



Ana Carolina Borges de Urzêdo

**FOTO-OXIDAÇÃO DO LEITE MICROFILTRADO  
PASTEURIZADO: INFLUÊNCIA DO TIPO DE  
EMBALAGEM E INTENSIDADE DA LUZ.**

**CAMPINAS  
2013**





**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**Ana Carolina Borges de Urzêdo**

**FOTO-OXIDAÇÃO DO LEITE MICROFILTRADO  
PASTEURIZADO: INFLUÊNCIA DO TIPO DE  
EMBALAGEM E INTENSIDADE DA LUZ.**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Walkiria Hanada Viotto

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA ANA CAROLINA BORGES DE URZÊDO, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. WALKIRIA HANADA VIOTTO.

---

WALKIRIA HANADA VIOTTO

**CAMPINAS  
2013**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Claudia Aparecida Romano de Souza - CRB 8/5816

Ur9f Urzêdo, Ana Carolina Borges, 1980-  
Foto-oxidação do leite microfiltrado pasteurizado : influência do tipo de embalagem e intensidade da luz / Ana Carolina Borges de Urzêdo. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Walkiria Hanada Viotto.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Oxidação de proteína. 2. Riboflavina. 3. Análise sensorial. 4. Vida de prateleira. I. Viotto, Walkiria Hanada. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Photo-oxidation of microfiltered pasteurized milk : influence of the type of packaging and the light intensity

**Palavras-chave em inglês:**

Protein oxidation

Riboflavin

Sensory analysis

Shelf life

**Área de concentração:** Tecnologia de Alimentos

**Titulação:** Doutora em Tecnologia de Alimentos

**Banca examinadora:**

Walkiria Hanada Viotto [Orientador]

Adriana Zerlotti Mercadante

Celso José de Moura

Leila Maria Spadoti

Renato Atílio Jorge

**Data de defesa:** 25-10-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Tecnologia de Alimentos

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

**Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante  
Membro Titular (FEA/UNICAMP)**

---

**Prof. Dr. Celso José de Moura  
Membro Titular (ESCOLA DE AGRONOMIA/ UFG)**

---

**Profa. Dra. Leila Maria Spadoti  
Membro Titular (ITAL/TECNOLAT)**

---

**Prof. Dr. Renato Atilio Jorge  
Membro Titular (INSTITUTO DE QUÍMICA/UNICAMP)**

---

**Profa. Dra. Helena Maria André Bolini  
Membro Suplente (FEA/UNICAMP)**

---

**Profa. Dra. Mirna Lucia Gigante  
Membro Suplente (FEA/UNICAMP)**

---

**Prof. Dr. Paulo Cesar Stringheta  
Membro Suplente (UFV)**

A uma pessoa  
que não estava nos meus planos, mas que  
estava no plano de Deus ... a você **Clylton** que passou a ser  
uma pessoa muito especial para mim, por se tornar o meu esposo...  
Que sempre estive ao meu lado em todas as etapas deste doutorado...

Do início ao fim... Desde os momentos de tristezas, desânimos,  
frustrações e exaustão física e mental ... até os momentos  
de conquistas, entretenimento e de grandes alegrias...

**Tenho certeza que foi coisa de Deus encontrar**

**você aqui e que sem você ao meu lado,**

**este doutorado teria sido**

**muito mais**

**difícil**

...

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por colocar as pessoas certas em minha vida.

Ao professor Celso José de Moura, que me incentivou para fazer o doutorado na UNICAMP seguido do mestrado. E principalmente, pela sua alegria ao saber que eu havia passado na prova de seleção, que me contagiou e me fez acreditar mais em mim mesma.

Aos meus avôs paternos e à madrinha “Toninha” pelo incentivo e apoio em toda minha carreira profissional.

Ao meu pai, pelo apoio financeiro no começo do curso, quando eu ainda não tinha bolsa.

Ao meu esposo Clylton, por ter suprido a minha solidão nesta cidade... por ter levado lanche pra mim quando fiquei até tarde na UNICAMP fazendo análises... por aliviar as minhas dores nas pernas de trabalhar o dia todo de pé... pelas orientações de experiência de vida, de trabalho e de relacionamento interpessoal... por ter me escutado quando não estava bem... por ter me dado carinho e colo quando precisei... e enfim, por ter me proporcionado os melhores momentos da minha vida durante a exaustiva jornada deste doutorado....

Aos meus familiares e amigos que me apoiaram e incentivaram na minha decisão.

À professora Walkiria, pela orientação, paciência, parceria, compreensão e amizade.

À Veridiana Antunes, pela parceria do trabalho em conjunto que realizamos, e principalmente pela sua amizade.

A todos os outros “irmãos de leite”: Lígia, Clarice, Diogo, Mônica, Cecília e Karina por toda ajuda prestada e pela amizade.

À Bete, técnica do laboratório de leite, pela ajuda e orientações nas análises.

À Renata, técnica do laboratório de instrumentação, pela ajuda com a análise de cor.

Ao professor Renato Atílio Jorge e à Cláudia Martelli, pela ajuda nas análises de espectroscopia de fluorescência.

À CAPES pela bolsa concedida.

Aos membros da banca, pelas correções sugeridas.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

**Muito Obrigada!**

“Viver é enfrentar um problema atrás do outro.  
O modo como você o encara é que faz a diferença.”

Benjamin Franklin

“... Tudo é do pai, toda honra e toda glória  
É dele a vitória, alcançada  
em minha vida...”

Frederico Cruz

## RESUMO GERAL

A foto-oxidação do leite é o fator determinante na vida de prateleira do leite microfiltrado pasteurizado. A exposição do leite à luz, nas gôndolas dos supermercados, desencadeia a foto-oxidação da riboflavina e das proteínas do leite, provocando mudanças na cor e formação de *off-flavors*. O objetivo do trabalho foi verificar, em condições reais, a influência do tipo de embalagem e da intensidade da luz na degradação da riboflavina, formação de lumicromo, oxidação de proteína, cor e vida de prateleira do leite desnatado microfiltrado pasteurizado. Leite desnatado microfiltrado pasteurizado foi acondicionado em garrafas de vidro e de polietileno de alta densidade, e armazenados no escuro (controle) e sob incidência de luz (500 e 1200 lux), durante 14 dias de estocagem refrigerada. Análises de espectroscopia de fluorescência da riboflavina, lumicromo, triptofano e ditirosina e análise de cor instrumental foram realizadas para acompanhar a foto-oxidação dos componentes do leite. Para estimar a vida de prateleira do leite microfiltrado pasteurizado, sob diferentes condições de luz e embalagem, contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios e análise sensorial com assessores treinados, teste de aceitação e intenção de compra foram realizados durante o tempo de armazenamento refrigerado. Assessores foram treinados para avaliação da cor, aroma e sabor característicos de leite desnatado e de leite desnatado oxidado. Aos 14 dias de estocagem refrigerada, 76,1% da riboflavina foi degradada no leite exposto à radiação de 500 lux. Já a 1200 lux, esse valor foi de 86,4%. A degradação da riboflavina, a formação de lumicromo e a fotodegradação do triptofano foram maiores e mais rápidas quando a intensidade de luz foi mais intensa (1200 lux). Durante o armazenamento refrigerado, a oxidação das proteínas resultou em desnovelamento da estrutura terciária, e conseqüentemente, em exposição e posterior degradação do triptofano. No período estudado, houve somente formação de ditirosina para os leites submetidos à intensidade de luz mais intensa (1200 lux). A vida de prateleira dos leites armazenados no escuro (controle) foi de 10 a 14 dias. O aparecimento do sabor oxidado, proveniente da foto-oxidação dos componentes do leite, foi o parâmetro determinante para o fim da vida de prateleira dos leites armazenados sob luz. O tipo de embalagem somente influenciou a vida de prateleira do leite, quando a intensidade de

exposição à luz foi mais baixa (500 lux). Nessa intensidade de radiação luminosa, a vida de prateleira do leite pasteurizado aumentou de 4-6 dias para 10-13 dias, quando a embalagem de vidro foi substituída pela de polietileno.

**Palavras-chave:** oxidação de proteína; degradação de riboflavina; análise sensorial; vida de prateleira

## SUMMARY

Photo-oxidation of milk is probably the main cause for the end of shelf life of a microfiltered pasteurized milk. Milk is inevitably exposed to light on the supermarket shelves, which triggers the photo-oxidation of riboflavin and milk proteins, affecting the sensory quality with changes in color and formation of off-flavors. The objective was to verify, in real conditions, the influence of the type of packaging and the light intensity on the riboflavin degradation, protein oxidation, color, shelf life of microfiltered pasteurized skim milk. After processing, milk was packaged in glass and high density polyethylene bottles and stored in the dark (control) and under influence of light (500 and 1200 lux), during 14 days of refrigerated storage. Analyses of fluorescence spectroscopy of riboflavin, lumicrome, tryptophan and dityrosine and instrumental color were performed to monitor the photo-oxidation of milk components. The shelf life of pasteurized microfiltered skim milk, under different light conditions and packaging was estimated by standard plate count of aerobic mesophilic and sensory analysis with trained assessors, acceptance testing, and purchase intent, during refrigerated storage time. Assessors were trained to evaluate sensorially the color, aroma and flavor of skim milk and oxidized skim milk. At 14 days of refrigerated storage, 76.1% of riboflavin was degraded in milk exposed to radiation of 500 lux. However, at 1200 lux, degradation of riboflavin reached 86.4% of its initial content in milk. Riboflavin degradation, lumicrome and tryptophan formation were higher and faster when light intensity was more intense (1200 lux). During storage time, the oxidation of proteins resulted in the tertiary structure unfolding, and exposure and subsequent degradation of tryptophan. During this period of time, there was formation of dityrosine only for the milks exposed to more intense light radiation (1200 lux). The shelf life of milk stored in the dark (control) was 10-14 days. The development of oxidized flavor, derived from the photo-oxidation of milk components, was the main parameter for determining the ending of the shelf life of milk stored under light. Packaging material influenced the milk shelf life when the intensity of light was lower (500 lux). In this condition, the shelf life of pasteurized milk increased from 10-13 days to 4-6 days when the glass container was replaced by polyethylene bottle.

**Keywords:** protein oxidation; riboflavin degradation; sensorial analysis; shelf life

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1_</b> Mecanismos Tipo I e Tipo II de foto-oxidação de leite.....	7
<b>Figura 2_</b> Garrafas de leite pasteurizado muito próximas da fonte de luz, na gôndola de um supermercado de Campinas.....	30
<b>Figura 3_</b> Efeito da interação intensidade luminosa e tempo de estocagem no teor de riboflavina em leite desnatado microfiltrado pasteurizado.....	31
<b>Figura 4_</b> Degradação da riboflavina em leite microfiltrado pasteurizado acondicionado em diferentes tipos de embalagens e expostos a diferentes intensidades de luz (emissão 525 nm).....	32
<b>Figura 5_</b> Formação de lumicromo em leite desnatado microfiltrado pasteurizado (excitação a 365 nm), ao longo do tempo de armazenamento.....	33
<b>Figura 6_</b> Degradação de triptofano (excitação a 280 nm) de leite desnatado microfiltrado pasteurizado, ao longo do tempo de armazenamento.....	35
<b>Figura 7_</b> Formação de ditirosina em leites desnatados microfiltrados pasteurizados (excitação a 325 nm), acondicionados em garrafas de vidro e de polietileno, ao longo do tempo de armazenamento .....	37
<b>Figura 8_</b> Efeito da intensidade luminosa (A) e do tempo (B) no parâmetro de cor Luminosidade ( $L^*$ ) do leite desnatado microfiltrado pasteurizado.....	38
<b>Figura 9_</b> Efeito da interação da embalagem e da intensidade da luz (A) e efeito da interação da intensidade luminosa e do tempo de estocagem no parâmetro de cor croma do leite desnatado microfiltrado pasteurizado (B).....	39
<b>Figura 10_</b> Efeito da interação da intensidade luminosa e do tempo de estocagem no parâmetro cor hue do leite desnatado microfiltrado pasteurizado.....	40
<b>Figura 11_</b> Atributos sensoriais de leite desnatado microfiltrado pasteurizado, ao longo do tempo de estocagem.....	44
<b>Figura 12_</b> Histograma de intenção de compra do leite desnatado microfiltrado pasteurizado.....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1_</b> Seleção dos assessores.....	24
<b>Tabela 2_</b> Caracterização físico-química e microbiológica do leite desnatado microfiltrado pasteurizado.....	28
<b>Tabela 3_</b> Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para teores de riboflavina dos leites desnatados microfiltrados pasteurizados.....	29
<b>Tabela 4_</b> Condições de exposição à luz de leite pasteurizado em oito supermercados de Campinas .....	30
<b>Tabela 5_</b> Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para o parâmetro de cor luminosidade ( $L^*$ ) dos leites desnatados microfiltrados pasteurizados.....	38
<b>Tabela 6_</b> Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para os parâmetros de cor croma e hue.....	39
<b>Tabela 7_</b> Médias de intensidade de aroma de leite desnatado e de leite desnatado oxidado, avaliadas por assessores treinados.....	41
<b>Tabela 8_</b> Médias de intensidade de sabor de leite desnatado e de leite desnatado oxidado, avaliadas por assessores treinados.....	41
<b>Tabela 9_</b> Médias de intensidade de cor de leite desnatado e de leite desnatado oxidado, avaliadas por assessores treinados.....	42
<b>Tabela 10_</b> Médias de Aceitação em relação à Aparência (Cor) e Aroma.....	45
<b>Tabela 11_</b> Médias de Aceitação em relação ao Sabor e Impressão global.....	46
<b>Tabela 12_</b> Contagem padrão em placas de mesófilos aeróbios/mL de leite desnatado microfiltrado pasteurizado.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ANOVA:** Análise de variância.

**AOAC:** *Association of Official Analytical Chemists* (Associação de Químicos Analíticos Oficiais).

**APHA:** *American Public Health Association* (Associação de Saúde Pública Americana).

**Aroma LD:** Aroma de Leite Desnatado.

**Aroma LDO:** Aroma de Leite Desnatado Oxidado.

**CEP:** Comitê de Ética em Pesquisa.

**CIELAB:** Sistema de medir cor de objetos baseado nos pânteros de cor  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ .

**Cor LD:** Cor de Leite Desnatado.

**Cor LDO:** Cor de Leite Desnatado Oxidado.

**DOPA:** 3,4-Dihidroxifenilalanina.

**DTA/FEA:** Departamento de Tecnologia de Alimentos/ Faculdade de Engenharia de Alimentos.

**EUA:** Estados Unidos da América.

**FCM:** Faculdade de Ciências Médicas.

**gl:** grau de liberdade.

**HPLC:** *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

**HTST:** *High temperature short time* (Temperatura alta, tempo curto).

**LTLT:** *Low temperature long time* (Temperatura baixa, tempo longo).

**MF:** Microfiltração

**NMP:** Número mais provável.

**NNC:** Nitrogênio não caseico.

**NT:** Nitrogênio Total.

**p:** probabilidade.

**P1200:** leite acondicionado em garrafas de polietileno e armazenados a 1200 lux.

**P500:** leite acondicionado em garrafas de polietileno e armazenados a 500 lux.

**PE:** leite acondicionado em garrafas de polietileno e armazenados no escuro (controle).

**PEAD:** Polietileno de alta densidade.

**pFa:** probabilidade de F amostra.

**pFr:** probabilidade de F repetição.

**QM:** Quadrado médio.

**RF:** Riboflavina.

**RBP:** *Riboflavin binding protein* (proteína que se liga à riboflavina).

**RH:** molécula biológica.

**Sabor LD:** Sabor de Leite desnatado.

**Sabor LDO:** Sabor de Leite desnatado oxidado.

**SP:** São Paulo.

**UFC/mL:** Unidade formadora de colônias por mililitro.

**UHT:** *Ultra High Temperature* (Temperatura ultra alta).

**UNICAMP:** Universidade Estadual de Campinas.

**UV:** Ultravioleta.

**V1200:** leite acondicionado em garrafas de vidro e armazenados a 1200 lux.

**V500:** leite acondicionado em garrafas de vidro e armazenados a 500 lux.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1 LEITE MICROFILTRADO PASTEURIZADO .....	3
2.2 FOTO-OXIDAÇÃO DO LEITE PASTEURIZADO.....	4
<b>2.2.1 Fotossensibilidade do leite</b> .....	4
<b>2.2.2 Mudanças sensoriais induzidas pela luz em leite</b> .....	5
<b>2.2.3 Mecanismo de reação de foto-oxidação em leite</b> .....	7
<b>2.2.4 Foto-oxidação de proteínas</b> .....	9
2.3 AVALIAÇÃO DA FOTO-OXIDAÇÃO DE LEITE .....	12
2.4 CONTROLE DA FOTO-OXIDAÇÃO.....	14
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	17
3.1 PROCESSAMENTO DO LEITE DESNATADO MICROFILTRADO PASTEURIZADO .....	17
3.2 CARACTERIZAÇÃO DO LEITE DESNATADO MICROFILTRADO PASTEURIZADO.....	18
3.3 MUDANÇAS QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO LEITE DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO.....	19
<b>3.3.1 Degradação da riboflavina e formação do lumicromo</b> .....	19
<b>3.3.2 Oxidação de proteínas</b> .....	20
<b>3.3.3 Desenvolvimento de micro-organismos mesófilos</b> .....	21
3.4 DETERMINAÇÃO DE COR INSTRUMENTAL.....	21
3.5 AVALIAÇÃO SENSORIAL E INTENÇÃO DE COMPRA.....	22
<b>3.5.1 Caracterização sensorial de cor, aroma e sabor com assessor     treinado</b> .....	22
3.5.1.1 <i>Recrutamento e pré-seleção</i> .....	22
3.5.1.2 <i>Treinamento</i> .....	23

3.5.1.3 <i>Seleção final</i> .....	23
3.5.1.4 <i>Teste sensorial com as amostras</i> .....	24
<b>3.5.2 Aceitação e intenção de compra</b> .....	25
3.6 DETERMINAÇÃO DE VIDA DE PRATELEIRA DO LEITE DESNATADO MICROFILTRADO PASTEURIZADO.....	25
3.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	26
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	28
4.1 CARACTERÍSTICAS DO LEITE DESNATADO MICROFILTRADO PASTEURIZADO .....	28
4.2 MUDANÇAS DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO .....	29
<b>4.2.1 Degradação da riboflavina e formação de lumicromo</b> .....	29
<b>4.2.2 Oxidação de proteínas</b> .....	34
4.2.2.1 <i>Triptofano</i> .....	34
4.2.2.2 <i>Ditirosina</i> .....	36
<b>4.2.3 Cor de leite desnatado microfiltrado pasteurizado</b> .....	38
4.3 CARACTERIZAÇÃO SENSORIAL DE COR, AROMA E SABOR COM ASSESSOR TREINADO.....	40
4.4 ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA .....	45
4.5 VIDA DE PRATELEIRA DO LEITE DESNATADO MICROFILTRADO PASTEURIZADO .....	48
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	49
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	51
<b>ANEXOS</b> .....	57

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O leite microfiltrado pasteurizado é um produto intermediário entre o pasteurizado e o longa vida (UHT), apresentando cerca de 2-3 semanas de vida de prateleira, sob armazenamento refrigerado (LORENZEN et al., 2011; RYSSTAD & KOLSTAD, 2006). O fim da vida de prateleira de um leite pasteurizado é, geralmente, determinado pela deterioração microbiana. Entretanto, para o leite microfiltrado pasteurizado, as mudanças no sabor e aroma estão mais relacionadas às reações químicas, como a foto-oxidação. As reações de foto-oxidação oxidam as proteínas, lipídeos e vitaminas do leite, o que afeta a qualidade sensorial com mudanças na cor e formação de *off-flavors* (VAN AARDT et al., 2005a).

O leite é susceptível à luz por conter alta quantidade de riboflavina (1,75 mg por litro de leite) (BRADLEY; KIM; MIN, 2006). A riboflavina sensibilizada pela luz transfere a energia da luz para outras moléculas, como o oxigênio dissolvido no leite e assim, inicia as reações de foto-oxidação no leite (BORLE; SIEBER; BOSSET, 2001). O leite desnatado é mais susceptível à foto-oxidação por dispersar menos a luz (BORLE; SIEBER; BOSSET, 2001) e possuir proporcionalmente maior teor de proteínas, as quais são oxidadas mais rapidamente do que os lipídeos (MORTENSEN et al., 2004). A fotodegradação da riboflavina em lumicromo e lumiflavina (ANDERSEN & MORTENSEN, 2008), e a fotodegradação do triptofano e a formação de ditirosina (MIN & BOFF, 2002) são indicativos da foto-oxidação do leite.

A ocorrência e a velocidade das alterações decorrentes da foto-oxidação do leite podem ser influenciadas pela intensidade da luz, pelo tipo de embalagem e pelo tempo de exposição à luz do leite (SCHMIDT et al., 2012; MESTDAGH et al., 2005). A exposição do leite à luz é inevitável durante o processo, manuseio e comercialização (INTAWIWAT, et al., 2010; LARSEN; TELLEFSEN; DAHL, 2009). Nos supermercados, a intensidade de luz, a que o leite é exposto, nem sempre é a mais adequada. Uma pesquisa prévia sobre a intensidade de luz nas gôndolas de leite pasteurizado foi realizada em oito supermercados da cidade de Campinas, SP- Brasil, para conhecimento da realidade e reprodução de experimentos em condições reais. Nesses estabelecimentos, a intensidade da luz variou de 350 a 5300 lux, sendo, na sua maioria, de 500 lux.

As embalagens com barreira à luz e ao oxigênio podem limitar os sabores ativados pela luz (VAN AARDT et al., 2005a). Atualmente, no Brasil, as embalagens mais comuns para envasar leite pasteurizado são sacos de polietileno pigmentado (barriga mole), embalagens cartonadas multicamadas e garrafas de polietileno de alta densidade. Recentemente, empresas brasileiras de embalagens têm proposto o retorno do vidro para envase de leite pasteurizado. As embalagens de vidro garantem a sustentabilidade (podem ser recicladas infinitamente), são inertes (não mudam o sabor do produto) e proporcionam uma percepção *premium* do leite, pois o consumidor pode analisar o que está comprando. No entanto, a embalagem de vidro não possui barreira à luz.

O objetivo do trabalho foi verificar, em condições reais, a influência do tipo de embalagem e da intensidade da luz na degradação da riboflavina, na formação de lumicromo, na oxidação de proteína pela degradação de triptofano e formação de ditirosina, nas mudanças de cor instrumental e na vida de prateleira do leite desnatado microfiltrado pasteurizado, acondicionado em garrafas de vidro e de polietileno de alta densidade, armazenado no escuro (controle), a 500 e a 1200 lux.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 LEITE MICROFILTRADO PASTEURIZADO

A qualidade e a vida de prateleira de um leite pasteurizado dependem muito da contagem microbiológica inicial do leite cru (SCHMIDT et al., 2012). Em países onde o leite possui baixa contagem inicial, a vida de prateleira do leite pasteurizado distribuído e mantido sob refrigeração pode chegar a até 18 dias, mantendo seu sabor natural e fresco (PAFYLIAS et al., 1996). Se o leite for microfiltrado antes da pasteurização pode ter uma vida de prateleira de até 35 dias (EINO, 1997). No Brasil, o leite pasteurizado, mantido sob refrigeração, apresenta vida de prateleira de no máximo oito dias (leite pasteurizado tipo A).

O leite pasteurizado se deteriora rapidamente pelo crescimento de micro-organismos psicrótróficos e/ou outros deteriorantes. Há várias propostas para estender a vida de prateleira do leite pasteurizado, como os métodos de ultrapasteurização, UHT, bactofugação, microfiltração (MF) e microfiltração aliada à pasteurização (RYSSTAD & KOLSTAD, 2006). A microfiltração aliada à pasteurização tem uma redução de 3 log de esporos (RYSSTAD & KOLSTAD, 2006), pode reduzir de 92,5-99,5% as células somáticas (SANTOS et al., 2006) e de 3-6 ciclos log de bactérias, o que geralmente permite uma vida de prateleira estendida de 2-3 semanas, podendo chegar a 35 dias, sob armazenamento refrigerado (ELWELL & BARBANO, 2006; HOFFMANN et al., 2006; LORENZEN et al., 2011; RYSSTAD & KOLSTAD, 2006; SCHMIDT et al., 2012).

A proposta de aumentar a vida de prateleira do leite apenas com microfiltração não é permitida no Brasil, porque uma porcentagem minoritária de micro-organismos, podendo ser patogênicos, permanecerá no leite microfiltrado (permeado). É indispensável submetê-lo a um tratamento térmico posterior que assegure a ausência de micro-organismos patogênicos no produto final (BINETTI; BAILO; REINHEIMER, 2001; RYSSTAD & KOLSTAD, 2006). A microfiltração seguida da pasteurização associa as vantagens de maior qualidade sensorial em relação ao UHT e esterilizado, com a praticidade de um produto de vida de prateleira mais longa do que o produto pasteurizado (SABOYA & MAUBOIS, 2000).

Os produtos lácteos com maior vida de prateleira estão disponíveis na América do Norte desde o início dos anos sessenta, principalmente nos EUA e no Canadá (HENYON, 1999). Microfiltração tem sido usada comercialmente no Canadá pela Natrel (uma divisão da cooperativa Agropur, Longueuil, Quebec) e no Reino Unido pela Cravendale (uma subsidiária da Arla Foods, Leeds). Os produtos apresentam sabor fresco, qualidade nutricional e vida de prateleira estendida (ELWEL & BARBANO, 2006). Na França, o leite microfiltrado é cru e apenas o creme sofre um tratamento térmico. Este leite, se armazenado a 4-6 °C tem uma vida de prateleira de 15 dias. Na Escandinávia, Canadá e Reino Unido, o leite além de ser microfiltrado, é pasteurizado pelo processo HTST (72 °C/15 s), tendo uma vida útil de 35 dias. Estes leites microfiltrados têm grande aceitação no mercado por não apresentar sabor de cozido, como ocorre com o leite UHT, e por possuir vida de prateleira maior do que o leite pasteurizado (EINO, 1997).

## 2.2 FOTO-OXIDAÇÃO DO LEITE PASTEURIZADO

### 2.2.1 Fotossensibilidade do leite

O leite e os produtos lácteos são altamente sensíveis à luz, por conter alta quantidade de riboflavina (1,75mg por litro de leite) (BRADLEY; KIM; MIN, 2006). A riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>) é um forte sensibilizador, que induz as reações de foto-oxidação, capaz de ser facilmente reduzido e oxidado por receber e doar átomos de hidrogênio ou elétron. A riboflavina pode existir na forma catiônica (RFH<sub>2</sub><sup>+</sup>) a baixo pH (<4,0), na forma neutra (RFH) a pH neutro e, na forma aniônica (RF<sup>-</sup>) a alto pH (>9,7) (CHOE; HUANG; MIN, 2005). A riboflavina não induz a foto-oxidação no comprimento de onda da luz vermelha, pois não atua como sensibilizador em comprimentos de onda maiores do que 500 nm, uma vez que não absorve luz nesta faixa (WOLD et al., 2006). Alguns autores (AIRADO-RODRÍGUEZ et al., 2011; MORTENSEN; SORENSEN; STAPELFELDT, 2003; WEBSTER et al., 2009; WOLD et al., 2006) lançam a hipótese da oxidação induzida pela luz poder ser iniciada por outra rota que não seja a degradação da riboflavina. Porfirinas e clorofilas, como sensibilizadores, poderiam ser uma rota alternativa para iniciação da oxidação induzida pela luz em produtos lácteos. Os compostos clorofílicos e

porfirínicos são os principais responsáveis pela foto-oxidação do leite quando este é exposto à luz de comprimento de onda maior do que 500 nm (INTAWIWAT et al., 2010).

Além da riboflavina e dos compostos clorofílicos e porfirínicos, há outros fatores que influenciam na fotossensibilidade do leite, como o teor de gordura, o tratamento térmico e a presença de íons metálicos e agentes redutores. Quanto menor o teor de gordura, menor a dispersão da luz na faixa visível e mais susceptível à foto-oxidação, o que explica a alta sensibilidade do leite desnatado em relação à luz. Quanto mais severo o tratamento térmico, maior a produção de agentes antioxidantes contendo enxofre. Íons metálicos de transição ( $\text{Fe}^{3+/2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+/1+}$ ) aumentam e agentes redutores ( $\alpha$ -tocoferol ou ácido ascórbico) diminuem a sensibilidade do leite em relação ao oxigênio e à luz (BORLE; SIEBER; BOSSET, 2001). A temperatura de estocagem não afeta a fotodegradação do leite porque os processos fotoquímicos, em geral, necessitam de baixa energia de ativação (MORTENSEN; SORENSEN; STAPELFELDT, 2003).

### **2.2.2 Mudanças sensoriais induzidas pela luz em leite**

Os *off-flavors* de leite induzidos pela luz têm sido um problema reconhecido na indústria láctea (MIN & BOFF, 2002). O sabor do leite exposto à radiação luminosa muda com o tempo devido à diferença na velocidade de reação de formação de diferentes tipos de sabor. Inicialmente, o sabor induzido pela luz, proveniente da oxidação protéica, predomina rapidamente e é detectado após curta exposição à luz, pois a reação de oxidação de proteína não tem tempo de indução (MORTENSEN et al., 2004). Desta forma, os compostos voláteis (metional e dimetildissulfíto) resultantes da exposição do leite por 10 horas, estão associados à oxidação de proteínas, conferindo ao leite o sabor induzido pela luz (VAN AARDT et al., 2005a,b). O sabor metálico ou de papelão, o qual aparece após uma exposição mais prolongada à luz, está relacionado a compostos voláteis associados à oxidação de ácidos graxos insaturados da fração lipídica, principalmente de fosfolipídios (BORLE; SIEBER; BOSSET, 2001; SKIBSTED, 2000; VAN AARDT et al., 2005a,b). Marsili (1999) observou que o sabor induzido pela luz se desenvolveu durante os dois ou

três dias de estocagem do leite, enquanto o sabor metálico ou de papelão apareceu depois de dois dias de estocagem e não desapareceu até o final da estocagem do produto.

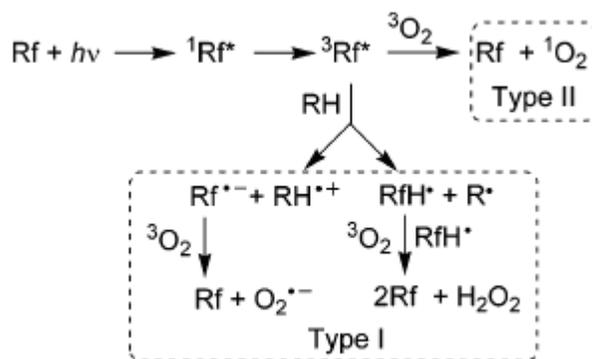
O defeito de sabor do leite denominado de sabor da “luz do sol”, ou sabor de “pena queimada”, ou sabor ativado pela luz é inicialmente decorrente do composto de aroma metional (RYSSTAD & KOLSTAD, 2006). O metional desenvolve rapidamente no leite e está relacionado à degradação oxidativa de metionina livre ou ligada à peptídeos, e à frações de proteína contendo enxofre, principalmente proteínas do soro (BORLE; SIEBER; BOSSET, 2001, SKIBSTED, 2000). Com o tempo de exposição à luz, as metil mercaptanas, os sulfitos e os dissulfitos surgem, posteriormente (RYSSTAD & KOLSTAD, 2006). O conteúdo de dimetildissulfito foi altamente correlacionado com a pontuação sensorial do sabor induzido pela luz. Quanto menos dimetildissulfito tiver um leite, melhor é a sua qualidade sensorial (JUNG et al., 1998). O dimetildissulfito, um típico composto do leite exposto à luz, não foi verificado em leite embalado em materiais cuja curva de transmissão de luz tenha sido muito baixa, como o polietileno de alta densidade pigmentado com três camadas (KARATAPANIS et al., 2006).

A descoloração do leite ocorre em função da intensidade e do tempo de exposição à luz fluorescente (MORTENSEN et al., 2004). A foto-oxidação oxida a cor do leite, diminuindo a cor amarela e aumentando a cor vermelha. A redução da cor amarela é, provavelmente, causada pela degradação simultânea das moléculas verde-amareladas vitamina A, riboflavina e  $\beta$ -caroteno. O aumento da cor vermelha, possivelmente ocorre durante a degradação do triptofano e tirosina (MESTDAGH et al., 2005). Em um estudo com leite desnatado, os pesquisadores relataram que os parâmetros de cor  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  reduziram após exposição do leite à luz (LEE; JUNG; KIM, 1998). Já para Mestdagh et al. (2005), o parâmetro de cor  $L^*$  de amostras de leite não foi influenciado, o parâmetro de cor  $a^*$  aumentou e o parâmetro de cor  $b^*$  diminuiu em função do tempo de estocagem.

### 2.2.3 Mecanismo de reação de foto-oxidação em leite

A riboflavina, como fotossensibilizador, ao absorver a energia da luz, é capaz de iniciar as reações de oxidação na presença de uma molécula biológica (RH) ou de uma molécula de oxigênio triplete, como mostrado na Figura 1 (MONTENEGRO et al., 2007).

**Figura 1-** Mecanismos Tipo I e Tipo II de foto-oxidação de leite.



Fonte: (MONTENEGRO et al., 2007).

Na reação do tipo I, a riboflavina, ao absorver a energia da luz, passa ao estado triplete excitado (com dois elétrons não pareados), e assim, abstrai elétron ou átomo de hidrogênio dos componentes dos alimentos. Desta forma, oxida e forma radicais livres dos compostos dos alimentos e radicais da riboflavina, como radical riboflavina aniônica ( $\text{RF}^{\bullet-}$ ) e radical riboflavina reduzida ( $\text{RFH}_2^{\bullet}$ ) (CHOE & MIN, 2006; MONTENEGRO et al., 2007). Os radicais podem abstrair hidrogênio de outros compostos ou transferir elétron para um dos orbitais do oxigênio triplete ( ${}^3\text{O}_2$ ). Desta forma produz espécies de oxigênio reativas como o anion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) que tem apenas um elétron não pareado (BORLE; SIEBER; BOSSET, 2001; CHOE & MIN, 2006; MIN & BOFF, 2002; SKIBSTED, 2000), e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (MONTENEGRO et al., 2007). Estas moléculas de oxigênio excitadas (oxigênio singlete ou radicais livres como o superóxido  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , radical hidroxi e radical hidroperoxi) podem induzir uma cascata de reações oxidativas que resultam em perdas de vitaminas e aminoácidos, oxidação de lipídeos, descoloração de alimentos e formação de *off-flavors* como aldeídos, cetonas, metional e dimetildissulfito

(BORLE; SIEBER; BOSSET, 2001; BRADLEY; KIM; MIN, 2006; CLAUSEN et al., 2010; MIN & BOFF, 2002; MONTENEGRO et al., 2007). Espécies reativas de oxigênio promovem a oxidação até mesmo após a degradação do fotossensibilizador (MESTDAGH et al., 2011). Durante o processo e estocagem dos alimentos é muito importante controlar a formação de espécies reativas de oxigênio e as reações deles com os componentes dos alimentos para melhorar a qualidade dos alimentos (CHOE & MIN, 2006).

Na reação fotoquímica do tipo II, a riboflavina excitada transfere a energia luminosa para o oxigênio dissolvido no leite (o oxigênio triplete), que tem dois elétrons não pareados e cada um está em um orbital  $\pi$  diferente com spins paralelos (CHOE & MIN, 2006; MONTENEGRO et al., 2007). O oxigênio em seu estado fundamental (oxigênio triplete  $^3\text{O}_2$ ), que não reage com os componentes do leite, é então excitado a oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), uma espécie química altamente reativa (estado excitado) (CHOE; HUANG; MIN, 2005). A riboflavina excitada, ao transferir a energia para o oxigênio, retorna ao seu estado básico (MIN & BOFF, 2002). O oxigênio singlete, como é uma espécie eletronicamente excitada, volta ao estado fundamental ao emitir luz ou transferir energia para os componentes do leite (RONSEIN et al., 2006). O oxigênio singlete, ao reagir com os componentes do leite, diminui durante estocagem sob luz (BRADLEY; KIM; MIN, 2006). Portanto, a perda de oxigênio em uma embalagem pode ser correlacionada com a presença de riboflavina e de luz (BORLE; SIEBER; BOSSET, 2001; CHOE & MIN, 2006).

A riboflavina é parcialmente degradada durante estas reações, entretanto não se sabe ao certo como o sensibilizador é consumido. Possivelmente, a degradação da riboflavina deva-se ao ataque de algumas espécies de oxigênio ativadas, geradas pela desativação do estado excitado da riboflavina (SKIBSTED, 2000). O oxigênio singlete eletrofilico reage com a riboflavina para destruí-la (HUANG; CHOE; MIN, 2004; SMET et al., 2009).

Os dois tipos de reação ocorrem simultaneamente e a importância de cada um depende da molécula alvo, da eficiência da transferência de energia do fotossensibilizador para o oxigênio, do alimento em questão e, da concentração de oxigênio (RONSEIN et al., 2006). Em alimentos com alto teor de lipídeos, a reação do tipo II é favorecida. Entretanto, em sistemas aquosos como o leite, a reação do tipo I é predominante devido à disponibilidade reduzida de oxigênio. Mas, a reação do tipo II também ocorre devido à

presença de oxigênio dissolvido no leite e no *headspace* (AIRADO-RODRÍGUEZ et al., 2011). O deslocamento da reação tipo I para tipo II ou vice-versa é dependente da concentração de oxigênio, e do tipo e concentração dos compostos (MIN & BOFF, 2002).

#### **2.2.4 Foto-oxidação de proteínas**

A oxidação de proteínas e aminoácidos não é um mecanismo de reações em cadeias de radicais livres, como ocorre com a oxidação lipídica, mas há o envolvimento de oxigênio singlete (VAN AARDT et al., 2005b) e radical hidroxil (CHOE & MIN, 2006). As proteínas são os principais alvos da oxidação mediada pelo oxigênio singlete (CLAUSEN et al., 2010). Durante a oxidação de proteínas mediada pelo oxigênio singlete há a formação de peróxidos, que são importantes intermediários da oxidação de proteínas (DAVIES, 2003). A formação de peróxidos a partir de proteínas e oxigênio singlete pode resultar em danos posteriores a outras proteínas (RONSEIN et al., 2006). A oxidação de proteínas mediada por oxigênio singlete resulta em mudanças biofísicas e bioquímicas, tais como: aumento na susceptibilidade da proteína oxidada às enzimas proteolíticas, mudanças na conformação, aumento na hidrofobicidade e alteração das propriedades de espalhamento da luz e rotação óptica (DAVIES, 2003). A degradação de proteínas sensibilizada pela riboflavina sob luz acontece principalmente pela Reação do Tipo I à baixa concentração de oxigênio. E pelo Tipo II é favorecida quando há alta concentração de oxigênio (CHOE; HUANG; MIN, 2005).

As proteínas do leite mostraram significativa variabilidade na sensibilidade à foto-oxidação (DALSGAARD et al., 2007). A foto-oxidação é altamente dependente da estrutura da proteína (MIN & BOFF, 2002). As mudanças estruturais nas proteínas foto-oxidadas são mais pronunciadas nas caseínas do que nas proteínas do soro (DALSGAARD & LARSEN, 2009). A formação de produtos de oxidação do triptofano (Quinurenina e N-formilquinurenina) nas caseínas é maior do que nas proteínas do soro, indicando que as proteínas sem estrutura terciária bem definida (caseínas) são mais oxidadas do que as proteínas globulares (DALSGAARD et al., 2007; DALSGAARD & LARSEN, 2009; KERKAERT et al., 2012). A estrutura terciária das proteínas inibe a reação do oxigênio

singlete com os aminoácidos, transmitindo certo grau de proteção, principalmente para os aminoácidos escondidos na estrutura globular, como ocorre com a tirosina e o triptofano. A oxidação de resíduos de histidina e metionina parecem ser mais independentes da estrutura da proteína, por estarem menos escondidas na estrutura das proteínas globulares (DALSGAARD & LARSEN, 2009). Com a riboflavina agindo como sensibilizador, as proteínas do soro, embora tenham certa proteção em relação às caseínas, são as fontes principais do *off-flavor* ativado pela luz (SATTAR & DEMAN, 1975). As proteínas do soro podem desnoverar sob luz ultravioleta (UV), causando exposição dos sítios hidrofóbicos (KRISTO; HAZIZAJ; CORREDIG, 2012). Com a foto-oxidação, a  $\alpha$ -lactoalbumina e a  $\beta$ -lactoglobulina sofrem um desnovelamento parcial, enquanto que a lactoferrina sofre uma polimerização (DALSGAARD et al, 2007; DALSGAARD & LARSEN, 2009). Dalsgaard et al. (2007) ao estudarem preparações de seis proteínas do leite sob luz (2200-2600 lux) por 44 horas, verificaram que houve perda de triptofano nas seis proteínas, devido a degradação foto-oxidativa; sendo maior na  $\alpha$ -caseína,  $\beta$ -caseína e  $\alpha$ -lactoalbumina. Dentre as caseínas, a  $\alpha$ -caseína e a  $\beta$ -caseína são as duas proteínas do leite mais lábeis em relação à foto-oxidação (DALSGAARD; HEEGAARD; LARSEN, 2008).

As modificações induzidas pela luz, nas proteínas, são decorrentes, principalmente, da absorção da luz por resíduos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina (KRISTO; HAZIZAJ; CORREDIG, 2012). Peptídeos contendo triptofano são oxidados majoritariamente pelo oxigênio singlete (CHOE; HUANG; MIN, 2005). O triptofano é mais susceptível às mudanças foto-oxidativas do que os outros aminoácidos aromáticos, por possuir maior coeficiente de absorção relativa da luz (KRISTO; HAZIZAJ; CORREDIG, 2012). A formação de derivados de triptofano (Quinurenina e N'formilquinurenina) pode indicar que houve clivagem de proteínas (SCHEIDEGGER et al., 2010). A formação da ditirosina, durante a foto-oxidação do leite, indica a clivagem dos aminoácidos da estrutura da proteína, seguida pela união entre dois resíduos de tirosina por ligações cruzadas (DALSGAARD et al., 2007). Esta pode ser detectada usando hidrólise ácida de proteína e subsequente detecção por HPLC (DALSGAARD & LARSEN, 2009) ou por espectroscopia de fluorescência (SCHEIDEGGER et al., 2010). Maior formação de ditirosina foi observada nas preparações de  $\alpha$ -caseína e  $\beta$ -caseína, que não possuem

estrutura terciária bem definida. Dentre as proteínas globulares, a  $\alpha$ -lactoalbumina apresentou maior formação de ditirosina após 44 horas de foto-oxidação sob 2200–2600 lux (DALSGAARD & LARSEN, 2009). Estruturas flexíveis de  $\beta$ -caseína favorecem as terminações radical-radical de radicais tirosil formando a ditirosina, enquanto que as estruturas menos flexíveis das proteínas globulares reduz a probabilidade da dimerização de radicais tirosil, o que resulta em formação de 3,4- Dihidroxifenilalanina (DOPA) (DALSGAARD et al., 2011). A formação de ditirosina em leite foto-oxidado sugere que mudanças na estrutura terciária ou oligomerização de proteínas podem ocorrer (SCHEIDEGGER et al., 2010). Entretanto, não são as únicas responsáveis na formação de agregados. O triptofano e seus produtos de degradação exercem também um papel fundamental. A foto-oxidação induz a agregação de proteínas do soro (KRISTO; HAZIZAJ; CORREDIG, 2012) e de caseínas, provavelmente devido ao aumento de interações hidrofóbicas e ligações covalentes entre as proteínas foto-oxidadas (KERKAERT et al., 2012).

A reação de oxigênio singlete com proteínas ou aminoácidos contendo enxofre, como a metionina e cisteína, são capazes de produzir compostos voláteis contendo enxofre, como o dimetildissulfeto. Este é o agente responsável pelo *off-flavor* de leite exposto à luz (BORLE; SIEBER; BOSSET, 2001; BRADLEY; KIM; MIN, 2006; CHOE & MIN, 2006; MIN & BOFF, 2002; MONTENEGRO et al., 2007). O mecanismo para a formação do sabor induzido pela luz inicia-se pela riboflavina produzindo oxigênio singlete. Este reage com o enxofre da metionina que é rico em elétrons, formando hidroperóxido. O hidroperóxido é decomposto a metional e radicais tiometil. Estes radicais tiometil reagem entre si e produzem dimetildissulfeto (JUNG et al., 1998). O dimetildissulfeto pode ser formado de resíduos de metionina, oriundos das proteínas do soro, ou de hidroperóxidos de lipídeos pelo oxigênio singlete (CHOE & MIN, 2006; CHOE; HUANG; MIN, 2005; SKIBSTED, 2000).

Os aminoácidos lisina e histidina podem reagir com produtos de peroxidação lipídica. Os produtos de oxidação lipídica podem promover ligações entre cadeias de proteínas, o que forma agregados mais estáveis de alto peso molecular – 250 KDa. Portanto,

os produtos de oxidação lipídica exercem um papel mais importante do que a reação direta do oxigênio singlete com os aminoácidos (MESTDAGH et al., 2011).

A foto-oxidação das proteínas não afeta a digestibilidade, pois as enzimas gastrointestinais ainda são capazes de hidrolisar as caseínas foto-oxidadas. (KERKAERT et al., 2012). Entretanto, os agregados de alto peso molecular formados entre os produtos de oxidação lipídica e as proteínas são mais resistentes à digestão (MESTDAGH et al., 2011).

A foto-oxidação do leite e derivados afeta não somente a qualidade nutricional como também afeta significativamente a atividade biológica (fisiológica) dos peptídeos (KERKAERT et al., 2012). A foto-oxidação protéica aumenta com a diminuição do teor lipídico, pois além das partículas serem menores, uma maior fração protéica é exposta à fase aquosa, sendo assim, mais acessível ao ataque de radicais livres (ANDERSEN et al., 2006).

### 2.3 AVALIAÇÃO DA FOTO-OXIDAÇÃO DE LEITE

Atualmente, a espectroscopia de fluorescência está sendo utilizada para avaliar a oxidação induzida pela luz de produtos lácteos, substituindo métodos físico-químicos trabalhosos. A espectroscopia de fluorescência é uma metodologia rápida, não destrutiva, seletiva e sensível (ANDERSEN & MORTENSEN, 2008; ANDERSEN; VISHART; HOLM, 2005). A fotodegradação dos componentes do leite resulta na diminuição da intensidade de fluorescência deles. Portanto, o início e a extensão da foto-oxidação podem ser medidos indiretamente através da espectroscopia de fluorescência (AIRADO-RODRÍGUEZ et al., 2011). Na espectroscopia de fluorescência, a alta opacidade do leite inibe o uso da técnica comum de ângulo reto (ZANDOMENEGHI; CARBONARO; ZANDOMENEGHI, 2007). O ângulo de incidência da radiação de excitação deve ser ajustado para minimizar a luz refletida, o espalhamento da radiação e o fenômeno da despolarização (KAROUI et al., 2006).

Em produtos lácteos, os principais compostos que permitem a emissão de fluorescência são: a riboflavina, a vitamina A, aminoácidos aromáticos, produtos de reação de Maillard, porfirinas, clorofilas e produtos de oxidação de lipídeo. A riboflavina é uma

molécula altamente fluorescente com excitação máxima a 270, 370 e 450 nm e emissão máxima na faixa de 525-531 nm. Pode-se identificar a fotodegradação da riboflavina através da diminuição da intensidade de sua emissão de fluorescência no comprimento de onda de aproximadamente 525 nm, e através da formação dos produtos de sua degradação (lumicromo e lumiflavina), que também são fluorescentes (ANDERSEN & MORTENSEN, 2008). O teor de riboflavina pode ser mensurado pelo método fluorimétrico bioquímico. Este método combina a medida da emissão de fluorescência da riboflavina do leite com a titulação desta com a adição gradual de solução de RBP (proteína do ovo de galinha que se liga à riboflavina) para suprimir a fluorescência da riboflavina (ZANDOMENEGHI; CARBONARO; ZANDOMENEGHI, 2007). O lumicromo pode contribuir para a intensidade de fluorescência na região de 410 a 500 nm (LARSEN; TELLEFSEN; DAHL, 2009). Um aumento de fluorescência na região de 414 a 490 nm foi correlacionado à formação de lumicromo com o aumento do tempo de estocagem de iogurte desnatado (DOMINGOS, 2010). Alguns pesquisadores (BECKER et al., 2003) correlacionaram um pico a 430 nm (com excitação a 370 nm) ao lumicromo, para iogurte exposto à luz.

A reação entre grupos amino de proteínas e produtos de oxidação secundários (aldeídos e cetonas), durante o mecanismo de foto-oxidação, forma produtos de oxidação fluorescentes, com excitação máxima de 340-370 nm e emissão máxima a 400-470 nm (ANDERSEN; VISHART; HOLM, 2005).

A fluorescência de proteínas do leite deve-se à fluorescência de três aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina e triptofano, sendo o último o mais fluorescente. As propriedades de fluorescência do triptofano depende da polaridade, do pH do meio, de interações com proteínas ou outros constituintes do produto, bem como da forma que o triptofano é exposto na configuração tridimensional das proteínas (ANDERSEN & MORTENSEN, 2008; ANDERSEN; VISHART; HOLM, 2005; KAROUI et al., 2006). O conteúdo de triptofano pode ser mensurado usando o comprimento de onda de excitação e emissão de 280 e 330 nm, respectivamente (MESTDAGH et al., 2011). Com a foto-oxidação, produtos de carbonilação do triptofano são formados, como a quinurenina e o N<sup>2</sup>-formilquinurenina (SCHEIDEGGER et al., 2010). A quinurenina é um fraco emissor de fluorescência, com uma emissão máxima a 480 nm sob excitação a 365 nm. O N<sup>2</sup>-

Formilquinurenina é um emissor de fluorescência mais forte do que a quinurenina; tendo emissão máxima de 400-440 nm sob excitação de 325-330 nm (DALSGAARD & LARSEN, 2009; FUKUNAGA et al., 1982; MESTDAGH et al., 2011). A existência de N<sup>2</sup>-formilquinurenina sugere a ocorrência de fragmentação de proteína. Da foto-oxidação da tirosina forma-se a ditirosina, a qual pode ser monitorada pelo aumento de fluorescência no comprimento de onda de 410 nm com excitação a 325 nm (SCHEIDEGGER et al., 2010).

Nem sempre os métodos instrumentais são adequados para monitorar a foto-oxidação nos produtos lácteos (AIRADO-RODRÍGUEZ et al., 2011). A avaliação sensorial é considerada a ferramenta mais relevante e sensível para analisar as mudanças no leite decorrentes da foto-oxidação (AIRADO-RODRÍGUEZ et al., 2011; LARSEN; TELLEFSEN; DAHL, 2009). A análise sensorial corresponde bem com os resultados de espectroscopia de fluorescência (LARSEN; TELLEFSEN; DAHL, 2009).

#### 2.4. CONTROLE DA FOTO-OXIDAÇÃO

A foto-oxidação do leite é um sério problema para a indústria láctea devido à severidade e a alta velocidade da reação (MESTDAGH et al., 2005). A minimização do desenvolvimento de *flavor* induzido pela luz é importante porque a exposição do leite à luz é inevitável durante o processo, manuseio, transporte, estocagem e nas gôndolas dos supermercados (INTAWIWAT et al., 2010; JUNG et al., 1998). Várias condições têm influenciado a foto-oxidação dos alimentos, entre elas, as condições de estocagem, a permeabilidade ao oxigênio e o espectro de transmissão do material de embalagem, o espectro de emissão, o comprimento de onda e a intensidade da luz usada, bem como a distância da fonte de luz e o tempo de exposição (BORLE; SIEBER; BOSSET, 2001; MESTDAGH et al., 2005; MIN & BOFF, 2002). A concepção de materiais de embalagem com ótima proteção do produto contra a ação combinada de luz e oxigênio é necessária para minimizar as alterações que possam ocorrer no leite em decorrência da foto-oxidação (BORLE; SIEBER; BOSSET, 2001; VAN AARDT et al., 2005a). Alguns pesquisadores (SMET et al., 2009) sugerem que a permeabilidade ao oxigênio do material de embalagem não é um fator importante para proteger contra a oxidação. A contribuição do oxigênio dissolvido no leite para a foto-oxidação é insignificante (KARATAPANIS et al., 2006).

Quando se expõe o produto em alta intensidade de luz, o fluxo de fótons é maior. Quanto mais fótons atingirem o leite, mais moléculas de riboflavina serão excitadas e, portanto, mais rápidas serão as reações de foto-oxidação. Desta forma, a intensidade da fonte de luz determina o potencial para induzir as reações de foto-oxidação e o tempo de exposição, o grau de conversão (MORTENSEN et al., 2004). O tipo de luz usada em salas de estocagem, bem como, a duração e geometria de exposição determinam o grau de degradação induzida pela luz. Luz fluorescente, com forte emissão violeta, azul e verde (400-460nm), deve ser absolutamente evitada (BORLE; SIEBER; BOSSET, 2001). Entretanto, a luz do sol é mais prejudicial à riboflavina do que a luz fluorescente (CHOE; HUANG; MIN, 2005; MIN & BOFF, 2002). Lâmpadas ricas em bandas de emissão amarela, laranja e vermelho são preferidas porque minimizam a absorção de luz pela riboflavina (BORLE; SIEBER; BOSSET, 2001). A foto-oxidação não é proveniente apenas da radiação na região azul da luz ultravioleta (UV), mas também da luz na região verde-vermelho (LARSEN; TELLEFSEN; DAHL, 2009). Portanto, é importante proteger o leite da luz do espectro UV e da região do visível para maximizar a vida de prateleira do leite pasteurizado (INTAWIWAT et al., 2010).

As reações de foto-oxidação podem variar de acordo com o comprimento de onda da luz que atinge a superfície do leite, conforme a propriedade de barreira à luz da embalagem (AIRADO-RODRÍGUEZ et al., 2011). O conhecimento da região de transmissão da luz de um material de embalagem é importante para minimizar os efeitos da foto-oxidação (LARSEN; TELLEFSEN; DAHL, 2009). Quanto menor o comprimento de onda, maior o conteúdo de energia de um fóton de luz e maior seu efeito sobre as reações químicas (MORTENSEN et al., 2004). O comprimento de onda de 450 nm é o mais prejudicial à riboflavina, pois corresponde ao comprimento de onda em que ocorre a máxima absorção de luz pela riboflavina. O bloqueio completo de toda radiação UV aumenta a vida de prateleira do leite (WEBSTER et al., 2009). O material de embalagem reflete e absorve uma parte dos fótons da fonte de luz. Portanto, a característica da luz transmitida ao leite dependerá do espectro de incidência da luz (intensidade de radiação a determinados comprimentos de onda) e do material de embalagem (MORTENSEN et al., 2004). O máximo que uma embalagem pode ter de transmitância de luz é 2% a 400 nm e

8% a 500 nm, para evitar a foto-oxidação (MESTDAGH et al., 2005; WEBSTER et al., 2009). O polietileno transmite 63% da incidência de luz. A incorporação de dióxido de titânio no material plástico protege contra a luz UV e aumenta o espalhamento da luz, o que reduz a transmitância da luz visível em aproximadamente 80%, especialmente de luz com comprimentos de onda menores do que 400 nm (LARSEN; TELLEFSEN; DAHL, 2009; MORTENSEN et al., 2004). Garrafas de polietileno de alta densidade pigmentadas preservam as características do leite pasteurizado por mais de cinco dias de estocagem. Produtos lácteos acondicionados em nanoembalagens recobertas com  $\text{TiO}_2$  sob luz permaneceram quase inalterados em relação à cor, textura, e *flavor*, por onze dias de estocagem (PETER et al., 2012). Garrafas comerciais de Polietileno de alta densidade possuem taxa de permeabilidade de oxigênio, a 4°C, de 390 a 460  $\mu\text{L}/\text{d}$  (VAN AARDT, 2001).

Os materiais de embalagem tornam-se cada vez mais essenciais para evitar a deterioração do sabor do leite induzido pela luz, devido à grande tendência do desenvolvimento de alimentos com alta vida de prateleira (INTAWIWAT et al., 2010).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 PROCESSAMENTO DO LEITE DESNATADO MICROFILTRADO

##### PASTEURIZADO

O experimento foi desenvolvido no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP- Brasil.

O leite utilizado para o processamento do leite desnatado microfiltrado pasteurizado foi proveniente de uma cooperativa local (São Paulo – Brasil). Foram utilizados 150 litros de leite cru para cada processamento. Foram realizados três processamentos, em dias diferentes. O leite cru recepcionado, da ordenha do dia, foi desnatado em centrífuga de pratos, com capacidade de 400 L/h, marca Westfalia Separator, modelo MTC 3-03-107. Em seguida, o leite desnatado foi microfiltrado em uma membrana cerâmica multicanal Isoflux® da GEA, com porosidade de 1,4  $\mu\text{m}$ , diâmetro de 25 mm, comprimento de 1178 mm, área de 0,35m<sup>2</sup>, e constituída de 1 módulo com 23 canais de 3,5 mm de diâmetro. Os parâmetros operacionais foram: temperatura do leite de 45° C, vazão de 320 L/h e pressão de 1,2 bar. O leite foi microfiltrado até atingir o fator de concentração 4 (90 L). O leite desnatado microfiltrado foi pasteurizado (LTLT) a 65° C/ 30 min. Metade do leite foi envasado em garrafas de polietileno de alta densidade (PEAD) de 500 mL, esterilizadas por radiação gama a 5 kGy, fechada por tampa de rosca e selo de indução, e o restante, em garrafas de vidro de 500 mL com tampas metálicas, sanitizadas previamente por uma solução de hipoclorito a 200 ppm por 30 minutos.

O leite envasado foi armazenado sob refrigeração (7 °C), dentro da câmara fria do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, ao longo de 14 dias de estocagem. Trinta garrafas de leite envasadas em polietileno foram armazenadas no escuro para servir de controle. As garrafas submetidas à luz foram armazenadas em um armário com quatro prateleiras adaptadas com lâmpadas fluorescentes em cada uma delas (dentro da câmara fria). Foram colocadas 30 garrafas em cada prateleira, sendo duas prateleiras com garrafas de polietileno e duas com garrafas de vidro. Os leites envasados receberam incidência de luz de 500  $\pm$  100 lux e 1200  $\pm$  100 lux

na parte superior das garrafas. A intensidade da incidência de luz foi ajustada com papel manteiga branco e medida no topo das garrafas, por Luxímetro digital modelo LDR-208 da Instrutherm (São Paulo, SP – Brasil). A fonte luminosa usada foi a lâmpada fluorescente T8, 15 W/765 da Osram (Osasco, SP – Brasil).

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DO LEITE DESNATADO MICROFILTRADO PASTEURIZADO

A caracterização do leite desnatado microfiltrado pasteurizado foi realizada em triplicata segundo procedimentos descritos por AOAC (2006). O pH foi lido diretamente no pHmetro Digimed DM-22. A acidez foi determinada por titulação com NaOH 0,01N, a gordura por Mojonnier e a proteína total por micro-Kjeldahl. Os valores de NT foram multiplicados por 6,38, para a obtenção dos teores equivalentes de proteína total. O nitrogênio não caseico (NNC) foi determinado através do nitrogênio solúvel do sobrenadante após a precipitação ao pH 4,6, seguido de micro-Kjeldahl. A caseína foi calculada por diferença entre NT e NNC e multiplicada por 6,38. A fosfatase alcalina por STANDARD METHODS... (1992), e a peroxidase por LANARA (1981). Foram realizadas as seguintes análises microbiológicas: contagem padrão em placas de mesófilos aeróbios e coliformes totais seguindo as recomendações da *American Public Association - APHA* (APHA, 2001); determinação de coliformes totais através da técnica do Número Mais Provável (NMP) de três tubos contendo Caldo Lauril Sulfato Triptose (35 °C/ 48 h) e utilizando caldo Verde Brilhante Bile (35 °C/ 48 h) e *Escherichia coli* (45,5 °C/ 24 h) para os testes confirmativos. Para detecção de *Salmonella spp* em 25 ml das amostras foi utilizado kit de detecção *Salmonella Rapid Test* da Oxoid, certificado pela AOAC, nº 960902.

### 3.3 MUDANÇAS QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO LEITE DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO

A degradação da riboflavina, a oxidação da proteína, a cor instrumental e a avaliação sensorial da cor, sabor e aroma do leite foram realizadas nos dias de estocagem refrigerada 01, 04, 07, 10 e 14. A aceitação sensorial e a intenção de compra foram realizadas, com a mesma periodicidade. Em cada dia de análise, duas garrafas de leite de cada tratamento (polietileno no escuro, polietileno a 500 lux, polietileno a 1200 lux, vidro a 500 lux e vidro a 1200 lux) foram retiradas aleatoriamente e substituídas por embalagens vazias.

#### ***3.3.1 Degradação da riboflavina e formação de lumicromo***

A determinação do teor de riboflavina foi realizada por titulação espectrofluorimétrica da riboflavina (RF) por *Riboflavin binding protein* (RBP), baseada no método descrito por ZANDOMENEGHI; CARBONARO; ZANDOMEGHI (2007). O método baseia-se na titulação da riboflavina presente no leite com uma solução de RBP. A emissão de fluorescência da riboflavina do leite é medida a cada alíquota de solução de RBP que é adicionada. A RBP tem a capacidade de se ligar a riboflavina e suprimir sua fluorescência. A RBP (forma apo, Sigma R8628) foi adquirida da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). A titulação da RF foi efetuada pela adição de alíquotas de 10 a 15  $\mu\text{L}$  de solução de RBP a uma concentração de  $1,039 \times 10^{-3} \text{ mg}/\mu\text{L}$ , a fim de suprimir a fluorescência da RF gradualmente. Após cada adição de solução de RBP, a cubeta foi agitada em vortex durante 30 segundos, e em seguida, mediu-se a emissão no espectrofotômetro Cary Eclipse (Varian, Palo Alto, CA, USA) equipado com acessório (*Varian Accessory Solid Sample*, Melbourne, Austrália) com ângulo de posicionamento da amostra regulado para inclinação de  $27^\circ$  (*front-face*) em relação à luz incidente. Foi utilizado cubeta de quartzo (1 x 1 cm). As fendas de excitação e emissão foram iguais a 10 nm e o incremento no comprimento de onda do espectro de varredura foi de 0,15 nm. A emissão foi medida entre 450 e 700 nm com excitação da amostra a 450 nm. As amostras

de leite (1  $\mu$ L) foram tituladas até pelo menos três espectros de emissão não se alterarem após a adição das alíquotas.

A degradação da riboflavina e a formação do lumicromo foram determinadas qualitativamente por espectroscopia de fluorescência. A fotodegradação da riboflavina foi observada através da diminuição da intensidade de sua fluorescência ao longo do tempo de estocagem, no comprimento de onda de emissão média de aproximadamente 525 nm, com excitação a 450 nm. Foi utilizado espectrofotômetro Cary Eclipse (Varian, Palo Alto, CA, USA) equipado com acessório (*Varian Accessory Solid Sample*, Melbourne, Australia) com ângulo de posicionamento da amostra regulado para inclinação de 27° (*front-face*) em relação à luz incidente. Foi usada cubeta de quartzo (1 x 1 cm) e técnica de *front-face*, a qual é mais adequada às amostras opacas, como o leite. A técnica de *front-face* minimiza a radiação que reflete e se espalha durante a incidência da luz na amostra. A formação de lumicromo foi determinada pelo aumento de intensidade de fluorescência, ao longo do tempo de armazenamento, no espectro de excitação de 365 nm e de emissão a 430 nm (BECKER et al., 2003; DOMINGOS, 2010), com fendas de excitação e emissão iguais a 5 e 10 nm, respectivamente, com incremento médio de 0,15 e com taxa de scan de 600 nm/min.

### **3.3.2 Oxidação de Proteínas**

A redução da intensidade de fluorescência do triptofano e a formação de ditirosina são indicativos da foto-oxidação das proteínas do leite (DALSGAARD & LARSEN, 2009). A degradação do triptofano foi determinada pela redução de intensidade de fluorescência ao longo do tempo de armazenamento, no espectro de excitação 280 nm (MESTDAGH, et al., 2011) e emissão de 300 a 500 nm, com emissão média a 350 nm. As fendas de excitação e emissão utilizadas foram 5 e 10 nm, respectivamente, com incremento médio de 0,15 e com taxa de scan de 600 nm/min. A formação de ditirosina foi determinada pelo aumento de intensidade de fluorescência ao longo do tempo de armazenamento, no espectro de excitação 325 nm e emissão média a 410 nm (SCHEIDEGGER, et al., 2010). As fendas de

excitação e emissão utilizadas foram 10 nm, com incremento médio de 0,15 e com taxa de scan de 600 nm/min.

### 3.3.3 Desenvolvimento de micro-organismos mesófilos

A contagem padrão em placas de mesófilos aeróbios seguiu as recomendações da *American Public Association - APHA* (APHA, 2001).

### 3.4. DETERMINAÇÃO DE COR INSTRUMENTAL

Para a avaliação instrumental da cor foi utilizado um colorímetro da marca Hunterlab (Hunter Associates Laboratory, Inc., Reston, VA, USA), modelo Color Quest XE. A escala de cor utilizada foi CIELab ( $L^*a^*b^*$ ), com iluminante D65 (6900°K) e abertura de 10°, sendo a leitura feita em modo de reflectância especular incluída. Utilizou-se padrão branco ( $L^*= 92,03$ ,  $a^*= -0,88$ ,  $b^*= 0,63$ ). O valor de  $L^*$  representa a luminosidade da amostra, variando de preto (0) a branco (100); o valor de  $a^*$  representa a cor, variando de vermelho (+) a verde (-); e o valor de  $b^*$  representa a cor, variando de amarelo (+) a azul (-). Para a leitura, foi utilizada uma cubeta de quartzo de 20 mm. A medida foi realizada em triplicata, com 3 leituras em cada replicata.

Os valores de  $C^*$ = croma (saturação de cor), de  $h$ = hue (ângulo de tonalidade) e de  $\Delta E$ = diferença global de cor foram calculados de acordo com as equações:

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$$

Equação 1

$$h = \arctan (b^*/a^*)$$

Equação 2

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

Equação 3

A diferença total de cor foi calculada para cada tratamento pela diferença da média de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  dos dias 01 e 14 de estocagem.

### 3.5 AVALIAÇÃO SENSORIAL E INTENÇÃO DE COMPRA

As análises sensoriais foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp, conforme parecer número 471/2011 (ANEXO 1). Os testes sensoriais foram aplicados no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp. Inicialmente foi realizado um recrutamento entre alunos e funcionários da Universidade Estadual de Campinas. Antes da realização dos testes, os recrutados foram solicitados a assinar um termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 2). Foram selecionados apenas os consumidores que tinham mais de 18 anos, que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, que eram consumidores de leite e que declararam que não tinham alergia ao produto.

#### **3.5.1 Caracterização sensorial de cor, aroma e sabor com assessor treinado**

O efeito do tipo de embalagem e da intensidade da luz na cor, aroma e sabor do leite microfiltrado pasteurizado foi avaliado por uma equipe treinada, em relação aos atributos de cor, aroma e sabor característicos de leite e de leite oxidado.

##### *3.5.1.1 Recrutamento e pré-seleção*

Uma pré-seleção dos candidatos foi realizada utilizando-se o teste triangular (ANEXO 3) que avalia a capacidade discriminatória e a reprodutibilidade do provador em avaliar diferenças entre duas amostras que sofreram tratamentos diferentes (STONE & SIDEL, 2004). Foram utilizadas 2 amostras (leite desnatado pasteurizado tipo A não oxidado e leite desnatado tipo A envasado em garrafas de vidro e oxidado pela luz fluorescente a 1300 lux por 30 horas). As amostras foram oferecidas em todas as combinações possíveis, totalizando 6 testes triangulares aplicados. Dezesete (17) assessores, os quais obtiveram mais de 60% de acertos, foram pré-selecionados (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2007).

### *3.5.1.2 Treinamento*

Os candidatos pré-selecionados realizaram treinamento e análise de intensidade de cor, aroma e sabor de leite desnatado pasteurizado tipo A e de leite desnatado tipo A oxidado pela luz. Os candidatos foram familiarizados e treinados com as fichas de avaliação (ANEXO 4) e de referências (ANEXO 5) desenvolvidas e com os materiais de referências propostos para cada atributo para formação da memória sensorial em intensidades mínima e máxima da escala. O leite de referência para o sabor oxidado induzido pela luz foi obtido a partir de um leite pasteurizado exposto a uma luz fluorescente a 1300 lux (VAN AARDT, 2001), por 8 dias (validade máxima de um leite tipo A do mercado brasileiro). Os assessores foram treinados por aproximadamente 2 meses. Em cada sessão de treinamento, os assessores avaliaram as referências e leram as definições dos termos descritivos, o que proporcionou à equipe melhor entendimento dos atributos e formação da memória sensorial. Posteriormente, em cada sessão, o assessor após ter treinado as referências para cada atributo, foi solicitado a avaliar quatro amostras de leite desnatado pasteurizado tipo A (não foto-oxidado, foto-oxidado a 1300 lux por 2, 4 e 8 dias) dentro da cabine, utilizando a ficha de avaliação descritiva com escala não estruturada de 9 cm (ANEXO 4) com as definições e referências ao seu lado. Os resultados foram avaliados graficamente (interação provador x amostra para cada atributo) em cada sessão, possibilitando nas sessões posteriores, treinar especificamente o assessor no atributo que estivesse com maior dificuldade, e conseguir o entendimento necessário para que a equipe estivesse apta a ser submetida ao teste de seleção final.

### *3.5.1.3 Seleção final*

Quando a equipe apresentou suficiente entendimento dos atributos e procedimentos da avaliação, um teste de seleção final foi conduzido onde os assessores avaliaram as mesmas 4 amostras, em 3 repetições, utilizando-se a ficha de avaliação descritiva. Os assessores foram selecionados com base em seu poder discriminativo com relação às amostras, reprodutibilidade e consenso com a equipe sensorial. Para verificar estas

características, os resultados de cada assessor em cada atributo foram submetidos à ANOVA avaliando as fontes de variações amostra e repetição para cada assessor, em relação a cada atributo, sendo selecionados para compor a equipe sensorial final, aqueles que apresentaram pFamostra significativo ( $p < 0,50$ ) e pFrepetição não significativo ( $p > 0,05$ ) (Tabela 1) e consenso com a equipe sensorial. O consenso de cada assessor foi julgado através do gráfico das médias de cada atributo para cada assessor, em cada amostra, sendo que, as médias individuais dos assessores, para cada amostra em cada um dos atributos, mostraram uma mesma tendência com relação à média da equipe.

**Tabela 1\_** Seleção dos assessores.

Pro v	Atributos											
	Cor LD		Cor LDO		AromaLD		AromaLDO		SaborLD		SaborLDO	
	pFa	pFr	pFa	PFr	pFa	PFr	pFa	pFr	pFa	PFr	pFa	pFr
1	0.0539	0.5832	0.0500	0.4949	<.0001	0.7284	0.0026	0.6646	0.0755	0.5330	0.0022	0.8726
2	0.0952	0.0637	0.2518	0.1589	0.0730	0.6339	0.0285	0.3589	0.0009	0.3757	0.0048	0.2568
3*	<b>0.7917</b>	0.5074	<b>0.8087</b>	0.4090	0.0049	0.7858	0.0010	0.4079	0.0044	0.5653	0.0079	0.0964
4	0.2503	0.6954	0.1008	0.4747	0.4717	0.8651	0.1232	0.8774	0.0002	0.1428	0.0028	0.9058
5	0.2922	0.0579	0.0863	0.1121	0.0268	0.2235	0.0001	0.2453	0.0547	0.2425	<.0001	0.5955
6	0.0153	0.5255	0.0037	0.1177	0.0055	0.5339	<.0001	0.0573	0.0148	0.6937	0.0002	0.2095
7	0.2127	0.4892	0.4219	0.2698	0.1596	0.8741	0.0227	0.4622	0.4177	0.7505	0.2350	0.8755
8*	0.0200	0.0919	0.0402	0.1154	0.0003	0.2455	0.0151	0.3745	0.0095	<b>0.0095</b>	0.0178	0.1164
9	0.0019	0.2870	0.0368	0.9260	0.0019	0.6660	0.0043	0.9891	<.0001	0.9307	0.0018	0.6938
10*	<b>0.8411</b>	0.6112	<b>0.9765</b>	0.6543	0.4099	0.7173	0.4819	0.3572	0.2121	0.5151	0.1725	0.1725
11*	0.1689	0.2351	0.1520	0.1779	<b>0.8678</b>	0.9576	0.0671	0.3836	0.0965	0.7472	0.0356	0.4949
12	0.1099	0.8862	0.0322	0.1734	0.1005	0.1560	0.0884	0.7897	0.1956	0.8113	0.4094	0.4078
13	0.0018	0.3921	<.0001	0.5505	<.0001	0.1884	<.0001	0.3071	0.0003	0.8364	0.0472	0.0572
14	0.0396	0.1494	0.1066	0.3688	0.0489	0.7604	0.0072	0.2742	0.0238	0.3148	0.0189	0.3465
15	0.1730	0.1434	0.4717	0.4717	0.1355	0.1877	0.3585	0.7999	0.0174	0.0540	0.1626	0.4137
16*	0.4163	0.5666	<b>0.7792</b>	0.9568	0.0659	0.6006	0.1476	0.5133	0.2983	0.8479	0.3317	0.9056
17	0.0518	0.3508	0.4514	0.5861	0.0067	0.7122	0.0295	0.7215	0.0164	0.4234	0.0522	0.1417

**Cor LD:** Cor característica de leite desnatado; **Cor LDO:** Cor característica de leite desnatado oxidado; **Aroma LD:** Aroma característico de leite desnatado; **Aroma LDO:** Aroma característico de leite desnatado oxidado; **Sabor LD:** Sabor característico de leite desnatado; **Sabor LDO:** Sabor característico de leite desnatado oxidado; \*Candidatos não selecionados para a equipe sensorial; **pFa:** probabilidade do grau de diferença entre as amostras; **pFr:** probabilidade do grau de diferença entre as repetições.

### 3.5.1.4 Teste sensorial com as amostras

A equipe sensorial final foi composta de 12 assessores selecionados e treinados. Estes avaliaram, em três repetições, as amostras de leite desnatado microfiltrado pasteurizado, servidas de forma monádica (STONE & SIDEL, 2004) em cabines individuais, iluminadas com luz branca. Água filtrada foi servida entre uma amostra e outra para lavar o palato. Foi utilizado 40 mL de amostra, à temperatura ambiente, servida em

taças de acrílico de 170 mL com tampas, e codificadas com algarismos de 3 dígitos. As amostras foram distribuídas e avaliadas em cada sessão do teste, de acordo com o delineamento experimental de blocos completos balanceados com cinco tratamentos (PE, P500, P1200, V500 e V1200). Os assessores, de posse da ficha descritiva desenvolvida, avaliaram as amostras em uma escala não estruturada de 9 cm (ANEXO 4).

### **3.5.2 Aceitação e intenção de compra**

Cem (100) consumidores de leite foram convidados a comparecer ao Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA/FEA) para a realização dos testes de aceitação sensorial e Intenção de compra de leite desnatado pasteurizado, através de cartazes afixados em murais da Unicamp e de avisos enviados por e-mail à comunidade da Unicamp (ANEXO 6). Nos cartazes e avisos foram especificados o tipo de teste e o produto a ser avaliado. Os testes foram realizados em cabines individuais sob luz branca. As amostras foram apresentadas em blocos completos balanceados de forma monádica, em um volume de 30 mL de leite à temperatura de aproximadamente 15 °C, em taças de acrílico de 170 mL, codificadas com algarismos de três dígitos. Os consumidores foram orientados a beber água mineral entre as amostras. A avaliação foi realizada utilizando-se a escala hedônica estruturada de 9 pontos (1 = desgostei extremamente; 5 = nem gostei/nem desgostei; 9 = gostei extremamente) (ANEXO 7), em relação à aparência (cor), aroma, sabor e impressão global (STONE & SIDEL, 2004). 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) (ANEXO 7) (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2007).

### **3.6 DETERMINAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DO LEITE DESNATADO MICROFILTRADO PASTEURIZADO**

Análises microbiológicas e sensoriais do leite desnatado microfiltrado pasteurizado foram realizadas durante pelo menos 2 semanas após a fabricação, o que equivale a 175% da vida de prateleira de um leite pasteurizado tipo A, que apresenta em média, no máximo 8

dias de validade. A avaliação da vida de prateleira do leite microfiltrado pasteurizado foi realizada a cada três dias no início, e a cada quatro dias no final do tempo de estocagem. A data que o leite desnatado microfiltrado pasteurizado foi envasado foi considerada como o tempo zero para determinação da vida de prateleira dele.

Os critérios determinantes para o final da vida de prateleira do leite desnatado microfiltrado pasteurizado foram a contagem  $1,0 \times 10^3$  UFC de mesófilos aeróbios/ mL de leite (BRASIL, 2011) ou as mudanças sensoriais que foram percebidas pelo assessor treinado que causaram a diminuição na aceitabilidade. A redução na aceitabilidade foi determinada quando a média das notas dos consumidores foi inferior a 5 para um dos atributos avaliados (aparência (cor), aroma, sabor e impressão global) e/ou a intenção de compra com maioria negativa (ASTM, 2005). Neste caso, foi interrompida também a seqüência de realização das outras análises.

### 3.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação da degradação da riboflavina e da cor instrumental, ( $L^*$ ,  $C^*$  e  $h$ ) foi adotado o delineamento do tipo *split-split-plot*, sendo que a parcela principal foi a embalagem (vidro e polietileno) e a sub-parcela da embalagem foi a intensidade de luz (escuro-controle, 500 e 1200 lux), e o tempo de armazenamento do leite (01, 04, 07, 10 e 14) como sub-parcela desta. As diferenças entre os tratamentos e as interações entre eles, obtidas nas avaliações da degradação da riboflavina e cor instrumental foram avaliadas por ANOVA. Os fatores e/ou interações que apresentaram valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativamente diferentes. Foram realizadas três repetições de processamento. Por se tratar de um planejamento experimental com parcelas sub-subdivididas e não balanceado, a compensação dos efeitos não balanceados foi feita pela substituição de resultados faltantes (embalagens de vidro estocadas no escuro) pelos resultados de embalagens de polietileno estocadas no escuro. Esse ajuste foi o que apresentou menor variância devido a minimização de erros das medidas envolvidas. Os fatores com efeitos estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) foram tratados separadamente para encontrar os níveis estatisticamente significativos, utilizando-se o teste de Tukey

(*Tukey's Honest Significant Difference*) para comparações entre diferenças significativas de médias. Todos os cálculos foram feitos com auxílio do Statistica (2007)<sup>®</sup>.

Os resultados da avaliação sensorial da cor, sabor e aroma e da aceitação sensorial foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) e o teste de Tukey foi usado para comparação entre as médias ( $p \leq 0,05$ ). Os dados do teste de intenção de compra foram analisados graficamente, usando-se histogramas de barras.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERÍSTICAS DO LEITE DESNATADO MICROFILTRADO PASTEURIZADO

A caracterização do leite desnatado microfiltrado pasteurizado é apresentada na Tabela 2.

**Tabela 2** Caracterização físico-química e microbiológica do leite desnatado microfiltrado pasteurizado.

<b>Componente</b>	<b>Média*</b>
<b>pH</b>	6,80 ± 0,05
<b>Acidez (% ácido láctico)</b>	0,15 ± 0,10
<b>Gordura (%)</b>	0,06 ± 0,04
<b>Proteína (%)</b>	3,03 ± 0,20
<b>Caseína (%)</b>	2,32 ± 0,25
<b>Fosfatase alcalina</b>	Negativa
<b>Peroxidase</b>	Positiva
<b>Contagem padrão em placas (UFC/mL)</b>	3,67 x 10 <sup>0</sup>
<b>Coliformes NMP/mL (30/35°C)</b>	< 0,03
<b>Coliformes NMP/mL (45 °C)</b>	Ausente
<b>Salmonela spp. /25mL</b>	Ausente

\* Média de três processos e desvio padrão.

A composição do leite apresentou valores dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira para leite A (BRASIL, 2011). A acidez, contagem padrão de mesófilos aeróbios e o número de coliformes atestam a boa qualidade ao leite. Os resultados de fosfatase alcalina negativa e peroxidase positiva indicam que o leite foi adequadamente pasteurizado.

## 4.2 MUDANÇAS DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO

### 4.2.1 Degradação da riboflavina e formação de lumicromo

A intensidade luminosa, o tempo de estocagem e a interação entre eles influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) o teor de riboflavina dos leites desnatados microfiltrados pasteurizados (Tabela 3).

**Tabela 3\_** Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para teores de riboflavina dos leites desnatados microfiltrados pasteurizados.

<b>Fatores</b>	<b>gl</b>	<b>QM</b>	<b>P</b>
Embalagem	1	0,127	0,09614
Intensidade luminosa	2	2,360	<b>0,00006</b>
Embalagem x Intensidade luminosa	2	0,038	0,10611
Tempo de estocagem	4	0,840	<b>0,00000</b>
Embalagem x Tempo de estocagem	4	0,002	0,75491
Intensidade luminosa x Tempo de estocagem	8	0,173	<b>0,00000</b>
Embalagem x Intensidade luminosa x Tempo de estocagem	8	0,003	0,59714

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

Os resultados mostram que a intensidade luminosa influenciou mais na velocidade da reação de foto-oxidação da riboflavina do que o tipo de embalagem. Ou seja, no período de tempo estudado, as condições de exposição do leite à luz (potência da lâmpada, distância da fonte luminosa) devem ser a maior fonte de preocupação para prevenir a foto-oxidação e degradação da riboflavina.

Uma pesquisa prévia, realizada em oito supermercados da cidade de Campinas – SP –Brasil, mostrou que a intensidade de luz nas gôndolas de leite pasteurizado variava de 350 a 5.300 lux (Tabela 4). Em geral, na maioria dos supermercados, a exposição do leite à luz era abaixo de 1000 lux.

**Tabela 4\_** Condições de exposição à luz de leite pasteurizado em oito supermercados de Campinas.

<b>Supermercados</b>	<b>Intensidade de luz (lux)</b>
1	510
2	550
3	830
4	570
5	5.300
6	530
7	350
8	560
<b>MÉDIA</b>	<b>1.150</b>

Nas gôndolas dos supermercados, a intensidade da luz que atinge o leite é variável e é dependente da radiação da lâmpada usada (BORLE; SIEBER; BOSSET, 2001) e da distância das prateleiras à fonte de luz (MESTDAGH et al., 2005; MORTENSEN et al., 2004). Assim, uma distância muito pequena entre a fonte de luz e as garrafas de leite pode ser a causa de exposição do leite a 5300 lux, Figura 2.

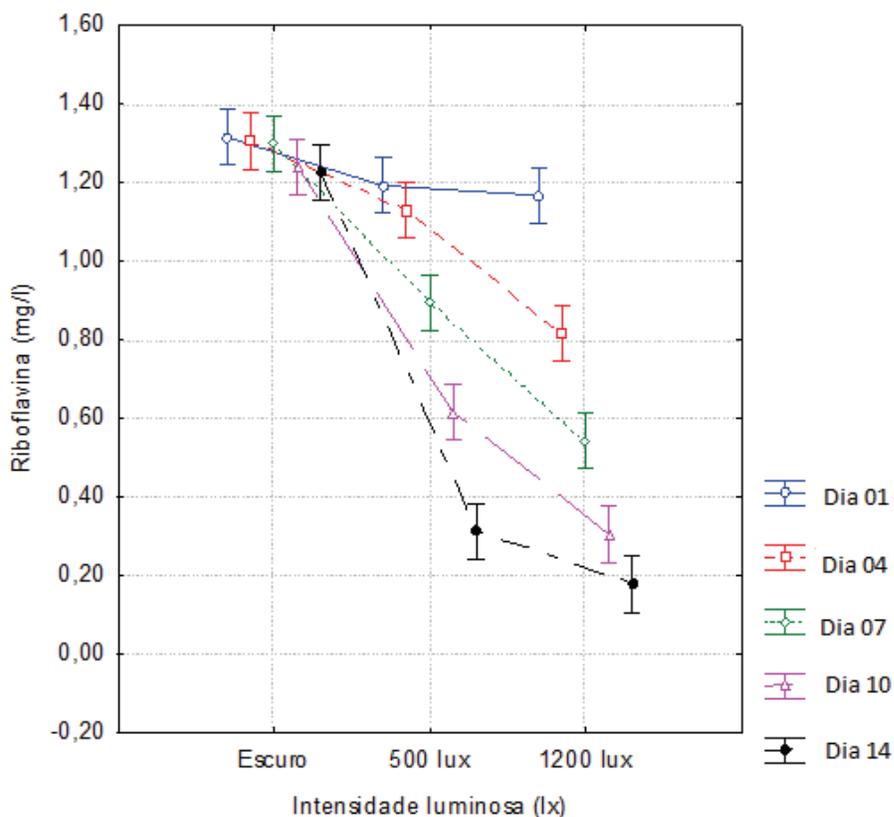
**Figura 2\_** Garrafas de leite pasteurizado muito próximas da fonte de luz, na gôndola de um supermercado de Campinas.



Na degradação da riboflavina, as variáveis tempo e intensidade de luz foram interdependentes (Tabela 3), e por isso, devem ser analisadas em conjunto. Na ausência de

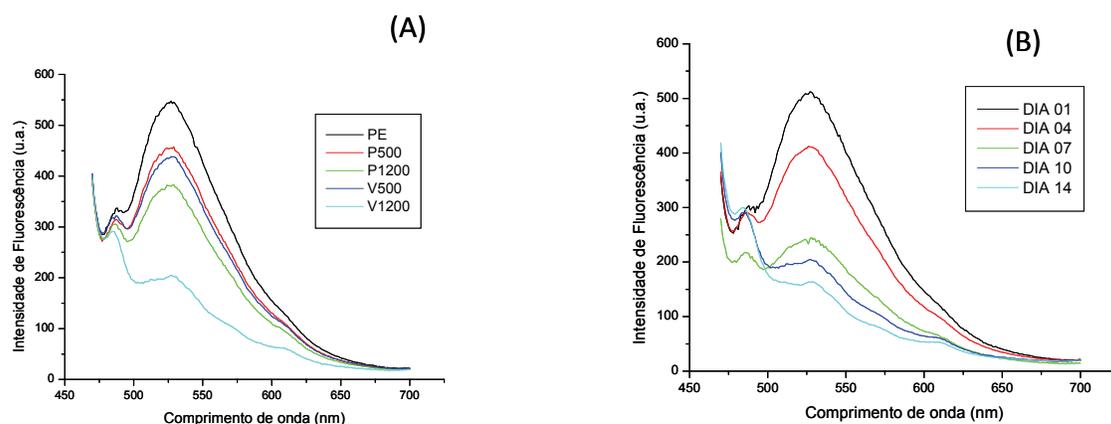
luz (controle), o teor de riboflavina do leite se manteve constante ao longo do tempo de estocagem (Figura 3), mostrando não ter havido foto-oxidação. A radiação luminosa, a qual o leite foi exposto, depende do binômio tempo/intensidade de luz. A radiação que atingiu o leite determinou a velocidade da reação de foto-oxidação. Quanto maior foi a intensidade da radiação luminosa, mais riboflavina foi sensibilizada, desencadeando a foto-oxidação dos vários componentes do leite, incluindo-se a riboflavina, que diminuiu ao longo do tempo de armazenamento refrigerado. A 1200 lux, a degradação da riboflavina foi significativa desde o primeiro dia de estocagem, enquanto a 500 lux, isso só ocorreu a partir do sétimo dia de armazenamento ( $p < 0,05$ ). Aos 14 dias de estocagem refrigerada, 76,1% da riboflavina foi degradada no leite exposto à radiação de 500 lux. Já a 1200 lux, esse valor foi de 86,4%.

**Figura 3** -Efeito da interação intensidade luminosa e tempo de estocagem no teor de riboflavina em leite desnatado microfiltrado pasteurizado.



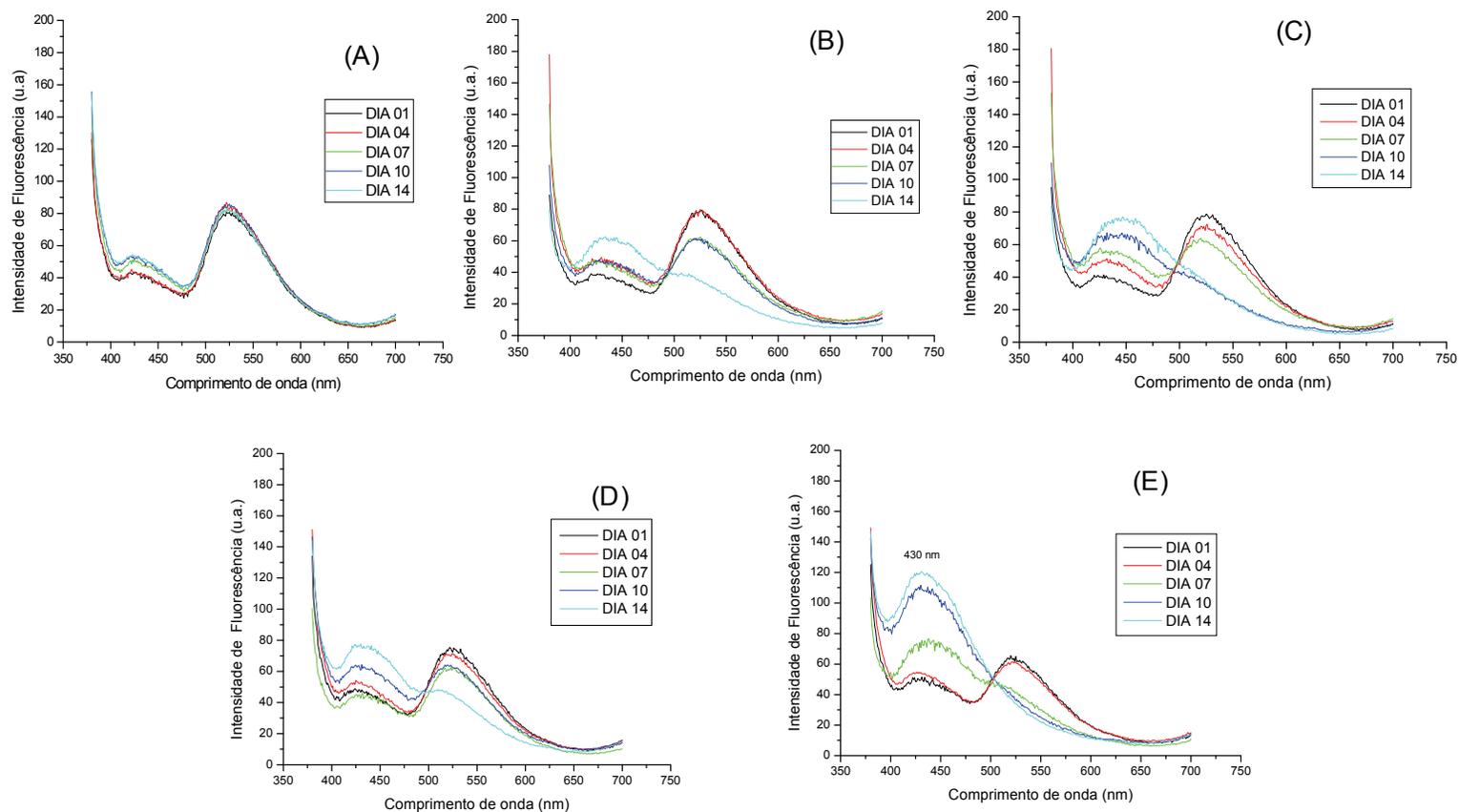
Houve degradação de riboflavina (Figura 4) e formação de lumicromo no leite exposto à diferentes intensidades de luz ao longo do tempo de estocagem (Figura 5B, 5C, 5D, 5E). A degradação da riboflavina e a formação de lumicromo foram maiores e mais rápida quando a intensidade de luz foi mais intensa (1200 lux) (Figura 5C e 5E).

**Figura 4**\_ Degradação da riboflavina em leite microfiltrado pasteurizado acondicionado em diferentes tipos de embalagens e expostos a diferentes intensidades de luz (Emissão: 525 nm).



**A)** Dia 10; **B)** Vidro sob 1200 lux, ao longo do tempo de armazenamento. **PE**: polietileno no escuro; **P500**: polietileno sob 500 lux; **P1200**: polietileno sob 1200 lux; **V500**: vidro a 500 lux; **V1200**: vidro a 1200 lux.

**Figura 5\_** Formação de lumicromo em leite desnatado microfiltrado pasteurizado (excitação a 365 nm), ao longo do tempo de armazenamento.



**A)** Polietileno de alta densidade e armazenado no escuro (controle); **B)** Polietileno de alta densidade a 500 lux ; **C)** Polietileno de alta densidade a 1200 lux; **D)** Vidro a 500 lux e **E)** Vidro a 1200 lux.

## 4.2.2 Oxidação de Proteínas

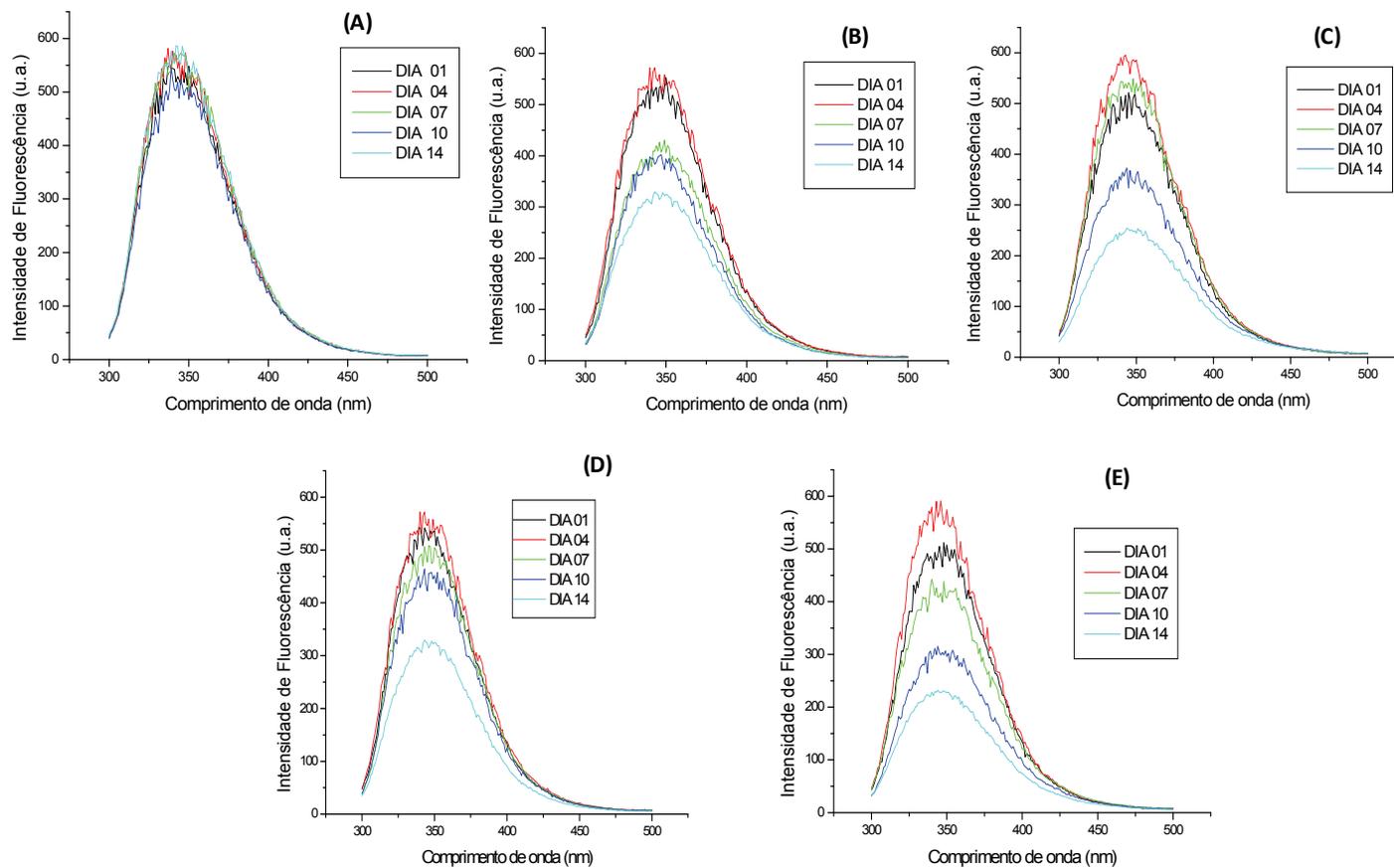
### 4.2.2.1 Triptofano

A foto-degradação do triptofano ao longo do tempo é apresentada na Figura 6. Não houve foto-oxidação de proteína no leite armazenado no escuro (Figura 6A), comprovando que a degradação do triptofano foi resultado da foto-oxidação do leite exposto à luz (Figura 6B, 6C, 6D e 6E). A degradação do triptofano acompanhou a degradação da riboflavina (Figura 4B), sendo mais uma indicação que esta degradação foi decorrente das reações de foto-oxidação das proteínas do leite.

Houve aumento da intensidade de fluorescência do triptofano nos primeiros dias de armazenamento refrigerado do leite, o que indica ter havido desnovelamento das proteínas foto-oxidadas e exposição do triptofano, decorrente de mudanças na estrutura terciária das proteínas globulares. Dalsgaard et al., (2007), ao determinarem a emissão máxima de fluorescência do triptofano com excitação seletiva a 298 nm, mostraram ter havido mudanças na estrutura terciária das proteínas globulares do leite, com desnovelamento da  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina devido à foto-oxidação.

Em geral, a partir do dia 07, houve aumento da degradação do triptofano com o tempo de estocagem. A fotodegradação do triptofano foi maior quando o leite foi acondicionado em garrafas de vidro e a intensidade da luz foi mais intensa (1200 lux) (Figura 6E).

**Figura 6.** Degradação de triptofano (excitação a 280 nm) de leite desnatado microfiltrado pasteurizado, ao longo do tempo de armazenamento.



**A)** Polietileno no escuro (controle); **B)** Polietileno 500 lux; **C)** Polietileno a 1200 lux; **D)** Vidro a 500 lux; **E)** Vidro a 1200 lux.

#### 4.2.2.2 Ditirosina

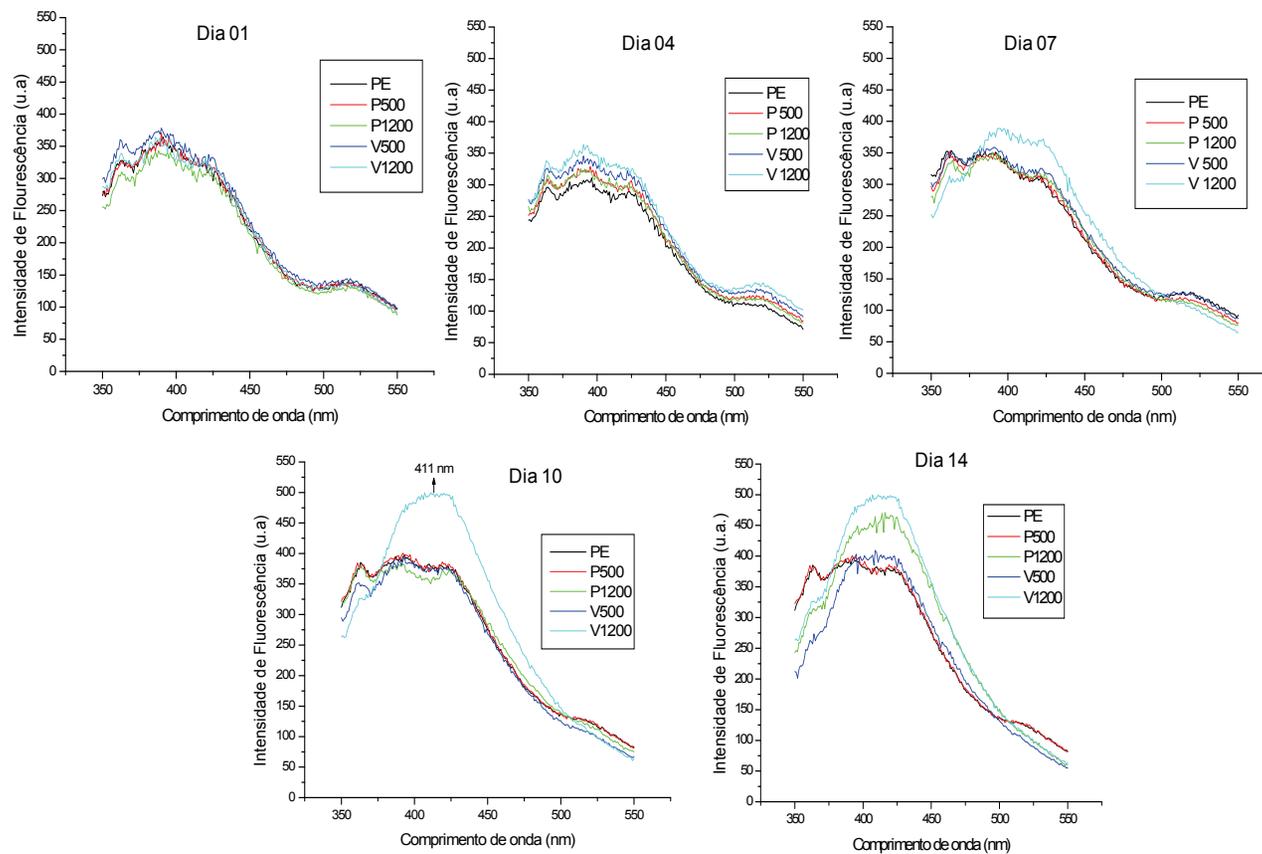
A Figura 7 apresenta a formação de ditirosina, metabólito da oxidação de proteínas, no leite envasado em vidro e polietileno, submetido a diferentes intensidades de luz, durante o tempo de estocagem.

Não houve formação de ditirosina no leite armazenado na ausência de luz e a 500 lux (Figura 7). Houve formação de ditirosina, para os leites acondicionados em vidro e polietileno, quando a intensidade de luz foi mais intensa. A 1200 lux, a formação de ditirosina (produto da degradação da tirosina) se iniciou no sétimo dia para os leites acondicionados em vidro, atingindo um máximo no dia 10 de estocagem. Já para os leites acondicionados em polietileno, a ditirosina só apareceu no dia 14 de armazenamento refrigerado (Figura 7). A maior velocidade de formação de ditirosina na embalagem de vidro a 1200 lux deve estar relacionada à maior velocidade de oxidação de proteínas, decorrente da alta intensidade de luz (1200 lux) e da alta permeabilidade à luz da embalagem de vidro.

Vários autores (DALSGAARD et al., 2007; DALSGAARD & LARSEN, 2009; MICHAELI & FEITELSON, 1995) tem mostrado que a oxidação protéica altera a estrutura secundária e terciária das proteínas, promovendo um desnovelamento da estrutura, o que as tornam mais acessíveis às reações. O desnovelamento aumenta a possibilidade da aproximação dos resíduos de tirosina. Segundo Dalsgaard et al. (2011), a formação de ditirosina depende da flexibilização da estrutura da proteína, o que permitiria a aproximação de dois resíduos de tirosina, ocorrendo, então, a dimerização em ditirosina.

Em nosso experimento, o desnovelamento das proteínas ocorreu no quarto dia de armazenamento, para todos os leites estocados sob luz (Figura 6), mas a formação de ditirosina só ocorreu para os leites acondicionados a 1200 lux, a partir do dia 7 para o leite embalado em vidro e, no dia 14, para os embalados em polietileno. Isso parece indicar que a formação de ditirosina deve ser precedida do desnovelamento protéico e é dependente da radiação luminosa recebida pelo leite, determinada pela intensidade de luz, pela barreira à luz fornecida pela embalagem e pelo tempo de exposição.

**Figura 7\_** Formação de ditirosina em leites desnatados microfiltrados pasteurizados (excitação a 325 nm), acondicionados em garrafas de vidro e de polietileno, ao longo do tempo de armazenamento.



**PE:** Polietileno no escuro (controle); **P500:** Polietileno a 500 lux; **P1200:** Polietileno a 1200 lux; **V500:** Vidro a 500 lux; **V1200:** Vidro a 1200 lux.

### 4.2.3 Cor de leite desnatado microfiltrado pasteurizado

Na Tabela 5, é apresentado o efeito da embalagem, da intensidade luminosa e do tempo de estocagem no parâmetro de cor Luminosidade ( $L^*$ ) da cor dos leites desnatados microfiltrados pasteurizados.

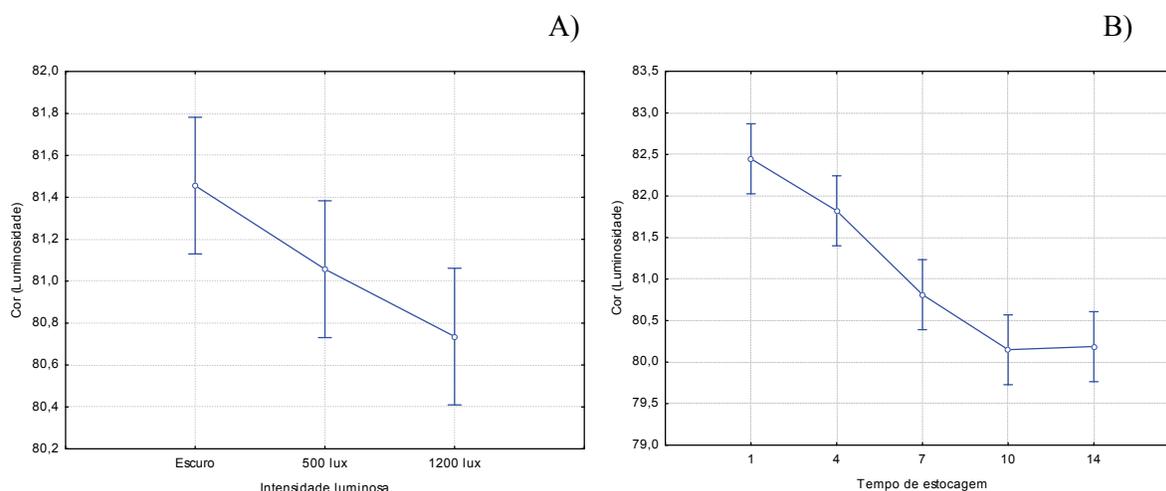
**Tabela 5\_** Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para o parâmetro de cor luminosidade ( $L^*$ ) dos leites desnatados microfiltrados pasteurizados.

Fatores	Gl	QM	P
Embalagem	1	0,559	0,10122
Intensidade luminosa	2	3,906	<b>0,00012</b>
Embalagem x Intensidade luminosa	2	0,140	0,34284
Tempo de estocagem	4	18,703	<b>0,00000</b>
Embalagem x Tempo de estocagem	4	0,170	0,93074
Intensidade luminosa x Tempo de estocagem	8	0,420	0,83277
Embalagem x Intensidade luminosa x Tempo de estocagem	8	0,081	0,99904

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

Os valores do parâmetro de cor luminosidade  $L^*$  (Figura 8) do leite desnatado microfiltrado pasteurizado apresentaram um decréscimo com aumento da intensidade luminosa (8A) e ao longo do tempo de estocagem (8B). A luminosidade da cor do leite está relacionada com a cor branca das proteínas, que contribuem para valores de  $L^*$  próximos de 100. A redução no valor de  $L^*$  indicou um escurecimento na cor do leite, e ocorreu devido à foto-oxidação das proteínas do leite, que foi comprovada pela degradação do triptofano (Figura 6) e formação de ditirosina (Figura 7).

**Figura 8\_** Efeito da intensidade luminosa (A) e do tempo (B) no parâmetro de cor Luminosidade ( $L^*$ ) do leite desnatado microfiltrado pasteurizado.



O croma é a saturação da cor ou intensidade da cor, e o hue é a tonalidade ou a cor propriamente dita (MORTENSEN; SORENSEN; STAPELFELDT, 2002).

A intensidade de luz, o tempo de estocagem e a interação entre eles influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) no valor do croma ( $C^*$ ) e no valor do hue (h) da cor do leite desnatado microfiltrado pasteurizado. A interação entre embalagem e intensidade luminosa influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) apenas no valor do croma ( $C^*$ ) (Tabela 6). A intensidade da luz influenciou mais na redução do croma ( $C^*$ ) e no aumento do hue do que o tipo de embalagem. O tipo de embalagem apenas influenciou no croma quando o leite foi submetido à alta intensidade de luz (1200 lux) (Figura 9A).

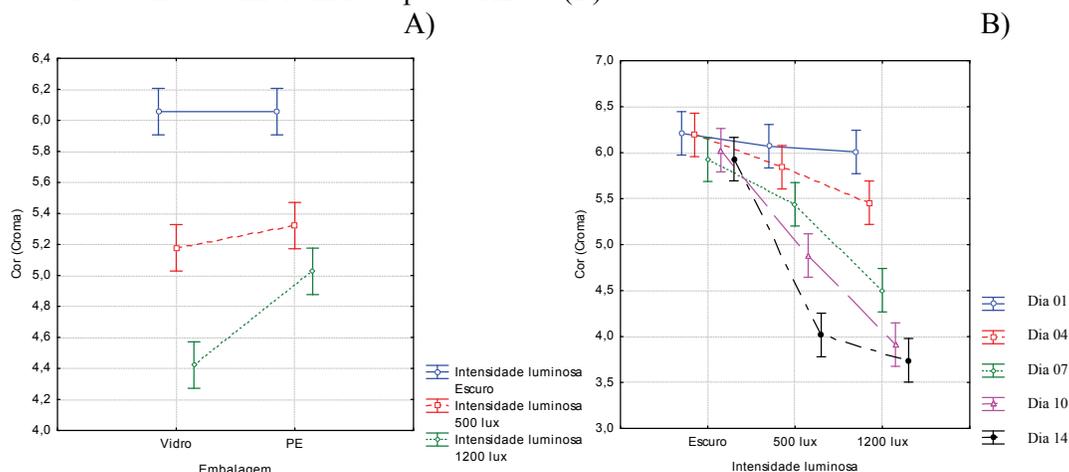
**Tabela 6**\_Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para os parâmetros de cor croma e hue.

Fontes	(croma - $C^*$ )			(hue -h)	
	gl	QM	P	QM	P
Embalagem	1	1,396	0,09284	76,176	0,25770
Intensidade luminosa	2	13,518	<b>0,00000</b>	1.153,115	<b>0,00005</b>
Embalagem x Intensidade luminosa	2	0,747	<b>0,03078</b>	45,835	0,23920
Tempo de estocagem	4	7,103	<b>0,00000</b>	843,416	<b>0,00000</b>
Embalagem x Tempo de estocagem	4	0,084	0,34090	9,008	0,77489
Intensidade luminosa x Tempo de estocagem	8	1,435	<b>0,00000</b>	200,432	<b>0,00000</b>
Embalagem x Intensidade luminosa x Tempo de estocagem	8	0,076	0,41079	5,536	0,97142

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

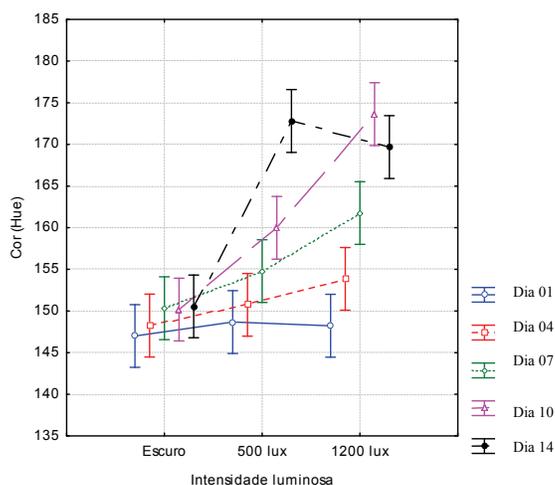
No tratamento controle (polietileno no escuro), os valores de croma (Figura 9B) e de hue (Figura 10) não se alteraram significativamente ( $p > 0,05$ ), ao longo do tempo de estocagem. No escuro não há energia luminosa para desencadear a reação de foto-oxidação.

**Figura 9**\_ Efeito da interação da embalagem e da intensidade da luz (A) e efeito da interação da intensidade luminosa e do tempo de estocagem no parâmetro de cor croma do leite desnatado microfiltrado pasteurizado (B).



A 500 lux, houve uma redução do croma e um aumento do hue no sétimo dia de estocagem. Já a 1200 lux, estas alterações foram percebidas desde o quarto dia de estocagem. O croma diminuiu porque a foto-oxidação descoloriu os componentes que dão coloração ao leite, como proteínas, riboflavina,  $\beta$ -caroteno, etc. O hue, ou a tonalidade da cor, foi praticamente constante para o leite armazenado no escuro mas aumentou com o tempo para o leite exposto à luz (Figura 10).

**Figura 10.** Efeito da interação da intensidade luminosa e do tempo de estocagem no parâmetro cor hue do leite desnatado microfiltrado pasteurizado.



A riboflavina é um composto amarelo esverdeado, que ao ser fotodegradado contribui para a redução da intensidade da cor ( $C^*$ ) e para mudança da tonalidade do leite (h). O aumento no ângulo hue significou que houve diminuição da cor amarela e aumento do verde. Mestdagh et al. (2005) também perceberam uma redução na cor amarela do leite oxidado pela luz causada pela degradação da riboflavina, do  $\beta$ -caroteno e da molécula de vitamina A.

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO SENSORIAL DE COR, AROMA E SABOR COM ASSESSOR TREINADO

A embalagem, a intensidade de luz e o tempo influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) na análise sensorial de cor, aroma e sabor característicos e oxidados do leite desnatado microfiltrado pasteurizado. As notas de cor, aroma e sabor característicos de

leite desnatado oxidado foram maiores quando o leite foi acondicionado em embalagem de vidro e exposto a 1200 lux (Tabelas 7, 8 e 9).

No dia 01 de estocagem refrigerada, o assessor treinado não percebeu diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre as amostras de leite. No dia 04, foi possível diferenciar as amostras pelo aroma e sabor (Tabela 7 e 8). A descrição de sabor levemente adocicado, com gosto de flocos de milho foi conferida ao leite acondicionado em garrafas de vidro e armazenado a 1200 lux.

**Tabela 7\_** Médias de intensidade de aroma de leite desnatado e de leite desnatado oxidado, avaliadas por assessores treinados.

	Aroma característico de leite desnatado					Aroma característico de leite desnatado oxidado				
	Plástico			Vidro		Plástico			Vidro	
	Escuro	500lux	1200lux	500lux	1200lux	Escuro	500lux	1200lux	500lux	1200lux
<b>Dia 01</b>	8,74 <sup>Aa</sup>	8,79 <sup>Aa</sup>	8,65 <sup>Aa</sup>	8,74 <sup>Aa</sup>	8,50 <sup>Aa</sup>	0,19 <sup>Ba</sup>	0,17 <sup>Da</sup>	0,30 <sup>Da</sup>	0,33 <sup>Ea</sup>	0,34 <sup>Ca</sup>
<b>Dia 04</b>	8,24 <sup>Aba</sup>	8,16 <sup>Aab</sup>	7,60 <sup>Bbc</sup>	7,68 <sup>Bab</sup>	6,97 <sup>Bc</sup>	0,56 <sup>ABb</sup>	0,69 <sup>CDb</sup>	1,56 <sup>Ca</sup>	1,42 <sup>Da</sup>	1,76 <sup>Ba</sup>
<b>Dia 07</b>	7,65 <sup>Bca</sup>	7,03 <sup>Ba</sup>	4,84 <sup>Cb</sup>	4,20 <sup>Cb</sup>	1,43 <sup>Cc</sup>	0,81 <sup>Ac</sup>	1,21 <sup>Cc</sup>	3,70 <sup>Bb</sup>	4,10 <sup>Cb</sup>	7,23 <sup>Aa</sup>
<b>Dia 10</b>	7,51 <sup>Ca</sup>	5,44 <sup>Cb</sup>	4,69 <sup>Cb</sup>	2,89 <sup>Dc</sup>	0,99 <sup>Cd</sup>	0,69 <sup>ABd</sup>	2,52 <sup>Bc</sup>	6,36 <sup>Ab</sup>	5,96 <sup>Bb</sup>	7,83 <sup>Aa</sup>
<b>Dia 14</b>	6,10 <sup>Da</sup>	3,34 <sup>Db</sup>	2,86 <sup>Dc</sup>	1,32 <sup>Ed</sup>	1,05 <sup>Cd</sup>	0,80 <sup>Ac</sup>	4,83 <sup>Ab</sup>	6,78 <sup>Aa</sup>	7,57 <sup>Aa</sup>	7,59 <sup>Aa</sup>

\* Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes.

\* Letras maiúsculas referem-se à comparação entre os diferentes tempos de análise.

\* Letras minúsculas referem-se à comparação entre os diferentes tratamentos.

**Tabela 8\_** Médias de intensidade de sabor de leite desnatado e de leite desnatado oxidado, avaliadas por assessores treinados.

	Sabor característico de leite desnatado					Sabor característico de leite desnatado oxidado				
	Plástico			Vidro		Plástico			Vidro	
	Escuro	500lux	1200lux	500lux	1200lux	Escuro	500lux	1200lux	500lux	1200lux
<b>Dia 01</b>	8,73 <sup>Aa</sup>	8,72 <sup>Aa</sup>	8,71 <sup>Aa</sup>	8,52 <sup>Aa</sup>	8,50 <sup>Aa</sup>	0,24 <sup>Ca</sup>	0,20 <sup>Da</sup>	0,30 <sup>Ca</sup>	0,43 <sup>Ea</sup>	0,42 <sup>Da</sup>
<b>Dia 04</b>	8,29 <sup>Aba</sup>	8,06 <sup>Aab</sup>	7,35 <sup>Bc</sup>	7,45 <sup>Bbc</sup>	6,91 <sup>Bc</sup>	0,46 <sup>BCb</sup>	0,75 <sup>CDb</sup>	1,42 <sup>Ca</sup>	1,36 <sup>Da</sup>	1,48 <sup>Ca</sup>
<b>Dia 07</b>	7,71 <sup>Ba</sup>	6,93 <sup>Ba</sup>	4,45 <sup>Cb</sup>	4,26 <sup>Cb</sup>	1,40 <sup>Cc</sup>	0,80 <sup>Abc</sup>	1,22 <sup>Cc</sup>	3,84 <sup>Bb</sup>	4,46 <sup>Cb</sup>	7,23 <sup>Ba</sup>
<b>Dia 10</b>	7,73 <sup>Ba</sup>	5,00 <sup>Cb</sup>	3,57 <sup>Cc</sup>	3,01 <sup>Dc</sup>	1,05 <sup>CDd</sup>	0,80 <sup>Abc</sup>	3,19 <sup>Bd</sup>	6,55 <sup>Ab</sup>	5,56 <sup>Bc</sup>	8,12 <sup>Aa</sup>
<b>Dia 14</b>	6,52 <sup>Ca</sup>	3,18 <sup>Db</sup>	2,23 <sup>Dc</sup>	1,40 <sup>Ed</sup>	0,77 <sup>Dd</sup>	0,96 <sup>Abc</sup>	4,66 <sup>Ab</sup>	7,85 <sup>Aa</sup>	7,64 <sup>Aa</sup>	8,09 <sup>Aa</sup>

\* Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes

\* Letras maiúsculas referem-se à comparação entre os diferentes tempos de análise

\* Letras minúsculas referem-se à comparação entre os diferentes tratamentos

No dia 07, os assessores treinados não perceberam diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre as amostras controle e as amostras de leite acondicionadas em garrafas de polietileno a 500 lux. Todas as amostras de leite armazenadas no escuro (controle) e acondicionadas em polietileno a 500 lux mantiveram, até o sétimo dia, a cor (Tabela 9),

o aroma (Tabela 7) e sabor (Tabela 8) característicos de leite desnatado. Já as amostras de leite submetidas a 1200 lux (polietileno e vidro) e as acondicionadas em vidro a 500 lux, o aroma, o sabor e a cor de leite desnatado oxidado aumentaram significativamente no sétimo dia ( $p < 0,05$ ) (Figura 11). Este comportamento foi mais pronunciado para os leites acondicionados em garrafas de vidro armazenados sob 1200 lux (Tabela 7, 8 e 9 e Figura 11).

**Tabela 9\_** Médias de intensidade de cor de leite desnatado e de leite desnatado oxidado, avaliadas por assessores treinados

	<b>Cor característica de leite desnatado</b>					<b>Cor característica de leite desnatado oxidado</b>				
	Plástico			Vidro		Plástico			Vidro	
	Escuro	500lux	1200lux	500lux	1200lux	Escuro	500lux	1200lux	500lux	1200lux
<b>Dia 01</b>	8,79 <sup>Aa</sup>	8,84 <sup>Aa</sup>	8,65 <sup>Aa</sup>	8,78 <sup>Aa</sup>	8,69 <sup>Aa</sup>	0,04 <sup>Ba</sup>	0,12 <sup>Ca</sup>	0,27 <sup>Ca</sup>	0,23 <sup>Da</sup>	0,16 <sup>Ca</sup>
<b>Dia 04</b>	8,48 <sup>Aa</sup>	8,14 <sup>Bab</sup>	7,84 <sup>Bb</sup>	7,78 <sup>Bb</sup>	7,62 <sup>Bb</sup>	0,25 <sup>Aba</sup>	0,26 <sup>Ca</sup>	0,42 <sup>Ca</sup>	0,43 <sup>Da</sup>	0,47 <sup>Ca</sup>
<b>Dia 07</b>	7,96 <sup>Ba</sup>	7,32 <sup>Ca</sup>	6,11 <sup>Bb</sup>	6,29 <sup>Cb</sup>	3,12 <sup>Cc</sup>	0,29 <sup>Abc</sup>	0,40 <sup>BCc</sup>	1,30 <sup>Bb</sup>	1,44 <sup>Cb</sup>	3,52 <sup>Ba</sup>
<b>Dia 10</b>	8,00 <sup>Ba</sup>	6,4 <sup>Db</sup>	3,34 <sup>Cd</sup>	4,38 <sup>Dc</sup>	1,75 <sup>De</sup>	0,32 <sup>Abc</sup>	0,81 <sup>Bc</sup>	2,87 <sup>Ab</sup>	2,55 <sup>Bb</sup>	5,16 <sup>Aa</sup>
<b>Dia 14</b>	7,36 <sup>Ca</sup>	5,34 <sup>Eb</sup>	2,16 <sup>Cd</sup>	3,82 <sup>Ec</sup>	1,56 <sup>Dd</sup>	0,53 <sup>Ad</sup>	2,39 <sup>Ac</sup>	2,96 <sup>Ac</sup>	4,19 <sup>Ab</sup>	5,23 <sup>Aa</sup>

\* Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes

\* Letras maiúsculas referem-se à comparação entre os diferentes tempos de análise

\* Letras minúsculas referem-se à comparação entre os diferentes tratamentos

De acordo com os assessores, o desaparecimento do sabor e aroma característico do leite desnatado e a formação do sabor de leite desnatado oxidado, com gosto levemente salgado e sabor de amendoim ocorreram no sétimo dia de armazenamento sob luz (Tabela 8). A diminuição do gosto levemente adocicado e aparecimento de gosto salgado pode ser resultado da foto-oxidação da lactose do leite, o que faz com que o leite perca o gosto adocicado e prevaleça o sabor salgado. Os assessores também relataram que, ao sétimo dia, a cor dos leites acondicionados em garrafas de vidro e dos leites acondicionados em garrafas de polietileno sob 1200 lux, deixou de ser a cor branca esverdeada do leite desnatado e passou a ser uma cor branca acinzentada. Esta mudança de cor foi proveniente da foto-oxidação dos componentes do leite.

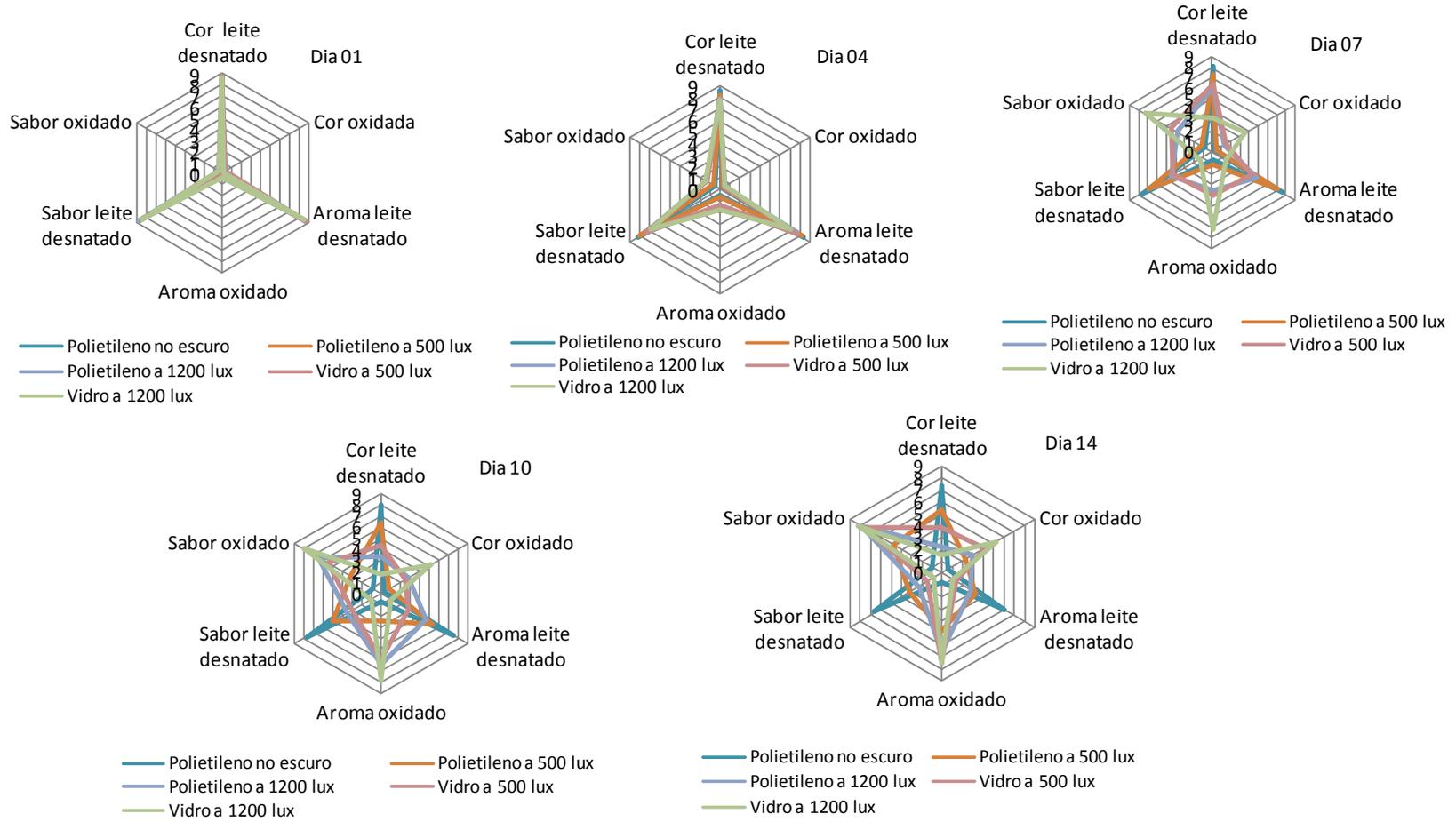
Nos dias 10 e 14 de estocagem, apenas a amostra controle (polietileno no escuro) manteve a cor, aroma e sabor característico de leite desnatado. Em todas as outras amostras, as notas de sabor e aroma característicos de leite desnatado foram diminuindo e as de leite desnatado oxidado aumentando ao longo do tempo de estocagem (Tabela 8 e Figura 11).

Os assessores treinados perceberam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de cor para todos os tratamentos entre o dia 01 e 14 de estocagem, como comprovado pelos valores de  $\Delta E$ , obtidos da análise instrumental de cor. Valores de  $\Delta E$  menores que 1,5 significam que as amostras são pouco distintas, valores entre 1,5 e 3, as amostras são distintas e valores maiores do que 3, as amostras são muito distintas (PATHARE; OPARA; AL-SAID, 2013). Portanto, os valores da diferença global de cor entre as amostras do dia 01 e do dia 14 mostram que as amostras de leite armazenado no escuro e as amostras de leite armazenado em garrafas de polietileno a 1200 lux foram distintas ( $\Delta E = 1,88$  e  $2,88$ , respectivamente). Os dados mostram também que a cor do leite armazenado em garrafas de polietileno a 500 lux, do leite armazenado em garrafas de vidro a 500 lux e a 1200 lux foram muito distintas ( $\Delta E = 3,16$ ;  $3,54$  e  $3,39$ , respectivamente).

No 14º dia de estocagem, os assessores relataram sobre sabor de papelão e de sabão de coco aos leites armazenados em polietileno, expostos à luz. Sabor de "miojo", aroma de salgadinho, sabor adstringente e sabor residual de metal foram os termos usados para descrever o leite acondicionado em vidro, no décimo quarto dia de estocagem.

As reações de foto-oxidação podem variar de acordo com o comprimento de onda da luz que atinge o leite, conforme a barreira à luz da embalagem (AIRADO-RODRIGUEZ et al., 2011). Possivelmente, esta é a explicação para os diferentes *off-flavors* formados nos leites acondicionados em garrafas de polietileno e garrafas de vidro.

**Figura 11-** Atributos sensoriais de leite desnatado microfiltrado pasteurizado, ao longo do tempo de estocagem.



#### 4.4 ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA

A embalagem, a intensidade de luz e o tempo influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) na aceitação do leite microfiltrado pasteurizado. A aceitação do leite microfiltrado pasteurizado foi menor quando o leite foi acondicionado em embalagem de vidro e sob a mais alta intensidade de luz (1200 lux) (Tabela 11).

No dia 01 e 04 de estocagem refrigerada, o provador não percebeu diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as amostras de leite. No dia 07, os consumidores não perceberam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras controle e as amostras de polietileno a 500 lux. Estas duas amostras tiveram uma boa aceitação no dia 07 (Tabela 10 e 11).

**Tabela 10\_** Médias de Aceitação em relação à Aparência (Cor) e Aroma.

	Aparência (cor)					Aroma				
	Polietileno			Vidro		Polietileno			Vidro	
	Escuro (controle)	500 lux	1200 lux	500 lux	1200 lux	Escuro (controle)	500 lux	1200 lux	500 lux	1200 lux
Dia 01	7,30 <sup>Aa</sup>	7,40 <sup>Aa</sup>	7,31 <sup>Aba</sup>	7,24 <sup>Aa</sup>	7,38 <sup>ABa</sup>	6,11 <sup>Aa</sup>	6,21 <sup>Aba</sup>	6,09 <sup>ABa</sup>	6,18 <sup>Aa</sup>	6,25 <sup>Aa</sup>
Dia 04	7,54 <sup>Aa</sup>	7,57 <sup>Aa</sup>	7,57 <sup>Aa</sup>	7,50 <sup>Aa</sup>	7,49 <sup>Aa</sup>	6,65 <sup>Aa</sup>	6,48 <sup>Aa</sup>	6,41 <sup>Aa</sup>	6,22 <sup>Aa</sup>	6,27 <sup>Aa</sup>
Dia 07	7,06 <sup>Aa</sup>	7,24 <sup>ABa</sup>	6,88 <sup>Ba</sup>	7,08 <sup>Aa</sup>	6,92 <sup>Ba</sup>	6,15 <sup>Aab</sup>	6,44 <sup>Aa</sup>	5,53 <sup>Bbc</sup>	5,17 <sup>Bc</sup>	<b>4,30<sup>Bd</sup></b>
Dia 10	7,28 <sup>Aa</sup>	6,90 <sup>Ba</sup>	FVP	FVP	FVP	6,64 <sup>Aa</sup>	5,57 <sup>Bb</sup>	FVP	FVP	FVP
Dia 14	7,00 <sup>Aa</sup>	6,87 <sup>Ba</sup>	FVP	FVP	FVP	6,27 <sup>Aa</sup>	5,15 <sup>Bb</sup>	FVP	FVP	FVP

\* Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes

\* Letras maiúsculas referem-se à comparação entre os diferentes tempos de análise

\* Letras minúsculas referem-se à comparação entre os diferentes tratamentos

FVP: Fim da vida de prateleira

Para o consumidor, o sabor foi o parâmetro sensorial determinante para rejeição do consumo das amostras de leite, ao sétimo dia. Possivelmente, a rejeição dos consumidores (Tabela 11) em relação ao sabor do leite, no sétimo dia de estocagem refrigerada, foi decorrente da foto-oxidação das proteínas do leite. O triptofano (Figura 6) começou a ser degradado e a ditirosina começou a ser formada (Figura 7) também ao sétimo dia de estocagem.

**Tabela 11-** Médias de Aceitação em relação ao Sabor e Impressão global.

	Sabor					Impressão global				
	Polietileno			Vidro		Polietileno			Vidro	
	Escuro (controle)	500 lux	1200 lux	500 lux	1200 lux	Escuro (controle)	500 lux	1200 lux	500 Lux	1200 lux
Dia 01	6,21 <sup>Aba</sup>	6,14 <sup>Aa</sup>	5,76 <sup>Aa</sup>	5,81 <sup>Aa</sup>	6,02 <sup>Aa</sup>	6,36 <sup>Aba</sup>	6,45 <sup>Aa</sup>	6,09 <sup>Aa</sup>	6,15 <sup>Aa</sup>	6,34 <sup>Aa</sup>
Dia 04	6,51 <sup>Aa</sup>	6,24 <sup>Aa</sup>	6,32 <sup>Aa</sup>	6,01 <sup>Aa</sup>	6,28 <sup>Aa</sup>	6,66 <sup>Aa</sup>	6,47 <sup>Aa</sup>	6,50 <sup>Aa</sup>	6,31 <sup>Aa</sup>	6,38 <sup>Aa</sup>
Dia 07	5,98 <sup>Aba</sup>	5,93 <sup>ABa</sup>	<b>4,69<sup>Bb</sup></b>	<b>4,70<sup>Bb</sup></b>	<b>3,53<sup>Bc</sup></b>	6,25 <sup>Aba</sup>	6,19 <sup>Aba</sup>	5,13 <sup>Bb</sup>	5,10 <sup>Bb</sup>	<b>4,06<sup>Bc</sup></b>
Dia 10	6,18 <sup>Aba</sup>	5,31 <sup>Bb</sup>	FVP	FVP	FVP	6,52 <sup>Aba</sup>	5,68 <sup>Bb</sup>	FVP	FVP	FVP
Dia 14	5,7 <sup>Ba</sup>	<b>4,69<sup>Bb</sup></b>	FVP	FVP	FVP	5,98 <sup>Ba</sup>	5,17 <sup>Bb</sup>	FVP	FVP	FVP

\* Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes

\* Letras maiúsculas referem-se à comparação entre os diferentes tempos de análise

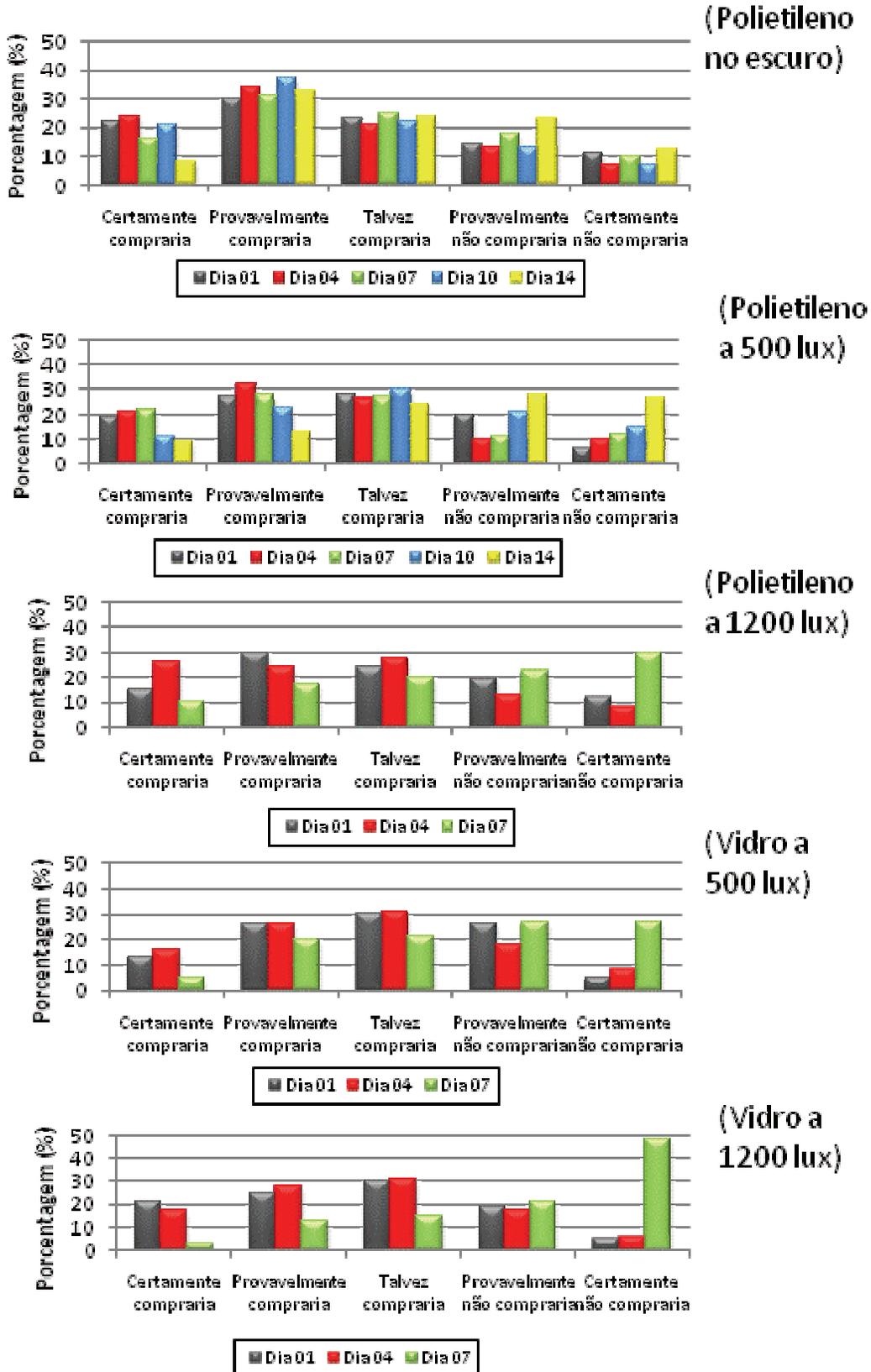
\* Letras minúsculas referem-se à comparação entre os diferentes tratamentos

FVP: Fim da vida de prateleira

No dia 10, o consumidor só avaliou a aceitabilidade dos leites controle e dos acondicionados em polietileno a 500 lux, pois a vida de prateleira dos outros leites já tinha sido finalizada no dia 7. Entre estas duas amostras avaliadas, o consumidor percebeu diferença sensorial em relação aos parâmetros avaliados, com exceção da cor. Entretanto, os consumidores não rejeitaram nenhuma amostra no dia 10. No dia 14, os consumidores rejeitaram o leite acondicionado em polietileno a 500 lux devido ao sabor.

A intenção de compra (Figura 12) reafirmou o resultado da aceitação sensorial. Os leites submetidos à luz, com exceção do leite acondicionado em polietileno e armazenado sob 500 lux, obtiveram intenção de compra negativa ao sétimo dia de armazenamento. Esta intenção de compra foi de um percentual maior que 50 % entre provavelmente não compraria a certamente não compraria.

**Figura 12-** Histograma de intenção de compra do leite desnatado microfiltrado pasteurizado.



#### 4.5 VIDA DE PRATELEIRA DO LEITE DESNATADO MICROFILTRADO PASTEURIZADO

A vida de prateleira do leite desnatado microfiltrado pasteurizado acondicionado em garrafas de plástico e armazenado no escuro (controle) foi de 10 a 14 dias, sendo o fator determinante desta o limite microbiológico (Tabela 12). Até o dia 10, a contagem de mesófilos aeróbios do leite desnatado microfiltrado pasteurizado acondicionado em garrafas de plástico e armazenado no escuro (controle) estava abaixo do limite de  $1,0 \times 10^3$  UFC/mL (BRASIL, 2011). Já no dia 15, a contagem de mesófilos aeróbios foi maior que o limite, resultando no fim da vida de prateleira. Portanto, o fator determinante para vida de prateleira do leite acondicionado em garrafas de polietileno no escuro não foi a formação de *off-flavors*, já que no escuro não houve foto-oxidação, e sim a contagem microbiológica que ultrapassou o limite.

**Tabela 12.** Contagem padrão em placas de mesófilos aeróbios/mL de leite desnatado microfiltrado pasteurizado.

	<b>Dia 01</b>	<b>Dia 05</b>	<b>Dia 10</b>	<b>Dia 15</b>
Contagem de mesófilos aeróbios (UFC/mL)	$7,0 \times 10^0$	$4,0 \times 10^1$	$2,8 \times 10^2$	$2,5 \times 10^4$

Os leites armazenados sob incidência de luz tiveram vida de prateleira menor, de 4 a 6 dias, com exceção do leite acondicionado em polietileno e armazenado sob 500 lux, que obteve uma vida de prateleira dentro do intervalo de 10 a 13 dias. Esta vida de prateleira menor, em relação ao leite armazenado no escuro, ocorreu devido à formação de *off-flavors* decorrentes da foto-oxidação das proteínas do leite.

A embalagem influenciou na vida de prateleira quando a intensidade de luz foi mais baixa (500 lux). A 500 lux, para o leite acondicionado em garrafas de vidro a vida de prateleira finalizou no sétimo dia. Já para os leites acondicionados em polietileno, a vida de prateleira finalizou ao décimo quarto dia de estocagem. A 1200 lux, independente do tipo de embalagem, a vida de prateleira dos leites microfiltrados pasteurizados finalizou ao sétimo dia (Tabela 11). A intensidade de luz influenciou mais na vida de prateleira do que o tipo de embalagem, pois se a intensidade de luz é alta, mesmo que a embalagem reflita e absorva uma parte dos fótons de luz, uma grande quantidade de fótons atingirá a superfície do leite (MORTENSEN et al., 2004).

## 5 CONCLUSÃO

A intensidade luminosa influenciou mais na velocidade da reação de foto-oxidação do que o tipo de embalagem. A degradação da riboflavina e a formação de lumicromo foram maiores e mais rápidas quando a intensidade de luz foi mais intensa (1200 lux), mostrando que as condições de exposição do leite à luz (potência da lâmpada, distância da fonte luminosa) devem ser a maior fonte de preocupação para prevenir a foto-oxidação e degradação da riboflavina. Aos 14 dias de estocagem refrigerada do leite, 76,1% da riboflavina foi degradada no leite exposto à radiação de 500 lux. Já a 1200 lux, esse valor foi de 86,4%. Nos primeiros dias de armazenamento refrigerado, houve desnovelamento das proteínas foto-oxidadas e exposição do triptofano, decorrente de mudanças na estrutura terciária das proteínas globulares. O início da degradação do triptofano ocorreu no dia 07, e aumentou com o tempo de estocagem. A fotodegradação do triptofano foi maior quando o leite foi acondicionado em garrafas de vidro e a intensidade da luz foi mais intensa (1200 lux). Houve formação de ditirosina após o desnovelamento das proteínas, para os leites acondicionados em vidro e polietileno, quando a intensidade de luz foi mais intensa. Entretanto, para os leites acondicionados em garrafas de vidro, a velocidade da formação da ditirosina foi mais rápida. Isso pareceu indicar que a formação de ditirosina deve ser precedida do desnovelamento protéico e é dependente da radiação luminosa recebida pelo leite, determinada pela intensidade de luz, pela barreira à luz fornecida pela embalagem e pelo tempo de exposição. A foto-oxidação das proteínas do leite e a degradação da riboflavina e outros compostos responsáveis pela cor do leite resultaram na diminuição do valor dos parâmetros de cor luminosidade e croma e, no aumento do parâmetro de cor *hue* do leite ao longo do tempo de estocagem. Quanto maior a intensidade luminosa, maior foi o efeito na cor do leite. Entretanto, as mudanças na cor do leite para cor característica de leite desnatado oxidado só foram percebidas aos 7 dias de armazenamento refrigerado pelos assessores treinados, e imperceptíveis, durante todo o período de estocagem, pelos consumidores. A vida de prateleira dos leites armazenados no escuro (controle) foi de 10 a 14 dias. Sob exposição à luz, o parâmetro determinante para o fim da vida de prateleira foi o sabor induzido pela luz, proveniente da foto-oxidação das proteínas do leite. A 1200 lux, independente do tipo de embalagem, a vida de prateleira dos leites microfiltrados pasteurizados foi de 4-6 dias. O tipo de embalagem somente influenciou na vida de prateleira quando a intensidade de luz foi

mais baixa (500 lux). Nessa intensidade de radiação luminosa, a vida de prateleira do leite pasteurizado aumentou de 4-6 dias para 10-13 dias, quando a embalagem de vidro foi substituída pelo polietileno. Isso mostra que, em condições adequadas de exposição à luz (500 lux) e embalagem (Polietileno), houve um aumento de mais de 40% na vida de prateleira do leite pasteurizado.

## 6 REFERÊNCIAS

AIRADO-RODRÍGUEZ, D.; INTAWIWAT, N.; SKARET, J.; WOLD, J. P. Effect of naturally occurring tetrapyrroles on photooxidation in cow's milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 59, p. 3905-3914, 2011.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 Ed. Washington, 2001.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM E2454-05: **Standard guide for sensory evaluation methods to determine the sensory shelf life of consumer products**. West Conshohochen: ASTM International, 2005. 9p.

ANDERSEN, C. M.; MORTENSEN, G. Fluorescence Spectroscopy: a rapid tool for analyzing dairy products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 56, p. 720-729, 2008.

ANDERSEN, C. M.; VISHART, M.; HOLM, V. K. Application of Fluorescence Spectroscopy in the Evaluation of Light-Induced Oxidation in Cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 53, p. 9985-9992, 2005.

ANDERSEN, L. T.; LUND, M. N.; GLYAGER, R.; JENSEN, S. B. MORTENSEN, G.; SKIBSTED, L. H. Light-induced deterioration of reduced-fat cream cheese. Relative importance of protein and lipid oxidation. **Milchwissenschaft**, vol. 61, n. 02, p.162-165, 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of AOAC International**. 2006.

BECKER, E. M.; CHRISTENSEN, J.; FREDERIKSEN, C. S.; HAUGAARD, V. K. Front-face fluorescence spectroscopy and chemometrics in analysis of yogurt: rapid analysis of riboflavin. **Journal of Dairy Science**, Champaign, vol.86, n.08, p. 2508-2515, 2003.

BINETTI, A G.; BAILO, N. B.; REINHEIMER, J. A. Aplicaciones de la microfiltración en la industria láctea. **Tecnología Láctea Latinoamericana**, n° 24, p. 48-52, 2001.

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

BRADLEY, D. G.; KIM, H. J.; MIN, D. B. Effects, quenching mechanisms, and kinetics of water soluble compounds in riboflavin photosensitized oxidation of milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 54, p. 6016-6020, 2006.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade

de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 dez. 2011.

CHOE, E.; HUANG, R.; MIN, D. B. Chemical reactions and stability of riboflavin in foods. **Journal of Food Science**, vol.70, n. 1, p. 28-36, 2005.

CHOE, E.; MIN, D. B. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, vol. 46, p. 1-22, 2006.

CLAUSEN, M. R.; HUVAERE, K.; SKIBSTED, L.H.; STAGSTED, J. Characterization of peroxides formed by riboflavin and light exposure of milk. Detection of urate hydroperoxide as a novel oxidation product. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 58, p. 481-487, 2010.

DALSGAARD, T. K.; HEEGAARD, C. W.; LARSEN, L. B. Plasmin Digestion of Photooxidized Milk Proteins. **Journal of Dairy Science**, Champaign, vol. 91, p. 2175-2183, 2008.

DALSGAARD, T. K.; LARSEN, L. B. Effect of photo-oxidation of major milk proteins on protein structure and hydrolysis by chymosin. **International Dairy Journal**, Barking, vol. xxx, p. 1-10, 2009.

DALSGAARD, T. K.; NIELSEN, J. H.; BROWN, B. E.; STADLER, N.; DAVIES, M. J. Dityrosine, 3,4- dihydroxyphenylalanine (DOPA), and radical formation from tyrosine residues on milk proteins with globular and flexible structures as a result of riboflavin-mediated photo-oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 59, p. 7939-7947, 2011.

DALSGAARD, T. K.; OTZEN, D.; NIELSEN, J. H.; LARSEN, L. B. Changes in structures of milk proteins upon photo-oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 55, p. 10968-10976, 2007.

DAVIES, M. J. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 305, p. 761-770, 2003.

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- SP, 2010.

EINO, M.F. Lessons learned in commercialization of microfiltered milk. **Bulletin International Dairy Federation**, vol. 320, p. 32-36, 1997.

ELWELL, M.W.; BARBANO, D.M. Use of microfiltration to improve fluid milk quality. **Journal of Dairy Science**, 89, p.20-30, 2006.

FUKUNAGA, Y.; KATSURAGI, Y.; IZUMI, T.; SAKIYAMA, F. Fluorescence characteristics of kynurenine and N`-Formylkynurenine, their use as reporters of the environment of tryptophan 62 in hen egg-white lysozyme. **Journal of Biochemistry**, vol.92, p.129-141, 1982.

HENYON, D. K. Extended shelf-life milks in North America: a perspective. **International Journal of Dairy Technology**, vol. 52, p. 95-101, 1999.

HOFFMANN, W.; KIESNER, C.; CLAWINRÄDECKER, I.; MARTIN, D.; EINHOF, K.; LORENZEN, P. C.; MEISEL, H.; HAMMER, P.; SUHREN, G.; TEUFEL, P. Processing of extended shelf life milk using microfiltration. **International Journal of Dairy Technology**, vol. 59, p. 229- 235, n. 4, 2006.

HUANG, R.; CHOE, E.; MIN, D. B. Kinetics for singlet oxygen formation by riboflavin photosensitization and the reaction between riboflavin and singlet oxygen. **Journal of Food Science**, vol. 69, p.726-732, 2004.

INTAWIWAT, N.; PETERSEN, M. K.; RUKKE, E. O.; MEIER, M. A.; VOGT, G.; DAHL, A. V.; SKARET, J.; KELLER, D.; WOLD, J. P. Effect of different colored filters on photooxidation in pasteurized milk. **Journal of Dairy Science**, vol. 93, p. 1372-1382, 2010.

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**, Chicago, vol. 63, n. 03, p. 408-412, 1998.

KARATAPANIS, A. E.; BADEKA, A. V.; RIGANAKOS, K. A.; SAVVAIDIS, I. N.; KONTOMINAS, M. G. Changes in flavour volatiles of whole pasteurized milk as affected by packaging material and storage time. **International Dairy Journal**, Barking, vol. 16, p. 750-761, 2006.

KAROUI, R.; MOUAZEN, A. M.; DUFOUR, E.; SCHOONHEYDT, R.; BAERDEMAEKER, J. Utilisation of front-face fluorescence spectroscopy for the determination of some selected chemical parameters in soft cheeses. **Lait**, vol. 86, p. 155-169, 2006.

KERKAERT, B.; MESTDAGH, F.; CUCU, T.; SHRESTHA, K.; CAMP, J.V.; MEULENAER, B. D. The impact of photo-induced molecular changes of dairy proteins on their ACE-inhibitory peptides and activity. **Amino Acids**, vol. 43, p. 951-962, 2012.

KRISTO, E.; HAZIZAJ, A.; CORREDIG, M. Structural changes imposed on whey proteins by UV irradiation in a continuous UV light reactor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 60, p. 6204-6209, 2012.

LABORATÓRIO NACIONAL DE REFERÊNCIA ANIMAL (LANARA). Leite fluido. In: \_\_\_\_\_ . **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**: métodos físicos e químicos. Brasília, DF, 1981, v. II, cap.14, p. 16-17.

LARSEN, H.; TELLEFSEN, S. B. G.; DAHL, A. V. Quality of sour cream packaged in cups with different light barrier properties measured by fluorescence spectroscopy and sensory analysis. **Journal of Food Science**, vol. 74, n. 08, p. 345-350, 2009.

- LEE, K. H.; JUNG, M. Y.; KIM, S.Y. Effects of ascorbic acid on the light-induced riboflavin degradation and color changes in milks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 46, p. 407-410, 1998.
- LORENZEN, P. C.; CLAWIN-RADECKER, I.; EINHOFF, K.; HAMMER, P.; HARTMANN, R.; HOFFMANN, W.; MARTIN, D.; MOLKENTIN, J.; WALTE, H. G.; DEVRESE, M. A survey of the quality of extended shelf life (ESL) milk in relation to HTST and UHT milk. **International Journal of Dairy Technology**, vol. 64, n. 02, p. 166-178, 2011.
- MARSILI, R. T. Comparison of SPME and dynamic headspace method for the GC-MS analysis of light-induced lipid oxidation products in milk. **Journal of Chromatography Science**, vol. 37, p. 17-23, 1999.
- MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 4th ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 2007. 448 p.
- MESTDAGH, F.; KERKAERT, B.; CUCU, T.; DE MEULENAER, B. Interaction between whey proteins and lipids during light-induced oxidation. **Food Chemistry**, vol. 126, p. 1190-1197, 2011.
- MESTDAGH, F.; DE MEULENAER, B.; DE CLIPPELEER, J.; DEVLIEGHERE, F.; HUYGHEBAERT, A. Protective influence of several packaging materials on light oxidation of milk. **Journal of Dairy Science**, vol. 88, n. 2, p. 499-510, 2005.
- MICHAELI, A.; FEITELSEN, J. Reactivity of singlet oxygen toward large peptides. **Photochemistry Photobiology**, vol. 61, p. 255-260, 1995.
- MIN, D. B.; BOFF, J. M. Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, vol. 01, p. 58-72, 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**, vol. 55, p. 323-329, 2007.
- MORTENSEN, G.; BERTELSEN, G.; MORTENSEN, B. K.; STAPELFELDT, H. Light –induced changes in packaged cheeses- a review. **International Dairy Journal**, vol. 14, p. 85-102, 2004.
- MORTENSEN, G.; SORENSEN, J.; STAPELFELDT, H. Effect of modified atmosphere packaging and storage conditions on photooxidation of sliced Havarti cheese. **European Food Research and Technology**, vol. 216, p. 57-62, 2003.
- MORTENSEN, G.; SORENSEN, J.; STAPELFELDT, H. Light-induced oxidation in semihard cheeses. Evaluation of methods used to determine levels of oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 50, p. 4364-4370, 2002.

- PAFYLIAS, I.; CHERYAN, M.; MEHAIAB, M. A.; SAGLAM, N. Microfiltration of milk with ceramic membranes. **Food Research International**, vol. 29, n. 2, p. 141-146, 1996.
- PATHARE, P. B.; OPARA, U. L.; AL-SAID, F. A. Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: a review. **Food and Bioprocess Technology**, vol. 6, p.36-60, 2013.
- PETER, A.; NICULA, C.; MIHALY-COZMUTA, A.; MIHALY-COZMUTA, L.; INDREA, E. Chemical and sensory changes of different dairy products during storage in packages containing nanocrystallised TiO<sub>2</sub>. **International Journal of Food Science and Technology**, vol. 47, p. 1448-1456, 2012.
- RONSEIN, G. E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; DI MASCIO, P.; MARTINEZ, G. R. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, vol. 29, n. 03, p. 563-568, 2006.
- RYSSTAD, G.; KOLSTAD, J. Extended shelf life milk - advances in technology. **International Journal of Dairy Technology**, vol. 59, p. 85-96, 2006.
- SABOYA, L. V.; MAUBOIS, J. Current developments of microfiltration technology in the dairy industry. **Lait**, Les Ulis, vol. 80, p. 541-553, 2000.
- SANTOS, M. V.; OLIVEIRA, C. A. F.; LIMA, Y. V. R.; BOTARO, B. G. Remoção de células somáticas pela microfiltração não afeta a composição e a proteólise do leite. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.5, p.1486-1493, 2006.
- SATTAR, A.; DEMAN, J. M. Photooxidation of milk and milk products: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, nov., p.13-37, 1975.
- SCHEIDEGGER, D.; PECORA, R. P.; RADICI, P. M.; KIVATINITZ, S.C. Protein oxidative changes in whole and skim Milk after ultraviolet or fluorescent light exposure. **Journal of Dairy Science**, vol. 93, n. 11, p. 5101- 5109, 2010.
- SCHMIDT, V. S. J.; KAUFMANN, V.; KULOZIK, U.; SCHERER, S. WENNING, M. Microbial biodiversity, quality and shelf life of microfiltered and pasteurized extended shelf life (ESL) milk from Germany, Austria and Switzerland. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 154, p. 1-9, 2012.
- SKIBSTED, L. H. Light-induced changes in dairy products: Packaging of milk products. **Bulletin of The International Dairy Federation**, Brussels, n.346, p.4-9, 2000.
- SMET, K.; DE BLOCK, J.; DE CAMPENEERE, S.; DE BRABANDER, D.; HERMAN, L.; RAES, K.; DEWETTINCK, K.; COUDIJZER, K. Oxidative stability of UHT milk as influenced by fatty acid composition and packaging. **International Dairy Journal**, vol. 19, p. 372-379, 2009.
- STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF DAIRY PRODUCTS. **Alkaline Phosphatase Methods**, 16<sup>a</sup> edition, cap.14, 1992.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. 377p.

VAN AARDT, M.; DUNCAN, S. E.; MARCY, J. E.; LONG, T. E.; HACKNEY, C. R. Effectiveness of poly(ethylene terephthalate) and high-density polyethylene in protection of milk flavor. **Journal of Dairy Science**, Champaign, vol. 84, p. 1341-1347, 2001.

VAN AARDT, M.; DUNCAN, S. E.; MARCY, J. E.; LONG, T. E.; O'KEEFE, S. F.; NIELSEN-SIMS, S. R. Aroma analysis of light-exposed milk stored with and without natural and synthetic antioxidants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, vol. 88, n.03, p. 881-890, 2005a.

VAN AARDT, M.; DUNCAN, S. E.; MARCY, J. E.; LONG, T. E.; O'KEEFE, S. F.; NIELSEN-SIMS, S. R. Effect of antioxidant ( $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid) fortification on light-induced flavor of milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, vol. 88, n.03, p. 872-880, 2005b.

WEBSTER, J. B.; DUNCAN, S. E.; MARCY, J. E.; O'KEEFE, S.F. Controlling light oxidation flavor in milk by blocking riboflavina excitation wavelengths by interference. **Journal of Food Science**, vol. 74, n.09, p.390- 398, 2009.

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

ZANDOMENEGHI, M.; CARBONARO, L.; ZANDOMENEGHI, G. Biochemical Fluorometric Method for the Determination of Riboflavin in milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol.55, p. 5990-5994, 2007.

# ANEXO 1\_PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa](http://www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa)

CEP, 28/06/11  
(Grupo III)

**PARECER CEP:** Nº 471/2011 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).  
**CAAE:** 0401.0.146.000-11

## I - IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO:** "INFLUÊNCIA DA LUZ NA QUALIDADE E VIDA ÚTIL DO LEITE MICROFILTRADO PASTEURIZADO".

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Ana Carolina Borges de Urzedo

**INSTITUIÇÃO:** Centro Integrado de Educação e Reabilitação Romildo Pardini

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 02/06/2011

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 28/06/12 (O formulário encontra-se no *site* acima).

## II – OBJETIVOS.

1. Estudar o desempenho da membrana: fluxo de permeado, retenção de microrganismos, proteínas e células somáticas. 2. Determinar a vida de prateleira do leite microfiltrado pasteurizado sob ação da luz, acondicionado em diferentes tipos de embalagem. 3. Acompanhar durante a estocagem a foto-oxidação: degradação de riboflavina e oxidação de proteínas por análise sensorial.

## III – SUMÁRIO.

Neste projeto, leite cru será desnatado, microfiltrado, pasteurizado, envasado em garrafas de vidro e de polietileno de alta densidade e armazenado sob refrigeração, sem incidência de luz (controle) e com incidência de luz (500 e 1.100 lux). Ao final, através de metodologia específica, serão analisados o desempenho da membrana, reações de foto-oxidação, oxidação de proteínas e vida útil do leite. A vida de prateleira será avaliada através de análise sensorial, com participação de voluntários recrutados por meio de cartazes expostos na Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) e proximidades (serão voluntários que habitualmente ingerem leite evitando-se, desta maneira, intolerâncias alimentares). Os testes serão realizados em cabines individuais sob luz branca e as amostras serão avaliadas em relação à cor, aroma e sabor, numa escala não estruturada de 9 cm. Também será realizado um teste de aceitação com consumidores, que avaliarão parâmetros de aparência, sabor e impressão global, numa escala hedônica de 9 pontos e teste de intenção de compra (Tal teste, nomeado Anexo III no texto e sumário, não acompanhou o projeto).

## IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.

Projeto bem estruturado, com metodologia adequada, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está bem redigido e orçamento detalhado.

---

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br



#### V - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

#### VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e).

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

#### VII – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de junho de 2011.

**Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner**  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

## ANEXO 2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa:  
**Influência da luz na qualidade e vida de prateleira do leite microfiltrado pasteurizado**

A combinação do processo de microfiltração com a pasteurização pode reduzir até 99,8% da carga microbiana e esporos. Entretanto, o fim da vida de prateleira de um leite microfiltrado pasteurizado possivelmente será devido aos efeitos da foto-oxidação dos componentes do leite, o que afeta a qualidade sensorial do produto. Logo, o conhecimento de como a intensidade da luz afeta a qualidade do leite desnatado microfiltrado pasteurizado pode ajudar no desenvolvimento de medidas para estender a vida de prateleira do leite fluido. O objetivo do trabalho será o de verificar a influência da intensidade da luz na qualidade e vida de prateleira do leite microfiltrado pasteurizado. É muito improvável a ocorrência de qualquer desconforto ou riscos previsíveis para você que irá participar da pesquisa. Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para se recusar a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. Sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade. Os pesquisadores irão tratar sua identidade com padrões profissionais de sigilo. A participação no estudo não acarretará custos e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

Eu,....., declaro que li as informações contidas neste documento, fui devidamente informado(a) pela pesquisadora dos procedimentos que serão utilizados, riscos e desconfortos, benefícios, custo/reembolso dos participantes, confidencialidade da pesquisa. Concordo ainda em participar da pesquisa. Foi garantido que posso retirar o consentimento a qualquer momento, sem que isso leve a qualquer penalidade. Declaro também que recebi uma cópia deste documento e que tive oportunidade de ler e esclarecer minhas dúvidas.

\_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

Assinatura do Participante

Data: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura da Pesquisadora

Data: \_\_\_\_\_

**Contatos:** *Pesquisadora:* Ana Carolina Borges de Urzedo (ana@fea.unicamp.br)

**Comitê de Ética:** Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 - Caixa Postal 6111 13083-887  
Campinas – SP

Fone (019) 3521-8936 / Fax (019) 3521-7187 / e-mail: cep@fcm.unicamp.br

**ANEXO 3 \_FICHA DO TESTE TRIANGULAR.**

**TESTE TRIANGULAR**

Julgador: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_\_\_

Em cada grupo de amostras apresentadas, duas são iguais e uma é diferente. Deguste cuidadosamente cada uma das amostras, da esquerda para a direita e coloque o código da amostra diferente.

GRUPO	Código da amostra
I	
II	
III	

Comentários:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**TESTE TRIANGULAR**

Julgador: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_\_\_

Em cada grupo de amostras apresentadas, duas são iguais e uma é diferente. Deguste cuidadosamente cada uma das amostras, da esquerda para a direita e coloque o código da amostra diferente.

GRUPO	Código da amostra
IV	
V	
VI	

Comentários:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**ANEXO 4 FICHA DE AVALIAÇÃO DE VIDA DE PRATELEIRA DE LEITE PASTEURIZADO POR ASSESSORES TREINADOS.**

Ficha de Avaliação da vida de prateleira de leite desnatado microfiltrado pasteurizado sem ou com armazenamento sob luz.

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Você está recebendo 4 amostras codificadas de leite desnatado pasteurizado. Por favor, prove as amostras da esquerda para a direita avaliando em cada amostra a intensidade dos atributos a seguir. Marque em cada escala o código referente a cada amostra.

**Cor Característica de leite desnatado**

Não Característica \_\_\_\_\_ Característica

**Cor Característica de leite desnatado oxidado**

Nenhum \_\_\_\_\_ Forte

**Aroma Característico de Leite Desnatado**

Não Característico \_\_\_\_\_ Característico

**Aroma de Leite Desnatado Oxidado**

Nenhum \_\_\_\_\_ Forte

**Sabor Característico de Leite Desnatado**

Não Característico \_\_\_\_\_ Característico

**Sabor de Leite Desnatado Oxidado**

Nenhum \_\_\_\_\_ Forte

Comentários: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

ANEXO 5\_ FICHA DE REFERÊNCIAS

Atributos	Definição	Referências	
<b>APARÊNCIA</b>			
<b>Cor Característica de leite desnatado</b>	Cor branca esverdeada característica de leite desnatado	NÃO CARACTERÍSTICA: 25 mL de leite pasteurizado tipo A <i>Xandô</i> diluído com água (1:2)	CARACTERÍSTICA: 25 mL de leite pasteurizado tipo A <i>Xandô</i>
<b>Cor Característica de leite desnatado oxidado pela luz</b>	Refere-se à cor característica do leite desnatado oxidado pela luz, variando de branco acinzentado a branco rosado	NENHUM: 25 mL de leite pasteurizado tipo A <i>Xandô</i>	FORTE: 25 mL de leite pasteurizado tipo A <i>Xandô</i> oxidado pela luz (1300 Lux) por 8 dias
<b>AROMA</b>			
<b>Aroma de leite desnatado</b>	Refere-se ao aroma característico de leite desnatado pasteurizado	NÃO CARACTERÍSTICO: 25 mL de leite pasteurizado tipo A <i>Xandô</i> diluído com água (1:2)	CARACTERÍSTICO: 25 mL de leite pasteurizado tipo A <i>Xandô</i>
<b>Aroma de leite desnatado oxidado</b>	Refere-se ao aroma característico de leite desnatado pasteurizado oxidado pela luz	NENHUM: 25 mL de leite pasteurizado tipo A <i>Xandô</i>	FORTE: 25 mL de leite pasteurizado tipo A <i>Xandô</i> oxidado pela luz (1300 Lux) por 8 dias
<b>SABOR</b>			
<b>Leite Desnatado</b>	Refere-se ao sabor característico do leite desnatado pasteurizado tipo A	NÃO CARACTERÍSTICO: 25 mL de leite pasteurizado tipo A <i>Xandô</i> diluído com água (1:2)	CARACTERÍSTICO: 25 mL de leite pasteurizado tipo A <i>Xandô</i>
<b>Leite Desnatado oxidado</b>	Refere-se ao sabor característico do leite desnatado pasteurizado tipo A oxidado pela luz (1300 Lux) por 8 dias	NENHUM: 25 mL de leite pasteurizado tipo A <i>Xandô</i>	FORTE: 25 mL de leite pasteurizado tipo A <i>Xandô</i> oxidado pela luz (1300 Lux) por 8 dias

**ANEXO 6\_ CARTAZ A SER AFIXADO E E-MAIL PARA RECRUTAMENTO DE ASSESSORES.**

**ANÁLISE SENSORIAL DE LEITE DESNATADO**

Dia: dd/mm  
Horário: 09:00h às 13:00h

Dia: dd/mm  
Horário: 14:30h às 16:00h

Local: Laboratório de Análise Sensorial  
Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA)  
Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA)

**VENHA PARTICIPAR!!**

Aviso a ser enviado por e-mail à comunidade da Unicamp, para recrutamento de assessores

Nos dias 09 e 10 / 09 (segunda e terça) haverá avaliação sensorial de leite desnatado

Local: Laboratório de Análise Sensorial do DTA/FEA

Horário: 9:00 às 16:00h

Participem!

## ANEXO 7\_FICHA DE ACEITABILIDADE

### AVALIAÇÃO SENSORIAL DE LEITE DESNATADO

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Você está recebendo uma amostra de LEITE DESNATADO PASTEURIZADO. Por favor, prove a amostra e avalie o quanto você gostou ou desgostou da amostra em relação à **aparência, aroma, sabor e impressão global** utilizando a escala abaixo:

- (1) Desgostei extremamente
- (2) Desgostei muito
- (3) Desgostei moderadamente
- (4) Desgostei ligeiramente
- (5) Não gostei nem desgostei
- (6) Gostei ligeiramente
- (7) Gostei moderadamente
- (8) Gostei muito
- (9) Gostei extremamente

Amostra	Aparência (cor)	Aroma	Sabor	Impressão Global
	Nota	Nota	Nota	Nota

Indique se você compraria ou não a amostra

1. Certamente compraria
2. Provavelmente compraria
3. Talvez compraria / Talvez não compraria
4. Provavelmente não compraria
5. Certamente não compraria

Amostra	Nota

Comentários: \_\_\_\_\_