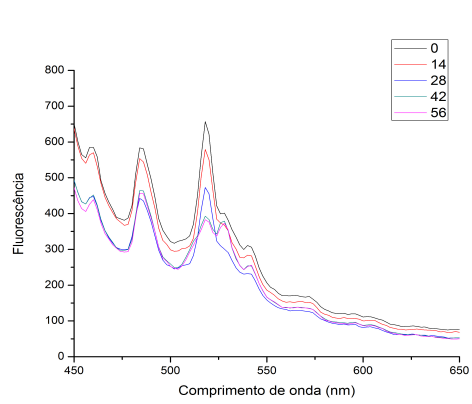
5.3 Estabilidade oxidativa do queijo Prato

O processo de oxidação da gordura em produtos lácteos, iniciado por auto-oxidação ou foto-oxidação, resulta na produção dos mesmos compostos de degradação intermediários e finais de oxidação (dienos, peróxido e TBARS). A principal diferença é na etapa de iniciação da reação de oxidação. Na foto-oxidação de produtos lácteos, a reação é iniciada pela riboflavina sensibilizada pela luz, que absorve e transfere a energia luminosa para moléculas de oxigênio altamente reativas, desencadeando o processo de oxidação de gordura e proteína e provocando a degradação da riboflavina.

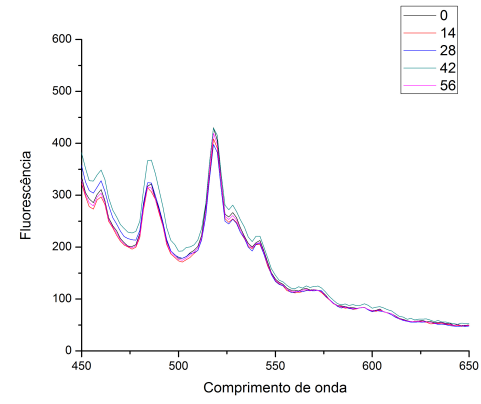
5.3.1 Degradação da riboflavina

A avaliação da degradação da riboflavina foi realizada por espectroscopia de fluorescência, que consiste em um método rápido, não destrutivo, com alta sensibilidade e especificidade.

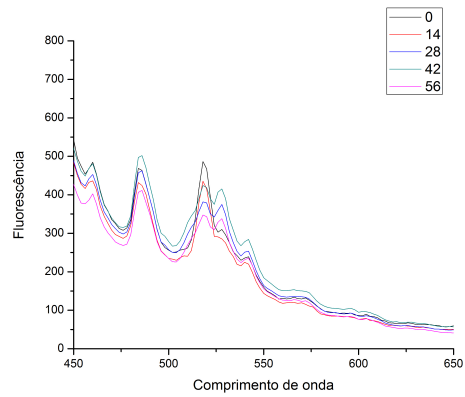
A Figura 9 apresenta o comportamento da riboflavina no queijo Prato sem a adição de formulação de luteína, acondicionado em embalagens pigmentada e transparente, estocado na presença ou ausência de luz, por 56 dias. As Figuras 9 (a) e 9 (c) mostram que no queijo Prato sem adição de luteína, sob incidência de luz, houve redução da fluorescência ao redor de 525 nm, indicando degradação da RBF (aproximadamente 35,3 %) com o tempo de estocagem, independente do tipo de embalagem utilizada. Um perfil semelhante de redução de fluorescência da riboflavina foi observado por Wold e colaboradores (2002, 2006) e Andersen e colaboradores (2005) durante a avaliação de foto-oxidação em produtos lácteos. Na ausência de luz, não houve degradação da riboflavina (Figuras 9 (b) e 9 (d)). A degradação da riboflavina aumentou com o aumento do tempo de estocagem.



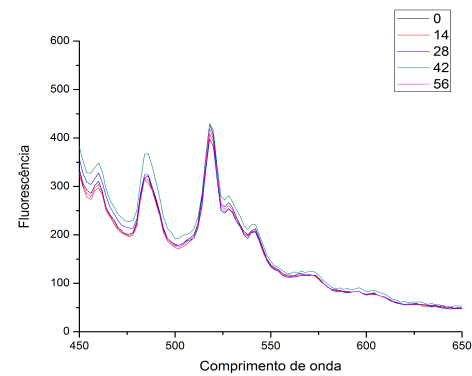
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 9. Degradação da riboflavina com o tempo nos queijos sem a adição de formulação de luteína. (a) embalagem pigmentada na presença de luz; (b) embalagem pigmentada na ausência de luz; (c) embalagem transparente na presença de luz; (d) embalagem transparente na ausência de luz.

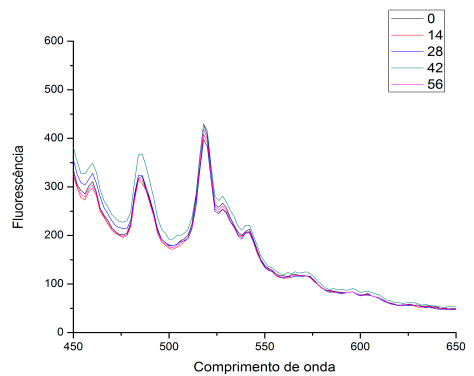
A Figura 10 apresenta o comportamento da riboflavina no queijo Prato adicionado de formulação de luteína, acondicionado em embalagem pigmentada e transparente, na presença e ausência de luz, durante estocagem de 56 dias.

Não houve degradação da riboflavina nos queijos com adição da formulação de luteína, independente do tipo de embalagem utilizada (Figuras 10(a) 10(c)) e da presença (Figura 10(a)) ou ausência (Figura (10b)) de luz. Portanto, quando os queijos foram adicionados de luteína, esta protegeu a riboflavina da foto-oxidação, com a riboflavina permanecendo estável durante o tempo de estocagem, o que pode ser visto nos gráficos da Figura 10.

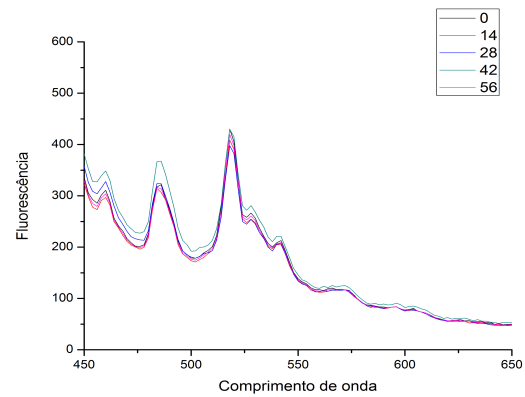
A luteína é um desativador efetivo de moléculas excitadas eletronicamente (sensibilizadores – S^*), que estão envolvidas na geração de radicais livres e de oxigênio singlete (1O_2). Desta forma, a estratégia de defesa da luteína contra as reações de foto-oxidação baseia-se em mecanismos de desativação dos sensibilizadores excitados eletronicamente, de transferência de energia onde o 1O_2 retorna ao estado fundamental, e como filtro a luz azul (YOUNG e LOWE, 2001).

Entretanto, Cardoso et al, (2007) ao estudarem o mecanismo de desativação da riboflavina excitada por ascorbato, carotenóides e tocoferóis em sistemas modelo verificaram que o β -caroteno, o licopeno e a crocina não inativaram o estado excitado da riboflavina. No entanto, os carotenóides diminuíram a formação da riboflavina no estado triplete por atuarem como filtro à luz azul.

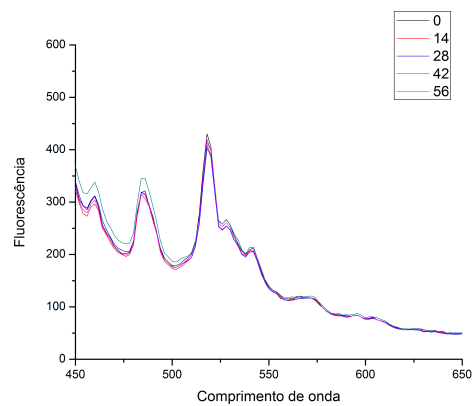
O papel protetor da luteína contra a foto-oxidação da riboflavina também foi observado por Domingos (2010) em iogurte adicionado de luteína. Quando presente, a luteína exerceu um papel protetor, impedindo a degradação da riboflavina e aumentando a estabilidade oxidativa do iogurte.



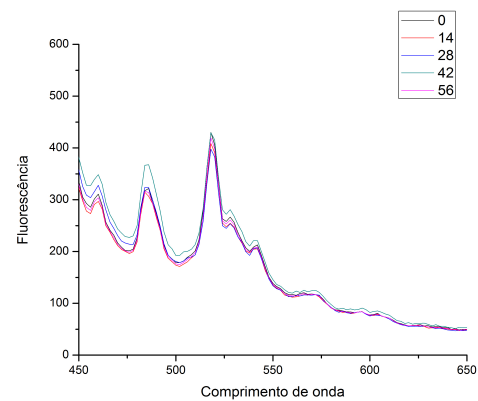
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 10. Degradação da riboflavina com o tempo nos queijos adicionados de luteína. (a) embalagem pigmentada na presença de luz; (b) embalagem pigmentada na ausência de luz; (c) embalagem transparente na presença de luz; (d) embalagem transparente na ausência de luz.

5.3.2 Estabilidade da luteína

A Tabela 3 apresenta os teores de luteína do queijo adicionado de formulação de luteína em embalagem transparente e pigmentada, na presença e ausência de luz, durante o armazenamento refrigerado. O queijo sem luteína contém somente os carotenóides provindos da gordura do leite; já no queijo com luteína, os carotenóides totais são oriundos da gordura do leite e da luteína adicionada. Portanto, o teor de luteína foi obtido pela diferença entre os teores de carotenóides totais do queijo com e sem adição do formulado de luteína. A tabela com os valores de carotenóides totais do queijo Prato com e sem adição de formulação de luteína é apresentada no Anexo 4.

Tabela 3 - Teores de luteína no queijo Prato adicionado de formulação de luteína, acondicionado em diferentes embalagens, na ausência e presença de luz (n=2)*.

Luteína ($\mu\text{g/g}$ de queijo) **				
Dias de Estocagem	Embalagem Transparente		Embalagem Pigmentada	
	Com luz	Sem luz	Com luz	Sem luz
0	670,57 \pm 4,11	694,06 \pm 29,15	670,48 \pm 4,05	694,09 \pm 29,10
14	667,71 \pm 48,35	648,68 \pm 744,44	665,37 \pm 11,96	679,39 \pm 4,69
28	704,94 \pm 20,19	704,39 \pm 6,22	706,68 \pm 28,12	702,86 \pm 37,16
42	705,31 \pm 50,28	723,51 \pm 57,05	713,72 \pm 68,19	701,30 \pm 73,32
56	717,11 \pm 37,24	736,52 \pm 4,41	712,47 \pm 38,38	709,16 \pm 26,42

*Médias e desvio padrão de análises em triplicata; n= n° de replicatas de processamento; ** Valores obtidos pela diferença dos teores de carotenóides totais de queijo com e sem adição de luteína.

Os teores de luteína se mantiveram praticamente constantes durante todo o período de armazenamento do queijo. A Tabela 4 apresenta a avaliação estatística do efeito do tipo de embalagem, da exposição à luz e do tempo de estocagem no teor de luteína dos queijos.

Tabela 4. Quadrados médios e probabilidades para teor de luteína dos queijos durante o tempo de estocagem.

Fatores	Luteína		
	gl	QM	p
Embalagem	1	29,877	0,9335
Luz	1	355,156	0,3781
Embalagem x luz	1	54,920	0,7019
Tempo	4	3.901,020	0,0634
Embalagem x tempo	4	244,868	0,9486
Luz*tempo	4	230,620	0,9536

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

O tipo de embalagem ($p=0,93345$) não influenciou o teor de luteína durante o período de estocagem, apesar da embalagem pigmentada apresentar maior barreira à passagem de luz em relação a embalagem transparente (Anexo 3). A presença ou ausência de luz ($p=0,37809$) também não influenciou o teor de luteína, indicando que a luteína não sofreu fotodegradação.

Não houve diferença significativa do teor de luteína com o aumento do tempo de estocagem refrigerada ($p=0,0634$). A Figura 11 mostra o comportamento da luteína durante o período de estocagem do queijo, evidenciando que tanto a embalagem como a luz não influenciaram na estabilidade da luteína adicionada ao queijo Prato no decorrer da estocagem refrigerada. Isso significa que praticamente toda a luteína adicionada estará disponível, mesmo ao fim da vida de prateleira do queijo, que é de 60 dias.

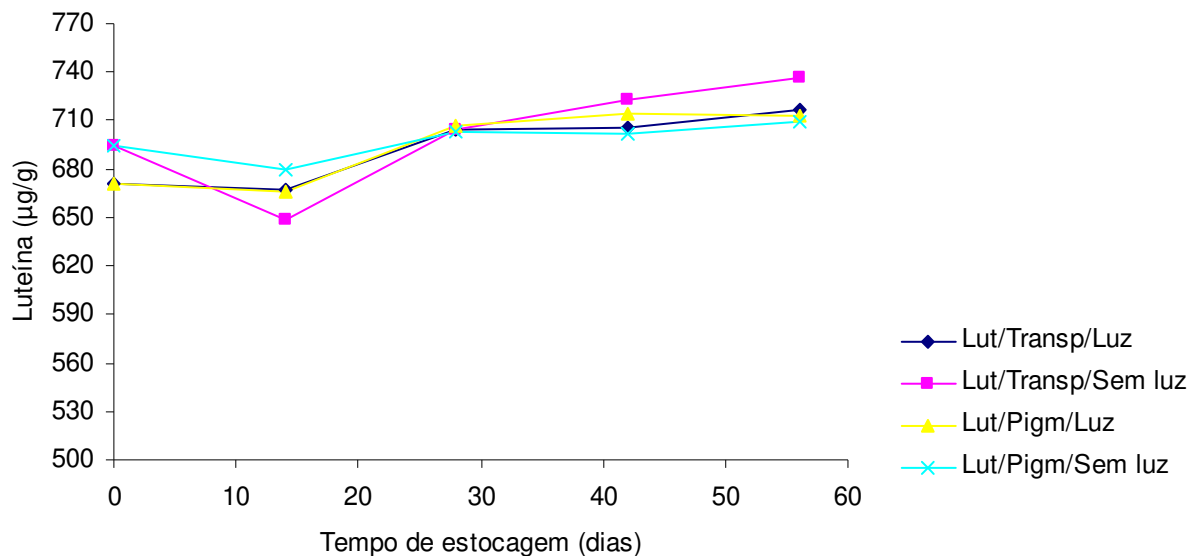


Figura 11. Influência da luz e do tipo de embalagem sobre o teor de luteína no queijo Prato durante o armazenamento refrigerado.

Jones e colaboradores (2005), ao estudarem a adição de formulação de luteína em queijo *Cheddar* observaram também que a luteína se manteve estável durante o período de estocagem. Tokusoglu e colaboradores (2008) também observaram que a luteína 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 com os carotenóides ou agindo como filtro, o que reduz a incidência de luz.

5.3.3 Dienos conjugados

Dienos conjugados são os primeiros compostos a se formarem durante o processo de oxidação de gorduras. Possuem origem no processo de oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, e na verdade, resultam da isomerização e do rearranjo que ocorre com as posições das ligações duplas desses ácidos graxos. Dienos conjugados possuem ligações duplas separadas por uma ligação simples (HAMILTON, 1983).

A oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados é acompanhada do aumento da absorção de UV em 233 nm para insaturação dieno e 268 nm para insaturação trieno (WANASUNDARA & SHAHIDI, 1994).

Os valores de dienos conjugados para os queijos com e sem adição de formulação de luteína, acondicionados em embalagem pigmentada e transparente, na presença e ausência de luz, durante o tempo de estocagem são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Teor de dienos conjugados em queijo Prato adicionado de formulação de luteína, acondicionado em diferentes embalagens, na ausência e presença de luz (n=2)*.

Dias de estocagem	Dienos Conjugados ($ABS_{233} \cdot g^{-1}_{(gordura)}$)							
	Sem luteína				Com luteína			
	Embalagem Transparente		Embalagem Pigmentada		Embalagem Transparente		Embalagem Pigmentada	
	Com luz	Sem luz	Com luz	Sem luz	Com luz	Sem luz	Com luz	Sem luz
0	193,16 ± 25,48	173,18 ± 9,33	187,55 ± 15,50	213,69 ± 17,54	228,79 ± 37,36	193,74 ± 29,20	200,76 ± 28,70	216,36 ± 30,66
14	269,82 ± 18,16	208,55 ± 62,62	288,54 ± 53,42	284,55 ± 43,40	342,93 ± 13,21	307,18 ± 25,67	332,91 ± 10,81	304,89 ± 21,82
28	342,68 ± 28,90	295,64 ± 34,51	336,24 ± 76,57	346,79 ± 98,75	312,19 ± 42,02	370,41 ± 16,84	378,26 ± 15,22	353,03 ± 35,83
42	327,67 ± 16,96	337,88 ± 20,63	354,71 ± 22,76	329,70 ± 35,74	309,86 ± 48,00	352,73 ± 55,50	357,57 ± 29,03	326,11 ± 74,29
56	355,37 ± 12,10	324,95 ± 31,21	302,48 ± 49,36	330,36 ± 16,46	365,07 ± 41,38	380,23 ± 51,63	350,80 ± 12,03	335,31 ± 94,64

* Médias e desvio padrão análises em triplicata; n= n°de replicatas de processamento.

A Tabela 6 apresenta a avaliação estatística do efeito da adição de luteína, do tipo de embalagem, da exposição à luz e do tempo de estocagem no teor de dienos conjugados dos queijos.

Tabela 6. Quadrados médios e probabilidades para teor de dienos dos queijos durante o tempo de estocagem.

Fatores	Dienos		
	gl	QM	p
Luteína	1	13.293,79	0,5449
Embalagem	1	960,60	0,6752
Luteína x embalagem	1	1.168,20	0,6459
Luz	1	1.156,54	0,5279
Luteína x luz	1	271,99	0,7546
Embalagem x luz	1	271,99	0,7546
Tempo	4	59.251,86	0,0000*
Luteína x tempo	4	1.905,55	0,3359
Embalagem x tempo	4	1.594,88	0,4259
Luz*tempo	4	764,17	0,7534

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

Como pode ser visto na Tabela 6, a adição de luteína ($p=0,5449$), o tipo de embalagem ($p = 0,6752$) e a luz ($p = 0,5279$) não influenciaram significativamente o teor de dienos conjugados.

Tanto a embalagem transparente quanto a embalagem vermelha apresentam a mesma transparência em baixo comprimento de onda, e a formação de dienos é influenciada principalmente pela luz UV, o que explica por que a luz e o tipo de embalagem não afetaram significativamente o teor de dienos conjugados .

O efeito do tempo de estocagem sobre o teor de dienos conjugados foi estatisticamente significativo ($p=0,00000$), como mostra a Tabela 6. A Figura 12 apresenta o efeito do tempo de estocagem no teor de dienos conjugados. O teor de dienos conjugados aumentou até do dia 28, a partir do qual permaneceu praticamente constante até os 56 dias de estocagem refrigerada.

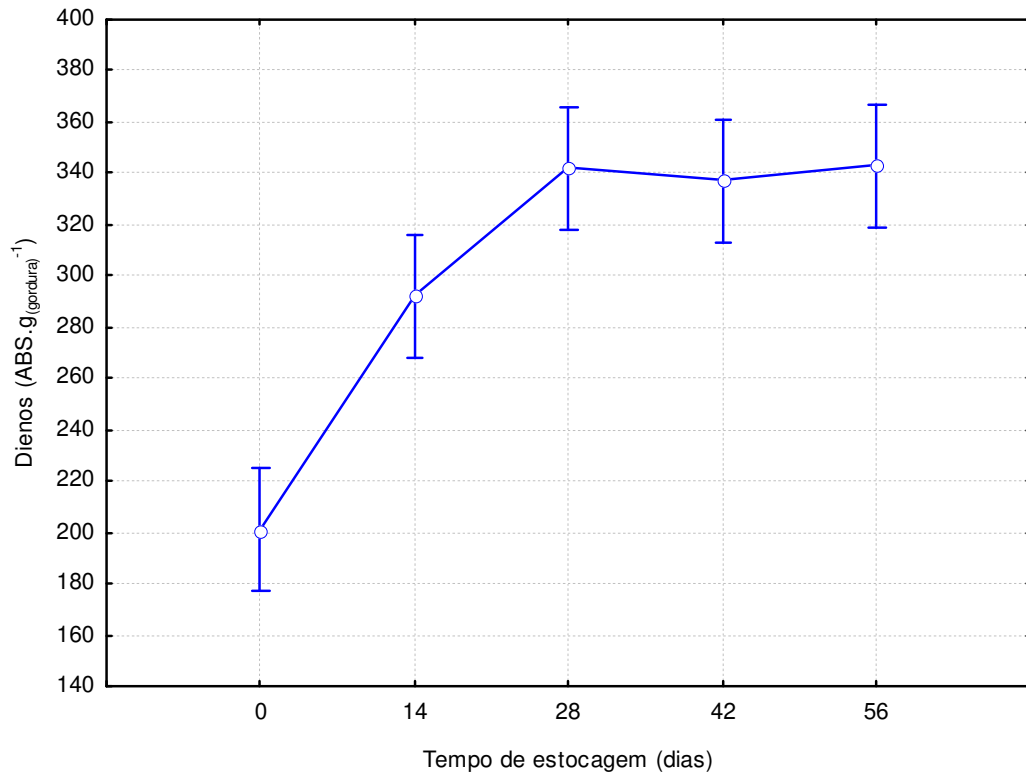


Figura 12. Efeito do tempo no teor de dienos conjugados.

5.3.4 Peróxidos

Os peróxidos são produtos primários de oxidação de ácido graxos poli-insaturados. Esses intermediários de ligação são muito instáveis, sobretudo à alta temperatura, luz e metais. Peróxidos são compostos incolores e inodoros, não podendo ser detectados sensorialmente.

A Tabela 7 apresenta os teores de peróxidos para os queijos Prato com e sem adição da formulação de luteína, em embalagem pigmentada e transparente, na presença e ausência de luz, durante o tempo de estocagem.

Tabela 7. Teor de peróxido em queijo Prato com e sem adição de formulação de luteína, acondicionado em diferentes embalagens, na ausência e presença de luz (n=2) *.

Dias de estocagem	PERÓXIDOS (meqO ₂ .kg ⁻¹ gordura)							
	Sem luteína				Com luteína			
	Embalagem Transparente		Embalagem Pigmentada		Embalagem Transparente		Embalagem Pigmentada	
	Com luz	Sem luz	Com luz	Sem luz	Com luz	Sem luz	Com luz	Sem luz
0	0,04 ± 0,03	0,04 ± 0,03	0,03 ± 0,03	0,03 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,02
14	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01
28	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,11 ± 0,01
42	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,03	0,10 ± 0,04	0,07 ± 0,03	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01
56	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01

* Médias e desvio padrão de análises em triplicata; n= n° de replicatas de processamento.

A Tabela 8 apresenta a avaliação estatística do efeito da adição de luteína, do tipo de embalagem, da exposição à luz e do tempo de estocagem no teor de peróxido dos queijos.

Tabela 8. Quadrados médios e probabilidades para teor de peróxidos dos queijos durante o tempo de estocagem.

Fatores	Peróxidos		
	Gl	QM	p
Luteína	1	0,0520279	0,0182*
Embalagem	1	0,0000716	0,3059
Luteína x embalagem	1	0,0000644	0,3252
Luz	1	0,0000781	0,3060
Luteína x luz	1	0,0000082	0,7239
Embalagem x luz	1	0,0000750	0,3143
Tempo de estocagem	4	0,0135020	0,0000*
Luteína x tempo	4	0,0027537	0,0011*
Embalagem x tempo	4	0,0000878	0,9420
Luz x tempo	4	0,0000708	0,9603

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

O tipo de embalagem ($p = 0,30585$), a presença de luz ($p = 0,30603$) e suas interações não influenciaram significativamente o teor de peróxidos. Kristensen e colaboradores (2001) avaliando a estocagem de queijo processado na presença e ausência de luz também observaram comportamento semelhante, no qual a presença de luz não influenciou a formação de peróxido, sendo que esse valor variou apenas com a temperatura de estocagem.

Já a adição de luteína (0,01820) e o tempo de estocagem (0,00000) influenciaram significativamente o teor de peróxido dos queijos. Entretanto, a interação entre luteína e tempo também foi significativa (0,00107). Quando a interação de duas variáveis exerce influência significativa sobre o parâmetro

analisado, isso significa que elas não são independentes e, portanto devem ser analisadas em conjunto (efeito da interação) e não em separado. Assim, apenas a interação foi analisada. A Figura 13 indica o efeito da interação entre luteína e o tempo de estocagem dos queijos.

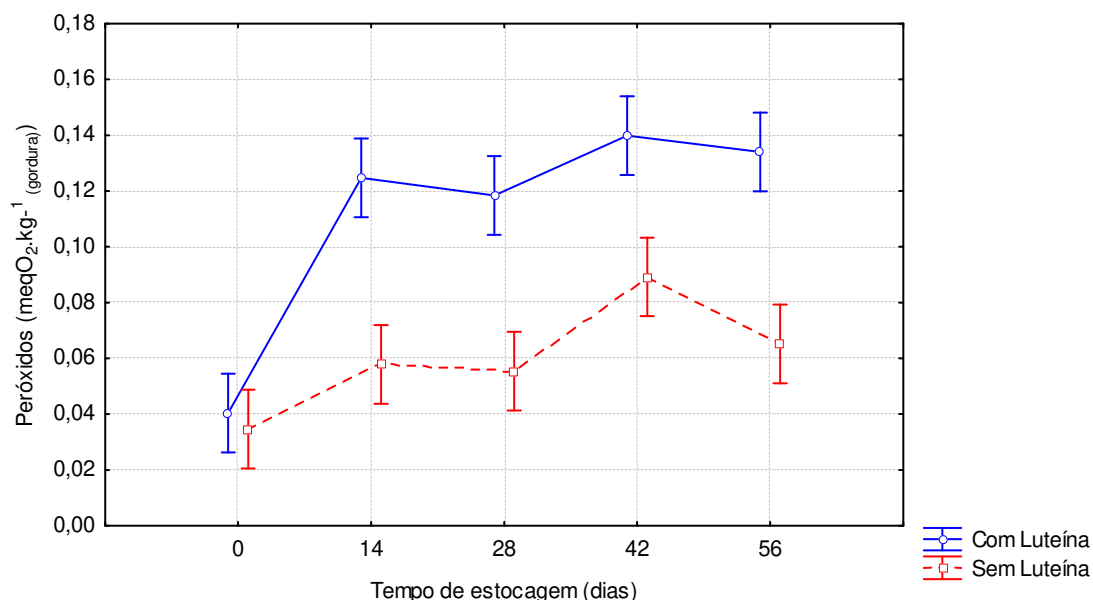


Figura 13. Efeito da interação luteína e tempo de estocagem no teor de peróxido.

Todos os queijos com luteína apresentaram maior formação de peróxidos com o tempo quando comparados com os queijos sem luteína, indicando que a adição de luteína favoreceu a oxidação da gordura. Subagio e Morita (2002), ao adicionarem luteína em óleo de milho, também observaram aumento no teor de peróxidos, que foi proporcional a concentração de luteína. Os autores concluíram que o carotenóide está envolvido na reação de oxidação da gordura e que a instabilidade do carotenóide é a razão para a sua ação como pró-oxidante. Apesar da diferença no teor de peróxidos, ter sido pequena, o comportamento e a tendência de evolução dos peróxidos com o tempo foi nitidamente diferente, principalmente aos 14 dias de armazenamento refrigerado (Figura 13). O aumento do teor de peróxidos nos queijos adicionados de luteína não foi acompanhado pela

degradação de riboflavina (Figura 10) indicando que essa formação de peróxidos não tem origem na foto-oxidação e sim que esses produtos são oriundos da auto-oxidação de gordura do queijo Prato.

5.3.5 Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A decomposição dos peróxidos resulta em compostos de natureza muito diversa, entre eles aldeídos, cetonas, hidroxiácidos, hidrocarbonetos, polímeros, os quais são genericamente denominados produtos secundários. Muitos desses produtos secundários possuem odor e sabor desagradáveis. O ácido 2-tiobarbitúrico tem capacidade de reagir com os produtos de decomposição dos ácidos graxos, resultando em compostos que podem ser medidos por espectrofotometria.

Os valores encontrados para análise de TBARS dos queijos Prato com adição de luteína e sem luteína, acondicionado em embalagem transparente e pigmentada, na presença e ausência de luz, com o decorrer do tempo de estocagem, são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Teor de TBARS em queijo Prato com e sem adição de formulação de luteína, acondicionado em diferentes embalagens, na ausência e presença de luz (n=2)*.

Dias de estocagem	TBARS (ABS 450.g ⁻¹ (gordura))							
	Sem Luteína				Com Luteína			
	Embalagem Transparente		Embalagem Pigmentada		Embalagem Transparente		Embalagem Pigmentada	
	Com luz	Sem luz	Com luz	Sem luz	Com luz	Sem luz	Com luz	Sem luz
0	0,29 ± 0,23	0,19 ± 0,16	0,10 ± 0,07	0,12 ± 0,08	0,09 ± 0,07	0,08 ± 0,06	0,11 ± 0,04	0,09 ± 0,02
14	0,14 ± 0,05	0,13 ± 0,05	0,08 ± 0,04	0,13 ± 0,03	0,08 ± 0,04	0,12 ± 0,04	0,15 ± 0,04	0,15 ± 0,05
28	0,14 ± 0,04	0,13 ± 0,05	0,14 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,23 ± 0,09	0,16 ± 0,08	0,07 ± 0,02	0,19 ± 0,09
42	0,10 ± 0,05	0,17 ± 0,05	0,17 ± 0,09	0,16 ± 0,10	0,26 ± 0,15	0,11 ± 0,04	0,15 ± 0,11	0,16 ± 0,06
56	0,16 ± 0,03	0,17 ± 0,06	0,14 ± 0,06	0,19 ± 0,08	0,28 ± 0,04	0,18 ± 0,05	0,17 ± 0,06	0,13 ± 0,06

* Médias e desvio padrão de análises em triplicata; n= n°de replicatas de processamento.

A Tabela 10 apresenta a avaliação estatística do efeito da adição de luteína, do tipo de embalagem, da exposição à luz e do tempo de estocagem no teor de TBARS dos queijos.

Tabela 10. Quadrados médios e probabilidades para teor de TBARS dos queijos durante o tempo de estocagem.

Fatores	gl	TBARS	
		QM	p
Luteína	1	0,001	0,7863
Embalagem	1	0,004	0,2243
Luteína x embalagem	1	0,000	0,6071
Luz	1	0,000	0,7091
Luteína x Luz	1	0,003	0,1652
Embalagem x Luz	1	0,010	0,0444
Tempo	4	0,006	0,3784
Luteína x Tempo	4	0,006	0,3823
Embalagem x Tempo	4	0,002	0,8344
Luz x Tempo	4	0,002	0,8665

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

A Tabela 10 indica que a adição de luteína ($p=0,78633$), tipo da embalagem ($p = 0,22425$), efeito da interação entre os fatores luteína e embalagem ($p = 0,60709$), efeito da luz ($p = 0,70914$), efeito da interação entre luteína e luz ($p = 0,16522$) não foram estatisticamente significativas. Somente o efeito combinado entre embalagem e luz exerceu influência significativa no teor de TBARS ($p = 0,04436$).

A Figura 14 representa o efeito da interação entre embalagem e luz. O teor de TBARS em embalagem pigmentada e sob ação da luz foi menor do que em embalagem transparente também sob efeito da luz. Por outro lado, o efeito da embalagem e da luz na variável TBARS foi praticamente igual quando consideradas as embalagens transparente e pigmentada sem a ação da luz.

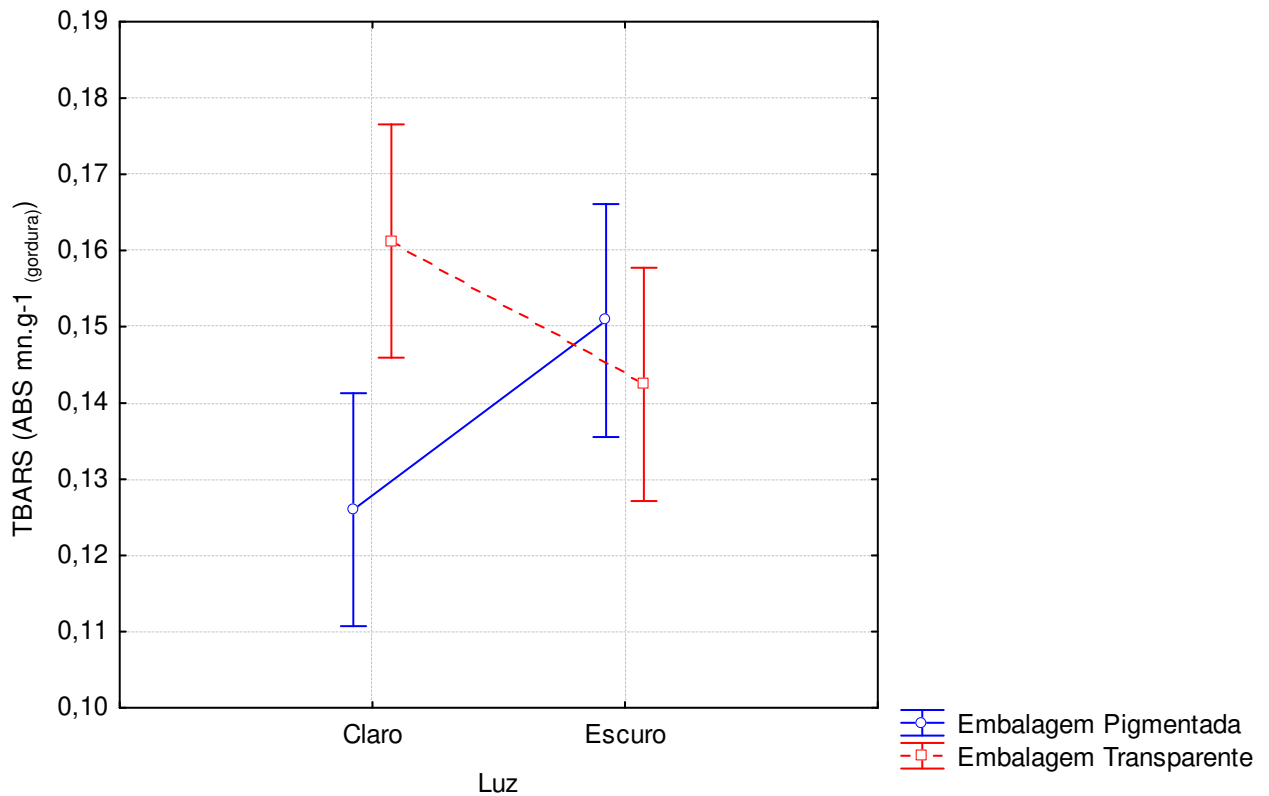


Figura 14 - Efeito da interação entre embalagem e luz no teor de TBARS.

Em geral, os queijos sofreram pouca oxidação de gordura como atestam os baixos teores de dienos conjugados, peróxidos e TBARS (Tabelas 5, 7 e 9, respectivamente), provavelmente por constituírem uma matriz compacta e relativamente anaeróbica, com pouco oxigênio dissolvido. A quantidade de TBARS formada durante os 56 dias de estocagem (Tabela 9) também foi bastante baixa, e insuficiente para resultar na formação de *off flavors*, que comprometam a qualidade do queijo durante o tempo de vida de prateleira (normalmente de 60 dias).

5.4 Aceitação sensorial e Intenção de compra

5.4.1 Aceitação sensorial

A Tabela 11 apresenta as médias das notas atribuídas aos atributos sabor, textura, aparência e cor pelos provadores para os queijos Prato com e sem adição de formulação de luteína e para um queijo Prato comercial.

Tabela 11. Médias de aceitação sensorial dos queijos Prato com adição de formulação de luteína, sem adição de formulação de luteína e comercial em relação a sabor, textura, aparência e cor.

	SABOR	TEXTURA	APARÊNCIA	COR
Queijo Prato com luteína	6,15 ± 2,22 ^b	6,84 ± 1,77 ^a	5,20 ± 2,25 ^b	4,22 ± 2,33 ^b
Queijo Prato sem luteína	6,56 ± 1,91 ^b	7,06 ± 1,73 ^a	--	--
Queijo Prato Comercial	7,16 ± 1,69 ^a	7,16 ± 1,82 ^a	7,49 ± 1,32 ^a	7,46 ± 1,47 ^a

Médias na mesma coluna acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Como mostra a Tabela 11, as amostras não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre si em relação ao atributo textura. Resultados semelhantes foram encontrados por Jones e colaboradores (2005) quando avaliou sensorialmente queijo *Cheddar* adicionado de luteína.

A adição de formulação de luteína não influenciou significativamente ($p < 0,05$) o sabor do queijo. Não houve diferença significativa entre os queijos com e sem luteína em relação ao sabor, mas estes apresentaram notas significativamente inferiores ao queijo comercial ($p < 0,05$) (Tabela 11).

Com relação à aparência e cor, o queijo adicionado de formulação de luteína foi significativamente menos aceito que o queijo comercial. A baixa aceitação do produto pode ser atribuída à cor amarelo-alaranjada mais intensa do que a conferida pelo urucum, corante tradicionalmente usado no queijo Prato comercial. No queijo com luteína foi usada uma concentração maior desse corante em relação ao usado comercialmente para o urucum, em razão das perdas de luteína no soro e da

preocupação em garantir que o queijo com luteína apresentasse a quantidade de luteína necessária para promover efeitos benéficos à saúde.

5.4.2 Intenção de compra

A Figura 15 apresenta o histograma de intenção de compra para os queijos Prato com formulação de luteína, sem formulação de luteína e comercial em relação a sabor e textura. O queijo Prato comercial apresentou a maior intenção de compra pelos provadores (75,7% certamente/possivelmente compraria), seguido do queijo Prato sem formulação de luteína (66 % certamente/possivelmente compraria) e, por último, o queijo Prato com formulação de luteína que obteve intenção de compra de 47,6 % dos provadores. Comentários dos provadores sobre o gosto residual amargo do queijo Prato com luteína podem provavelmente explicar a menor intenção de compra desse queijo.

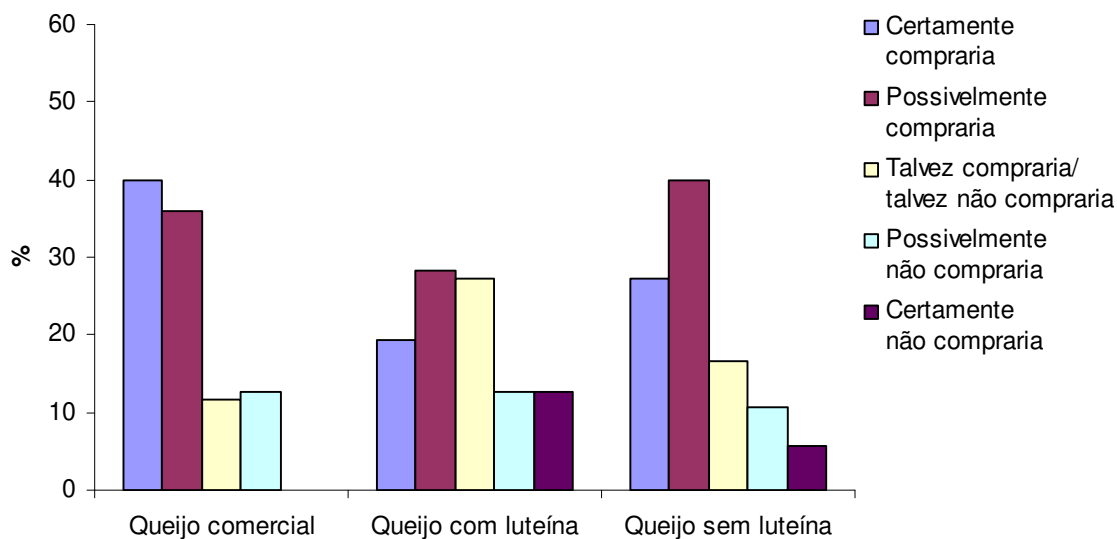


Figura 15. Histograma da intenção de compra do queijo Prato com adição de luteína, sem luteína e comercial em relação aos atributos sabor e textura.

A Figura 16 apresenta o histograma de intenção de compra para os queijos Prato comercial e com formulação de luteína para os atributos de aparência e cor. A intenção de compra para o queijo Prato comercial foi 87,4 % (certamente compraria / possivelmente compraria), seguido do queijo Prato adicionado de formulação de luteína com 19,5% de provadores que certamente ou possivelmente comprariam o produto. A razão da rejeição, segundo comentários dos provadores, para o queijo com formulação de luteína foi a cor amarelo-alaranjada demasiadamente intensa, típica de queijo *Cheddar* e não do queijo Prato.

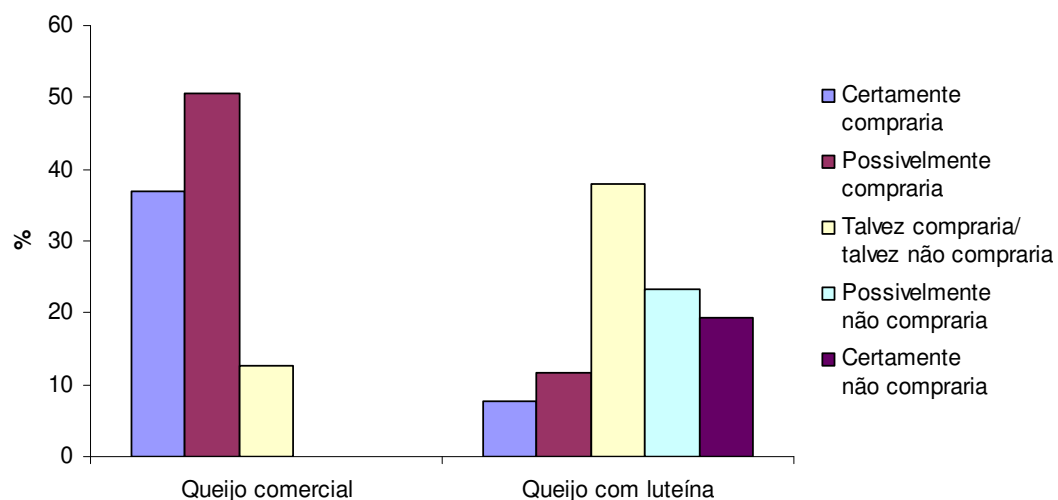


Figura 16. Histograma da intenção de compra do queijo Prato com adição de luteína comercial em relação aos atributos aparência e cor.

Uma alternativa para aumentar a aceitação sensorial e intenção de compra do queijo adicionado de formulação de luteína deve incluir a diminuição da quantidade de luteína adicionada ao queijo, cujo valor está bastante superior as 6 mg diárias recomendadas para conferir benefícios à saúde. A diminuição do teor de luteína adicionado ao queijo deve diminuir o gosto residual amargo e diminuir a intensidade da cor amarelo-alaranjada do queijo, ficando mais próxima da cor característica do queijo Prato comercial.

6. CONCLUSÃO

O teor de dienos aumentou com o tempo de armazenamento do queijo Prato. A adição de formulação de luteína e o tempo de estocagem do queijo Prato influenciaram o teor de peróxidos, o qual foi um pouco maior para o queijo adicionado de luteína. O teor de TBARS foi influenciado pela embalagem e luz; o queijo armazenado em embalagem transparente exposto a luz foi o que apresentou maiores teores de TBARS. Entretanto, a quantidade desses produtos de oxidação de gordura foi pequena em todos os queijos, indicando que a oxidação da gordura foi insuficiente para afetar a qualidade dos mesmos. Esses compostos foram originários da auto-oxidação do queijo, pois a formulação de luteína adicionada ao queijo Prato impediu a foto-oxidação da riboflavina. Não houve degradação da riboflavina durante os 56 dias de estocagem refrigerada do queijo com luteína, exposto à luz. Já nos queijos sem o corante luteína, a riboflavina foi foto-degradada. O tipo de embalagem não influenciou a estabilidade da luteína, que permaneceu praticamente inalterada durante a estocagem com exposição à luz. Este fato significa que toda a luteína suplementada ao queijo Prato estará disponível no produto durante a vida de prateleira, que é geralmente de 60 dias. A diminuição na quantidade de luteína adicionada pode ser uma boa opção para aumentar a aceitação sensorial e a intenção de compra do queijo Prato com luteína, que foi menor que a do queijo Prato comercial.

REFERÊNCIAS

ALVES, R. M.; JAIME, S. B. M. Embalagem para requeijão cremoso e outros tipos de requeijão. In: VAN DENDER, F. G. ^a **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: tecnologia de fabricação, controle do processo e aspectos de mercado.** Fonte Comunicações e Editora, São Paulo, Brasil, 2006, 391.

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

ANDERSEN, C. M.; VISHART, M.; HOLM, V. K. Application of fluorescence spectroscopy in the evaluation of light-induced oxidation in cheese. *J. Agric. Food Chem.* 53: 9985 – 9992, 2005.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis.** 15. ed. Washington, 1995.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis.** 14. ed. Arlington, VA: AOAC, 1984.

AURAND, L. W., BOONE, N.H., GIDDINGS, G. G. Superoxide and singlet oxygen in milk lipid peroxidation. *J. Dairy Sci.* 60: 363-369, 1977.

AURAND, L. W.; SINGLETON, J. A.; NOBLE, B. W. Photooxidation reaction in milk. *J. Dairy Sci* 49: 138 - 142, 1966.

BARBANO, D.M.; LYNCH, J.M.; FLEMING, J.R.; Direct and Indirect Determination of True Protein Content of Milk by Kjeldahl Analysis: Collaborative Study. *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 74:281-288, 1991.

BONE, R.A. *et al.* Analysis of the macular pigment by HPLC: Retinal distribution and age study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v.29, p.843-849, 1988.

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. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 31: 211-236, 1992.

BRAGAGNOLO, N.; DANIELSEN, B.; SKIBSTED, L. H. Effect of rosemary on lipid oxidation in pressure-processed, minced chicken breast during refrigerated storage and subsequent heat treatment. **European Food Research Technology**, 221, 610-615, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e o Regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel:** aprovado pela Instrução Normativa N°51 de 18/09/2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Prato:** aprovado pela Portaria N° 358 de 04/09/1997.

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

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.

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**. 70, 28 - 36, 2005.

CICHOSCKI, A.J. *et al.* Characterization of Prato cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: evolution of physical-chemical parameters and mineral composition during ripening. **Food Control**, v.13, p.329-336, 2002.

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

DIMICK, P. S. Photochemical effects on flavor and nutrients of fluid milk. **Can Inst Sci Technol J** 15: 247 – 256, 1982.

DOMINGOS, L. D. Estabilidade e qualidade de iogurte adicionado de luteína e validação de método para determinação de riboflavina em iogurte. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos/ Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

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. **J. Nutr.** 135, 2305–2312, 2005.

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

ERICKSON, M. C. CHEMICAL AND MICROBIAL STABILITY OF FLUID MILK IN RESPONSE TO PACKAGING AND DISPENSING. **International Journal of Dairy Technology**. V.50, p. 107-11, 1997.

FINE, S.L. *et al.* Age-related macular degeneration. **J. Med.**, v.342, p.483-492, 2000.

FOOTE, C. S. Photosensitized oxygenation and the role of singlet oxygen. **ACC. Chem. Res.** 1: 104-110, 1968.

HAMILTON, R. J.; ROSSELL, J. B.; HUDSON, B. J. F.; LÖLIGER, J.; In: Rancidity in Foods; **Applied Science Publishers LTD.**; London, 1983.

HOYLAND, D. V.; TAYLOR, A. J. A review of the methodology of the 2-thiobarbituric acid test. **Food Chemistry**, 40, 271–291, 1991.

HANDELMAN, G.J. *et al.* Carotenoids in the human macula and whole retina. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.29, p.850-855, 1988.

HAVAUX, M. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. **Trends in Plant Science**. v.3, p 147 - 151, 2003.

HIRAYAMA, O., NAKAMURA, K., HAMADA, S., KOBAYASI, Y. Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. **Lipids**. 29: 149-150, 1994.

INTERNATIONAL DAIRY FOOD (IDF). Anhydrous milkfat. Determination of peroxide value. Standard 74A. Brussels, Belgium: International Dairy Federation, 1991.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do IAL**. D. B. Rebocho (Ed.), São Paulo, 1985.

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.

KHACHIK, F., BEECHER, G.R., AND SMITH, J.C., Jr. Lutein, lycopene, and their oxidative metabolites in chemoprevention of cancer, **J. Cell. Biochem.**, 22, 236–246, 1995.

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. Lutein, zeaxanthin and the macular pigment, **Arch.Biochem. Biophys.**, 385, 28, 2001.

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.

LEE, S. H., MIN, D. B. Effects, quenching mechanism, and kinetics of carotenoids in chlorophyll-sensitized photooxidation of soybean oil. **J. Agric. Food. Chem.** 38: 1630-1634, 1990.

LUGASI, A.; LOSADA, V.; HÓVÁRI, J.; LEBOVICS, V.; JAKÓCZI, S.; AUBORG, S. Effect of pre-soaking whole pelagic fish in a plant extract on sensory and biochemical changes during subsequent frozen storage. **LWT Food Sci. Technol.**, 40, 930-936, 2007.

MACFIE, H.; BRATCHELL, N. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. **Journal of Sensory Studies**, v.4, n.2, p.129-148, 1989.

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.

MERCADANTE, A. M. Carotenoids in foods: sources and stability during processing and storage. In. SOCACIU, C. **Food Colorants – Chemical and Functional Properties**. 2008.

MINGUEZ-MOSQUERA, M. I.; HORNERO-MENDEZ, D; PEREZ-GALVEZ, A. Carotenoids and provitamin A in functional foods. In W. J. HURST (Ed.). **Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals** (p 101 – 157). Boca Raton, New York, Washington, DC:CRC Press, 2002.

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.

NUNES, I. L. Estudos de purificação, estabilidade oxidativa, encapsulamento e aplicação do licopeno como protetor da degradação de vitaminas em leite. **Tese de doutorado**. Universidade Estadual de Campinas – São Paulo, 2005.

OLIVEIRA, G.P.R. **Avaliação de milho e derivados de milho como fontes de luteína e zeaxantina**. Campinas, 2006. 55p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Engenharia de Alimentos Universidade Estadual de Campinas.

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

POTT, I.; MARX, M.; NEIDHART, S. MÜHLBAUER, W.; CARLE, R. Quantitative determination of β -carotene stereoisomers in fresh, dried, and solar-dried mangoes (*Mangifera indica* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.51, p 4527 – 4531, 2003.

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, n.1, p112-122, 1998

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.

SEDDON, J.M.; AJANI, U.A.; SPERDUTO, R.D. Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. **J. Am. Med. Assoc.**, v.272, p.1413-1420, 1994.

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.

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. **Ann. New York Acad. Sci.** 691: 10-19, 1993.

STONE, H.; SIDEL, J.L. Sensory evaluation practices. New York: **Academic Press**, 1993. 308p

STRATTON, S. P., SCHAEFER, W. H., LIEBLER, D. C. Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of β -caroten. **Chem. Res. Toxicol.** 6: 542-547, 1993.

SUBAGIO, A.; MORITA, N. Instability of carotenoids is a reason for their promotion on lipid oxidation. **Food Research International**, 34, 183–188, 2001.

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.

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 α -, β_H - e β_L - crystallins on the eye lens. **Photochem Photobiol.** 77: 535 - 540, 2003.

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

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Dairy chemistry and physics.** Nova York: John Wiley e Sons, 1984.

WOLD, J. P., JORGENSEN, K., LUNDBY, F. Nondestructive measurement of light-induced oxidation in dairy products by fluorescence spectroscopy and imaging. **J. Dairy Sci.** 85: 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. **Int. Dairy J.** 16: 1218 – 1226, 2006.

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

ANEXO 1

DSM Nutritional Products Product Data Sheet



Lutein 20% FS

Description

Lutein 20% FS is a red, viscous oil, containing micronized crystals of lutein (extracted from *Tagetes erecta*) dispersed in corn oil. *dl*- α -Tocopherol is added as an antioxidant.

Product identification

Product code: 50 0074 2

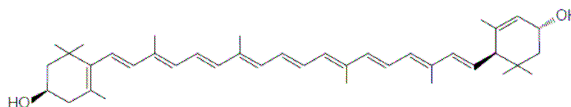
Chemical names: (3*R*,3'*R*,6'*R*)- β , ϵ -carotene-3,3'-diol; 3,3'-dihydroxy- α -carotene

Synonyms: lutein

CAS No.: 127-40-2

Empirical formula: C₄₀H₅₆O₂

Molecular mass: 568.88 g/mol



Specifications

Appearance:	red, viscous oil
Light absorption (in ethanol): Maximum absorption:	at 444–448 nm
Lutein content:	min. 20%
Zeaxanthin content:	max. 2.0%

Stability and storage

Lutein 20% FS is sensitive to air, heat and light. The product may be stored for 36 months from the date of manufacture in the unopened original container and at a temperature below 15 °C. The 'best use before' date is printed on the label. Keep container tightly closed. Before each use, heat the closed container in a water bath at 40 °C under gentle shaking or stirring. Once opened, use contents quickly.

Solubility

Lutein 20% FS is slightly soluble in oils and fats.

Uses

For soft gelatin capsules.

For fortification of foods and beverages.

DSM Nutritional Products

Product Data Sheet



Compendial compliance

The lutein (extracted from *Tagetes erecta*) used in this form meets all requirements of JECFA.

Safety

This product is safe for the intended use. Avoid ingestion or direct contact by applying suitable protective measures and personal hygiene.

For full safety information and necessary precautions, please refer to the respective DSM Material Safety Data Sheet.

Legal notice

The information given in this publication is based on our current knowledge and experience, and may be used at your discretion and risk. It does not relieve you from carrying out your own precautions and tests. We do not assume any liability in connection with your product or its use. You must comply with all applicable laws and regulations, and observe all third party rights.

DSM Nutritional Products Ltd
Product Management
Building 241
PO Box 2676
CH-4002 Basel
Switzerland

Tel.: +41 (0) 61 815 8899
Fax: +41 (0) 61 815 8390

Internet www.dsmnutritionalproducts.com

ANEXO 2



FICHA DE INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA DE PRODUTO QUÍMICO - FISPQ

Revisão: 03

21 de Agosto de 2009

1. IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO E DA EMPRESA

Produto	ALKEST TW 80 K
Empresa	OXITENO NORDESTE SA INDUSTRIA E COMERCIO
	OXITENO S/A INDUSTRIA E COMERCIO
Endereço	Av. Brigadeiro Luiz Antonio, 1343-7º andar
	BELA VISTA
#	São Paulo - SP
	01317-910
# Telefone	(11) 4478-3212
# Fax	(11) 3285-5094
# Telefone para Emergências (24 horas)	Mauá - SP / (11) 4478-3212
#	Tremembé - SP / (12) 3672-3578
#	Camaçari - BA / (71) 3634-7658
#	Triunfo - RS / (51) 3457-5134
#	Suzano - SP / (11) 4745-8741

2. COMPOSIÇÃO E INFORMAÇÕES SOBRE OS INGREDIENTES

# Tipo de Produto	Substância.
Nome Químico Comum ou Genérico	Monooleato de Sorbitan Etoxilado
Sinônimos	Monooleato de sorbitan etoxilado 20 EO; Monooleato de sorbitan (20) polioxietileno; Polioxietileno (20) monooleato de sorbitana; PEG (20) sorbitan monooleato; Polisorbato 80; Polysorbate 80 (INCI - CTFA).
NºCAS	9005-65-6.
# NºEINECS	500-019-9.
Ingredientes Perigosos e Faixas de Concentração	Não existem ingredientes perigosos.
Natureza Química	Éster etoxilado de sorbitan.
Outras Informações	O produto está citado no TSCA Inventário.

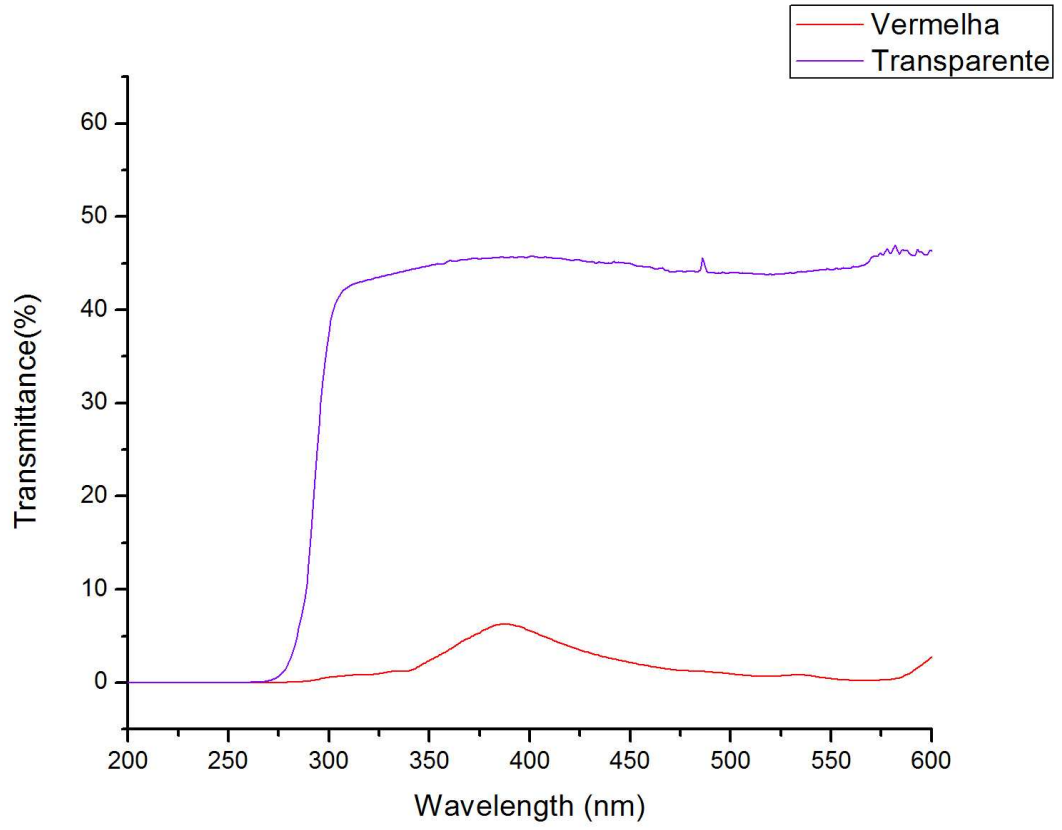
9. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Aspecto	Líquido viscoso amarelo-esverdeado.
# pH	5,5 a 7,2 (sol. 1% / 25 °C).
# Ponto de Fulgor	> 149 °C (copo aberto).
# Pressão de Vapor	0,001 kPa (25 °C).
Densidade de Vapor	45 (em relação ao ar).
# Densidade	1073 kg/m ³ (25 °C).
# Solubidade	Solúvel em água (20 °C por 1 hora / concentração de 0,5%).
# Viscosidade	600 mPa.s (25 °C).

10. ESTABILIDADE E REATIVIDADE

Condições de Instabilidade	Estável nas condições normais de uso e estocagem.
Condições a Serem Evitadas	Altas temperaturas, fontes de ignição e exposição prolongada ao ar.
Materiais ou Substâncias Incompatíveis	Evitar contato com oxidantes fortes e compostos muito reativos com grupos hidroxila.
# Produtos Perigosos da Decomposição	Em caso de combustão pode gerar monóxido de carbono, além de CO ₂ .

ANEXO 3



ANEXO 4

Teores de carotenóides totais no queijo Prato com e sem adição de formulação de luteína, acondicionado em diferentes embalagens, na ausência e presença de luz (n=2)*.

Dias	Carotenóides Totais (µg/g)															
	Sem Luteína								Com luteína							
	Transparente				Vermelho				Transparente				Vermelho			
	Com luz	DP	Sem luz	DP	Com luz	DP	Sem luz	DP	Com luz	DP	Sem luz	DP	Com luz	DP	Sem luz	DP
0	0,24	0,08	0,26	0,10	0,33	0,14	0,23	0,04	670,81	4,19	694,32	29,05	670,81	4,19	694,32	29,05
14	0,18	0,05	0,20	0,02	0,22	0,10	0,26	0,01	667,89	48,39	648,88	74,45	665,59	12,06	679,65	4,68
28	0,19	0,08	0,21	0,10	0,24	0,00	0,21	0,02	705,13	20,11	704,60	6,31	706,91	28,13	703,07	37,14
42	0,31	0,11	0,34	0,07	0,38	0,06	0,34	0,21	705,62	50,17	723,72	56,79	714,10	68,25	701,64	73,11
56	0,30	0,07	0,27	0,01	0,28	0,05	0,31	0,01	717,40	37,32	736,79	4,40	712,75	38,42	709,47	26,40

*Médias e desvio padrão de análises em triplicata; n= n°de replicatas de processamento .