

MICHELE DA SILVA PINTO

**EFEITO DE EMBALAGENS FLEXÍVEIS NA QUALIDADE DE LEITE  
PASTEURIZADO E NA SUA ACEITABILIDADE**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos,  
para obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P659e  
2009

Pinto, Michele da Silva, 1984-  
Efeito de embalagens flexíveis na qualidade de leite  
pasteurizado e na sua aceitabilidade / Michele da Silva Pinto  
– Viçosa, MG, 2009.  
xx, 69f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Antonio Fernandes de Carvalho.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 64-67

1. Leite – Embalagens. 2. Leite – Qualidade. 3. Leite –  
Armazenamento. I. Universidade Federal de Viçosa.  
II. Título.

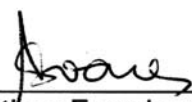
CDD 22.ed. 637.1


MICHELE DA SILVA PINTO


**EFEITO DE EMBALAGENS FLEXÍVEIS NA QUALIDADE DE LEITE  
PASTEURIZADO E NA SUA ACEITABILIDADE**


Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos,  
para obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

APROVADA: 14 de fevereiro de 2009.

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Nilda de Fátima Ferreira Soares  
(Coorientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Valéria Paula Rodrigues Minim

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Helena Maria Pinheiro Sant'Ana

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Nélio José de Andrade

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Antônio Fernandes de Carvalho  
(Orientador)

*É graça divina começar bem.  
Graça maior persistir na caminhada certa.  
Mas graça das graças é não desistir nunca.  
(D. Helder Câmara)*

*A experiência dos erros é tão importante quanto a experiência dos acertos.  
Porque vistos de um jeito certo os erros, eles nos preparam  
para nossas vitórias e conquistas futuras.  
(Pe. Fábio de Melo)*

*Buscai em primeiro lugar o Reino de Deus e sua justiça  
e todas estas coisas vos serão dadas em acréscimo.  
Não vos preocupeis, pois, com o dia de amanhã.  
A cada dia basta seu cuidado.  
(Jesus Cristo)*

*Com enorme gratidão e carinho à minha família que amo:*

*Meus pais Adalcio e Besse*

*Meu irmão Michel*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

Aos professores e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pelo auxílio na realização dos trabalhos.

Aos funcionários do Laticínio Sérvulo, pela acolhida.

A todos que gastaram um pouco do seu tempo para provarem o leite e àqueles que de alguma me forma auxiliaram na conclusão deste trabalho.

Às meninas do Laboratório de Vitaminas, pelos ensinamentos e pelo companheirismo.

Aos meus amigos do Laboratório de Embalagens, pela atenção, disponibilidade e confiança.

Ao Cleuber, pelos conselhos e pelo companheirismo.

Aos Professores Sebastião Brandão, Helena Sant'ana, José Ivo, Nélio de Andrade, Valéria Minim, pelas sugestões tão importantes.

Aos que serviram de modelo para eu estar aqui: Renatinho, Robson, Miriam, Nathália e Alba.

Aos meus eternos amigos e irmãos da Capela, da RCC, do MUR e, claro, do GOU Cenáculo, obrigada pela compressão, pelas orações e pela convivência fraterna.

Aos meus amigos do Laboratório de Pesquisa de Leite e Derivados: Guilherme, Naamam, Júlia, Geruza, Rosângela, Gabriel e Ramon, Fernanda, Filipe, pela cumplicidade, amizade e disponibilidade em todos os lugares e ocasiões.

À Jéssica Yoko Suda e ao Arlan Caldas, pelo companheirismo. Sem vocês nada teria dado certo.

À Professora Nilda de Fátima Ferreira Soares, não apenas pela participação e sugestões, mas pelo apoio e dedicação constantes.

Ao Professor Antônio Fernandes de Carvalho, não somente por orientar meus passos acadêmicos, mas pelo zelo, pela amizade, pelo companheirismo, apoio e pelas demais características de pai que dispensou a mim.

À Gerda, pelo apoio e pelos ensinamentos. Merci, madame!

À Silvinha, minha irmã de coração, pela torcida sempre.

Aos meus familiares, por não terem medido esforços e carinho para que eu chegasse até aqui.

E, é claro, ao Bom Deus, que tem cuidado de mim... “Porque Dele e por Ele, para Ele são todas as coisas”. Amém.



## **BIOGRAFIA**

MICHELE DA SILVA PINTO, filha de José Adelcio Pinto e Besse Águida Francisco da Silva, nasceu em Sete Lagoas, Minas Gerais, em 8 de janeiro de 1984.

Em maio de 2002, iniciou o Curso de Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa (UFV), graduando-se em março de 2007.

Nesse mesmo mês e ano, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFV, submetendo-se à defesa da dissertação em fevereiro de 2009.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
RESUMO .....	xv
ABSTRACT .....	xviii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Embalagens de Leite .....	4
2.2. Leite de Consumo .....	7
2.3. Qualidade de Leite de Consumo.....	10
2.4. Vida de Prateleira de Leite de Consumo .....	13
2.5. Embalagens Multicamadas .....	16
2.6. Ferramentas para Caracterização de Embalagens.....	18
3. OBJETIVOS.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. Caracterização dos filmes.....	23
4.1.1. Transmissão de luz .....	23
4.1.2. Teste de Permeabilidade ao Oxigênio .....	23
4.1.3. Análise Mecânica dos Filmes.....	24
4.1.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	24

	Página
4.1.5. Microscopia de Varredura por Sonda (MVS) .....	25
4.1.6. Estudo da Hidrofobicidade dos Filmes.....	25
4.2. Aplicação das embalagens em leite pasteurizado .....	26
4.2.1. Testes microbiológicos.....	26
4.2.1.1. Contagem-padrão em placas.....	27
4.2.1.2. Contagem de microrganismos psicotróficos .....	27
4.2.1.3. Coliformes totais – Método do número mais provável – NMP.....	27
4.2.1.4. Coliformes termotolerantes .....	28
4.2.1.5. Salmonella .....	28
4.2.1.6. Sedimentação de microrganismos do ar em meio sólido .....	29
4.2.2. Análises físico-químicas.....	29
4.2.2.1. pH .....	30
4.2.2.2. Acidez .....	30
4.2.2.3. Extrato seco .....	30
4.2.2.4. Teor de gordura .....	31
4.2.2.5. Teor de lactose .....	31
4.2.2.6. Densidade .....	33
4.2.2.7. Crioscopia .....	33
4.2.2.8. Teor de proteínas.....	33
4.2.2.9. Determinação do teor de riboflavina .....	34
4.2.2.9.1. Curva-Padrão.....	35
4.2.2.9.2. Análise de Riboflavina .....	36
4.2.2.10. Oxidação de lipídios.....	38
4.3. Análise sensorial.....	39
5. DELINEAMENTO ESTATÍSTICO .....	41
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
6.1. Transmissão de luz.....	43
6.2. Teste de permeabilidade ao oxigênio .....	44
6.3. Análise mecânica dos filmes.....	45
6.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	46

	Página
6.5. Microscopia eletrônica de força atômica .....	46
6.6. Estudo da hidrofobicidade dos filmes .....	50
6.7. Qualidade inicial do leite .....	51
6.8. Testes ao longo da vida de prateleira .....	53
6.8.1. Testes microbiológicos.....	53
6.8.2. Análises físico-químicas – pH e Acidez.....	55
6.8.3. Análises físico-químicas – Oxidação de lipídios e degradação de vitamina (riboflavina) .....	57
6.9. Análise sensorial.....	59
7. CONCLUSÃO .....	62
8. REFERÊNCIAS .....	64

## LISTA DE TABELAS

	Página
1. Requisitos físico-químicos e microbiológicos de qualidade de leite pasteurizado, fixados pela legislação brasileira .....	13
2. Procedimentos para realização e cálculos do teste de dosagem enzimática em UV a 340 nm, para análise do teor de lactose em leite .....	32
3. Transmitância percentual em quatro embalagens na faixa de comprimento de onda de 250 a 780 nm: Polietileno (PE) SCLAIRFILM – 90E0323W7 (1); PE SCLAIRFILM – 90B0324PW (2); PE SCLAIRFILM – 80E0337W7 (3); e PE monocamada (4)...	44
4. Taxa de permeabilidade ao oxigênio (TPO) das embalagens: Polietileno (PE) SCLAIRFILM – 90E0323W7; PE SCLAIRFILM – 90B0324PW (2); PE SCLAIRFILM – 80E0337W7 (3); e PE monocamada (4).....	44
5. Propriedades de tração e elasticidade das embalagens: Polietileno (PE) SCLAIRFILM – 90E0323W7; PE SCLAIRFILM – 90B0324PW (2); PE SCLAIRFILM – 80E0337W7 (3); e PE monocamada (4).....	46
6. Rugosidade média (Ra), média da raiz quadrada das rugosidades (Rq) e média dos pontos mais irregulares (Rz) dos filmes 1 (Polietileno (PE) SCLAIRFILM – 90E0323W7), 2 (PE SCLAIRFILM – 90B0324PW), 3 (PE SCLAIRFILM – 80E0337W7) e 4 (PE monocamada), obtidas por microscopia de varredura por sonda .....	50

	Página
7. Valores dos ângulos de contato ( $\theta$ ) da superfície das embalagens 1 (Polietileno (PE) SCLAIRFILM – 90E0323W7), 2 (PE SCLAIRFILM – 90B0324PW), 3 (PE SCLAIRFILM – 80E0337W7) e 4 (PE monocamada) com líquidos padrões e da energia livre global de interação ( $\Delta G_{sas}^{TOT}$ ) .....	51
8. Características dos filmes utilizados neste experimento.....	51
9. Características físico-químicas e microbiológicas do leite utilizado no experimento, antes e logo depois da pasteurização.....	52

## LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Espectro de absorção da riboflavina .....	16
2. Curva característica da relação resistência à tração <i>versus</i> deformação.....	19
3. Correlação linear entre a concentração de riboflavina e a área dos picos correspondentes.....	36
4. Ficha do teste de aceitação utilizada na avaliação do sabor, aroma e impressão global de leite, com o auxílio de uma escala hedônica de nove pontos.....	40
5. Imagens por microscopia eletrônica de varredura de cortes transversais de quatro embalagens multicamadas: (A) Polietileno (PE) SCLAIRFILM – 90E0323W; (B) PE SCLAIRFILM – 90B0324PW; (C) PE SCLAIRFILM – 80E0337W7; e (D) PE monocamada.....	47
6. Fotomicrografia tridimensional da superfície (100 x 100 $\mu\text{m}^2$ ) dos filmes 1 (Polietileno (PE) SCLAIRFILM – 90E0323W7) e 2 (PE SCLAIRFILM – 90B0324PW) .....	48
7. Fotomicrografia tridimensional da superfície (100 x 100 $\mu\text{m}^2$ ) dos filmes 3 (PE SCLAIRFILM – 80E0337W7) e 4 (PE monocamada).....	49

8. Estimativa da contagem de mesófilos aeróbios estritos e facultativos ( $\log \text{UFC.mL}^{-1}$ ) em leite pasteurizado e estocado a 5 °C. Valores obtidos pela média da contagem por embalagem nas três repetições realizadas (R1, R2 e R3) .....	54
9. Estimativa da contagem de psicrotóxicos ( $\log \text{UFC.mL}^{-1}$ ) em leite pasteurizado e estocado a 5 °C. Valores obtidos pela média da contagem por embalagem nas três repetições realizadas (R1, R2 e R3) .....	55
10. Estimativa da acidez ( $\text{g ácido láctico.100 mL}^{-1}$ ) em leite pasteurizado e estocado a 5 °C. Valores obtidos pela média da acidez do leite por embalagem nas três repetições realizadas (R1, R2 e R3) .....	56
11. Estimativa de pH do leite pasteurizado e estocado a 5 °C. Valores obtidos pela média de pH do leite por embalagem nas três repetições realizadas (R1, R2 e R3).....	56
12. Análise por CLAE de riboflavina em leite pasteurizado. Cromatogramas obtidos no modo isocrático de solução-padrão (a) e de uma amostra de leite (b). Coluna Merck Lichrospher 100 RP-18 5 $\mu\text{m}$ , 250 x 4.00 mm; fluxo 1 $\text{mL.min}^{-1}$ ; volume de injeção de 50 $\mu\text{L}$ . Fase móvel: 5 mM sal heptanossulfônico, 0,5% trietilamina, 2,4% ácido acético glacial e 15% de metanol. Detector de arranjo de diodos e leitura dos cromatogramas a 373 nm.....	57
13. Médias dos escores de aceitação dos provadores de leite pasteurizado, ao longo de sua vida de prateleira. (A) Impressão Global; (B) Sabor; e (C) Aroma. As barras de erros representam o desvio-padrão .....	60
14. Mapa de Preferência Interno dos atributos aroma, sabor e impressão global para leite envasado em quatro embalagens e armazenado durante 1 dia e 13 dias: Gráficos A (Aroma - 1 dia de armazenamento), B (Aroma - 13 dias de armazenamento), C (Sabor - 1 dia de armazenamento), D (Sabor - 13 dia de armazenamento), E (Impressão Global - 1 dia de armazenamento) e F (Impressão Global - 13 dias de armazenamento).....	61



## RESUMO

PINTO, Michele da Silva, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Efeito de embalagens flexíveis na qualidade de leite pasteurizado e na sua aceitabilidade.** Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho. Coorientadores: Nilda de Fátima Ferreira Soares e José Ivo Ribeiro Junior.

Este trabalho teve como objetivos avaliar quatro embalagens flexíveis para aplicação em leite pasteurizado e verificar sua influência na vida de prateleira desse produto. Primeiramente, avaliaram-se os filmes quanto à permeabilidade ao oxigênio, transmissão de luz, elasticidade e tração. Verificou-se, ainda, o número de camadas de cada embalagem, a rugosidade e a hidrofobicidade da superfície em contato com o alimento. Foram avaliadas três embalagens de polietileno (Dupont Pouch) multicamadas: (1) polietileno (PE), multicamada (SCLAIRFILM – 80E0337W7); (2) PE multicamada (SCLAIRFILM – 90B0324PW) e (3) PE multicamada SCLAIRFILM – 90E0323W7. Utilizou-se, como controle, uma embalagem de PE monocamada (4), empregada comercialmente para leite fluido pasteurizado. Fundamentado nas propriedades mecânicas, na permeabilidade ao oxigênio e barreiras à luz das embalagens, a embalagem 1 apresentou alta barreira ao oxigênio e à luz, sendo rígida e resistente a tração; já a embalagem 2 mostrou alta barreira ao oxigênio, alta resistência à tração e muita rigidez, porém foi baixa a barreira à luz. A embalagem 3 foi

muito permeável ao oxigênio e proporcionou alta barreira à luz, baixa resistência a tração e baixa rigidez. Por fim, a embalagem 4 apresentou baixa barreira ao oxigênio, permitiu a passagem da luz e mostrou baixa resistência a tração e baixa rigidez. As técnicas de microscopia foram ferramentas úteis na caracterização inicial das embalagens, em relação ao número de camadas e perfil das superfícies, como rugosidade e hidrofobicidade, de maneira que os filmes 1, 2 e 3 tiveram superfícies com menores valores de rugosidade. Para avaliar a influência de cada embalagem na vida de prateleira do leite pasteurizado, este foi acondicionado, em volumes de 1.000 mL, nas quatro embalagens e estocado a 5 °C, por 21 dias. Quanto aos aspectos microbiológicos, realizaram-se contagem padrão em placas e a contagem de microrganismos psicotróficos a cada três dias de armazenamento, e as análises de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Salmonella* sp. foram realizadas apenas no dia da embalagem do leite. Quanto aos aspectos físico-químicos, realizou-se no tempo zero a análise do teor de proteínas, extrato seco, teor de gordura e lactose, densidade e crioscopia para o leite cru e o leite pasteurizado. Para determinar a vida de prateleira, realizaram-se, a cada três dias, análises de pH e acidez no leite de todas as embalagens. Com relação à qualidade nutricional, avaliou-se a degradação de vitaminas por cromatografia líquida de alta eficiência e oxidação de lipídeos, pelo método de TBA a cada cinco dias de armazenamento. Por fim, avaliou-se a aceitação dos consumidores pelo leite acondicionado em cada uma das embalagens, por meio dos atributos sabor, aroma e impressão global, com o auxílio de uma escala hedônica de nove pontos. A qualidade microbiológica da matéria-prima, tanto do leite cru quanto logo após a pasteurização, estava em conformidade com os padrões da legislação brasileira. As embalagens não afetaram ( $P > 0,05$ ) a contagem de mesófilos e psicotróficos do leite durante sua estocagem. O fim da vida de prateleira, com relação à contagem de mesófilos, se deu aos 12 dias, em todas as embalagens. Com relação à contagem de psicotróficos, o término da vida de prateleira foi aos 18 dias de armazenamento, independentemente da embalagem utilizada. Quanto aos aspectos físico-químicos, a matéria-prima foi considerada de boa qualidade, não havendo indícios de adulterações.

Todos os resultados estavam dentro do limite estabelecido pela legislação nacional, tanto para o leite cru quanto para o leite logo após a pasteurização. Ao longo da vida de prateleira, o pH e a acidez do leite não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre as embalagens, havendo variação apenas com o tempo. A legislação brasileira determina o limite máximo de acidez igual a 0,18%, para que o leite seja considerado de qualidade, o que foi atingido apenas depois de 18 dias de armazenamento. As barreiras oferecidas pelas embalagens tiveram efeitos semelhantes na oxidação lipídica e no teor de riboflavina do leite pasteurizado e armazenado a 5 °C, por 21 dias. A média de oxidação lipídica encontrada em unidades de densidade ótica a 532 nm foi 0,055 e o teor médio de riboflavina no leite, cerca de 1,37 mg.L<sup>-1</sup>. Na avaliação da aceitabilidade, também não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na aceitação do leite com o passar do tempo nas diferentes embalagens, quanto aos atributos aroma, sabor e impressão global, sendo a média das notas dos provadores para as amostras ao longo do tempo igual a 6,3, que está situado entre os termos hedônicos “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”. As barreiras oferecidas pelas embalagens tiveram efeitos semelhantes nas características do leite pasteurizado armazenado a 5 °C, por 21 dias, pois ao longo desse tempo não diferiram entre si.

## ABSTRACT

PINTO, Michele da Silva, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2009. **Effect of flexible packaging on the quality of pasteurized milk and its acceptability.** Adviser: Antônio Fernandes de Carvalho. Co-Advisers: Nilda de Fátima Ferreira Soares and José Ivo Ribeiro Junior.

This study aimed to evaluate four flexible packagings for pasteurized milk, as well as to evaluate their effects on shelf life of this product. First, films were tested for permeability to oxygen, light transmission, elasticity and traction. The layer number of each packaging and the hydrophobicity and roughness of the surface in contact with the product were also examined. Three multilayer polyethylene packages (Dupont Pouch) were tested: (1) multilayer polyethylene (PE) (SCLAIRFILM - 80E0337W7), (2) multilayer PE (SCLAIRFILM - 90B0324PW) and (3) multilayer PE SCLAIRFILM - 90E0323W7. A monolayer PE packaging (4) commercially used for pasteurized fluid milk was used as control. Based on the mechanical properties, the permeability to oxygen and light barriers, the packaging 1 provided high barrier to oxygen and light, supplying rigidity and resistance to traction, whereas the packaging 2 provided high barrier to oxygen, high tensile strength and high rigidity, but showed low barrier to light. The packaging 3 was very permeable to oxygen and provided high light barrier, low tensile strength and low rigidity. Finally, the package 4 showed low

barrier to oxygen, allowed the passage of light, and showed low tensile strength and low rigidity. Microscopy techniques were useful tools for the initial characterization of packagings regarding the layer number and the surface profile such as roughness and hydrophobicity, so that, films 1, 2 and 3 had surfaces with lower roughness values . To assess the influence of each packaging on the shelf life of pasteurized milk, 1000 mL milk samples were packaged into the four packagings and stored at 5 °C for 21 days. Microbiological analysis were carried out by standard plate counts and enumeration of psychrotrophic microorganisms every 3 days of storage, as well as determination of total coliforms, thermotolerant coliforms and *Salmonella* sp. was performed only on the day of milk packaging. Physical-chemical analyses were performed at time zero, including protein content, dry extract, lactose and fat content, and density and cryoscopy for raw and pasteurized milk. To determine the shelf-life, analyses of pH and acidity for milk of all packages were carried out every 3 days. Nutritional quality was assessed through the vitamin degradation by high performance liquid chromatography and lipid oxidation by the TBA method every 5 days of storage. Finally, consumer acceptance of milk in each of the packagings was tested using the attributes taste, aroma and overall impression with a hedonic scale of nine points. The microbiological quality of the raw material, for both raw milk and shortly after pasteurization, was found to meet the standards of the Brazilian legislation. Packaging did not affect ( $P > 0.05$ ) mesophilic and psychrotrophic counts during storage. The end of shelf life, with respect to mesophilic count occurred at 12 days for all packagings. With respect to psychrotrophic count, the end of shelf life was at 18 days of storage regardless the packaging used. Regarding physical-chemical characteristics, the raw material was considered of good quality, with no evidence of tampering. All results were within the standards established by legislation for both raw milk and milk shortly after pasteurization. During shelf life, milk pH and acidity were not different ( $P > 0.05$ ) among packagings, with variation occurring only with time. The Brazilian legislation determines a maximum acidity of 0.18% for milk to be considered as good quality, which was reached only after 18 days of storage. Barriers provided by the packagings had similar effects on lipid oxidation and riboflavin content of milk pasteurized

and stored at 5 °C for 21 days. Mean lipid oxidation found in units of optical density at 532 nm was 0.055 and the average riboflavin content was about 1.37 mg.L<sup>-1</sup>. There was also no difference ( $P > 0.05$ ) for acceptability over time among the different packagings for the attributes aroma, flavor and overall impression, with the average scores by the assessors for the samples over the time was 6, lying between the hedonic terms “like slightly” and “like moderately”. Barriers provided by the packagings had similar effects on the characteristics of pasteurized milk stored at 5 °C for 21 days, since during this time no differences were detected between the procedures.

## 1. INTRODUÇÃO

O leite é um fluido biológico produzido por glândulas mamárias de mais de 4.500 espécies de mamíferos fêmeas, com a finalidade de nutrir a prole, e normalmente é a única fonte de alimentação do jovem mamífero. É um alimento completo que contém lipídeos, proteínas, carboidratos, minerais, vitaminas, enzimas e aproximadamente 100.000 diferentes espécies moleculares em vários estados de dispersão. É um alimento perecível, o que demanda algum tratamento para que possa ser comercializado, e seu acondicionamento requer atenção especial.

A qualidade da maioria dos alimentos e bebidas diminui com a estocagem, existindo um tempo finito antes que o produto se torne inaceitável. Esse tempo entre a produção e a inaceitabilidade é conhecido como vida de prateleira, ou seja, o tempo que o alimento pode manter-se na prateleira do varejista ou do consumidor antes de se tornar inaceitável. Alguns fatores controlam a vida de prateleira – as características do produto, o ambiente a que é exposto e as propriedades de embalagem.

A vida de prateleira do leite pasteurizado pode ser determinada por fatores microbiológicos, físico-químicos, sensoriais ou nutricionais. O leite pasteurizado tem vida de prateleira curta variando entre três e cinco dias, pois sua rica composição, que inclui açúcar, proteínas, gorduras, sais minerais e vitaminas, torna-o um meio de cultura ideal para o crescimento e deterioração bacteriana, e durante a estocagem essas biomoléculas são

expostas a oxidação, reduzindo a qualidade nutricional e sensorial do leite. Além disso, a temperatura de refrigeração imprópria e os sistemas de embalagem inadequados a que é submetido o leite pasteurizado favorecem ainda mais a redução da vida de prateleira do produto.

Tendências na atual consolidação dos negócios em laticínios são resultantes do aumento da cadeia de distribuição, e o leite tem sido produzido e processado longe dos centros de consumo. Isso tem exigido aumento da vida de prateleira dos produtos lácteos para que se mantenham frescos e com aceitabilidade pelos consumidores. Dessa forma, são crescentes as pesquisas envolvendo tecnologias, como emprego de embalagens multicamadas, que aumentem o tempo de aceitabilidade desse produto tão importante na nutrição humana.

O tipo de material de embalagem usado para acondicionar leite pasteurizado pode afetar substancialmente as suas características de qualidade, seja por controlar diretamente a quantidade de oxigênio e luz que entra em contato com o alimento ou por providenciar perfeito isolamento de maneira a evitar contaminação pós-processamento por microrganismos. A embalagem de polietileno de baixa densidade (PEBD) foi introduzida no Brasil, na década de 1970, para acondicionamento de leite, sendo nessa época considerado inovação, em relação às garrafas de vidro tradicionalmente utilizadas.

Para aplicações em embalagens de alimentos, os polímeros devem ter boas propriedades de barreira para que se obtenha longa vida de prateleira para o produto. Entretanto, se apenas um polímero é utilizado na composição de um filme de embalagem, é muito difícil obter todas as propriedades requeridas para a conservação do produto. Nesse caso, uma opção é utilizar os filmes multicamadas, que são comumente utilizados em embalagens de produtos alimentícios, em função de propriedades como resistência mecânica, barreira ao oxigênio e, ou, à água, barreira à luz, fácil processabilidade e flexibilidade, aliadas a um custo compatível.

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar as características de três embalagens multicamadas e uma monocamada, de maneira a verificar se elas são passíveis de aplicação em leite pasteurizado e avaliar a estabilidade microbiológica, físico-química, nutricional e sensorial durante a



vida de prateleira de leite pasteurizado acondicionado em cada uma delas. E, assim, verificar se elas podem proporcionar ao leite pasteurizado alta qualidade e segurança alimentar por um período de tempo maior que cinco dias, após o processamento.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Embalagens de Leite**

Embalagem é a arte, ciência e tecnologia do acondicionamento de produtos para o mercado e venda. É um meio de garantir a entrega, de determinado produto, até o consumidor final em boas condições (SOARES; MELO, 2007).

Conter o alimento é a função básica da embalagem. Todos os produtos devem ser embalados antes de serem transportados de um lugar para outro. Além disso, a embalagem é uma técnica para proteger, identificar e facilitar a venda e distribuição de produtos agrícolas, industrializados e outros (ROBERTSON, 1993). O produto precisa ser protegido contra danos físicos e mecânicos durante a movimentação, transporte e distribuição até chegar ao consumidor. No entanto, os produtos, especialmente alimentos e bebidas, precisam ser protegidos contra a ação de fatores ambientais: gases, luz, vapor de água e odores. Assim, a embalagem deve constituir-se numa barreira que impeça ou dificulte o contato entre o ambiente externo e o produto em seu interior (BARCELOS; LIMA, 2006).

Os principais fatores que devem ser controlados para prolongar a vida útil de um alimento são: temperatura, umidade e oxigênio. O ambiente natural ou o interior da embalagem podem ser deletérios, considerando-se longos períodos de estocagem. Assim, a embalagem tem que agir como

barreira entre o ambiente externo e o alimento, sem afetá-lo. O controle de temperatura é importante, uma vez que seu aumento está diretamente relacionado com o aumento da velocidade das reações de deterioração. A elevada concentração de oxigênio em contato com o alimento está relacionada com reações de oxidação (lipídios, vitaminas e pigmentos), além de favorecer o crescimento de microrganismos aeróbios (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

O conhecimento da embalagem e do ambiente onde ela será empregada levará a sua otimização, permitindo obter a relação real, custo-efetividade, da embalagem (ROBERTSON, 1993). A utilização de sistemas de acondicionamento e embalagens adequados acarreta, além do aspecto comercial, outro benefício, que é o aumento da vida de prateleira dos produtos (MERGEN, 2004).

O tipo de embalagem para leite pasteurizado pode afetar substancialmente as suas características de qualidade, seja por controlar diretamente a quantidade de oxigênio e luz que entra em contato com o alimento ou por providenciar perfeito isolamento de maneira a evitar contaminação pós-processamento por microrganismos (VASSILA et al., 2002). Outros fatores que devem ser levados em conta na escolha do material de embalagem de leite são as características de processamento do material e suas propriedades mecânicas e funcionais, bem como aspectos ecológicos. Os riscos a que esse alimento está exposto, especialmente durante a distribuição ao consumidor, têm que ser cuidadosamente avaliados para evitar subestimação da proteção requerida (BOSSET et al., 1994).

A embalagem de polietileno de baixa densidade (PEBD) foi introduzida no Brasil, na década de 1970, para acondicionamento de leite, sendo nessa época considerado uma inovação, em relação às garrafas de vidro tradicionalmente utilizadas (ALVES et al., 1994).

O PEBD é um homopolímero, ou seja, é um polímero cujas unidades moleculares fundamentais (meros) são da mesma natureza, derivado do gás etileno. Trata-se do termoplástico mais comum e de maior consumo em todo o mundo. O PEBD é um polímero parcialmente cristalino (50 – 60 %), cuja temperatura de fusão está na faixa de 110 a 115 °C. O polietileno contém

cadeias ramificadas, e essas ramificações são, na maioria das vezes, tão longas quanto a cadeia principal do polímero. A presença dessas ramificações determina o grau de cristalização e as temperaturas de transição, além de afetar os parâmetros cristalográficos, como o tamanho dos cristalitos (COUTINHO et al., 2003).

O PEBD apresenta bom desempenho a baixas temperaturas, baixa permeabilidade ao vapor d'água e alta permeabilidade a gases. É inerte e transparente, apresenta boa termossoldabilidade e ótimo desempenho em equipamentos de transformação, conversão e acondicionamento (SOARES; MELO, 2007). Essa embalagem tem como desvantagem a fragilidade, rasgando-se ou estourando com facilidade, ser difícil de carregar e não se mostrar prática no manuseio doméstico, porém tem como vantagem ser uma embalagem de baixo custo, que utiliza pouca energia na sua fabricação e reduz significativamente o resíduo sólido, possui, ainda, boas propriedades óticas e boa processabilidade (COUTINHO et al., 2003). O PEBD também apresenta propriedades importantes, do ponto de vista industrial, como a tenacidade à temperatura ambiente e a baixas temperaturas (com resistência mecânica suficiente para muitas aplicações), a excelente resistência à corrosão, as ótimas propriedades de isolamento, a ausência de cheiro e sabor e a baixa permeação de vapor d'água (CRIPPA, 2006a).

As embalagens de PEBD destinadas ao acondicionamento de leite pasteurizado devem ser livres de microrganismos patogênicos e outros que possam desenvolver durante a estocagem e comercialização do produto (PETRUS; FARIA, 2007). Normalmente, a radiação ultravioleta (UV) é empregada, nos equipamentos de envase, para a redução da microbiota de superfícies de materiais utilizados na embalagem de alimentos, seja em processos assépticos ou não. A redução dessa microbiota em processo contínuo de envase de leite é um fator importante para manutenção das características microbiológicas do produto, aumentando, assim, sua vida de prateleira (ANDRADE et al., 2008b).

## 2.2. Leite de Consumo

Do ponto de vista físico-químico, o leite é uma secreção de pH próximo à neutralidade (6,50 a 6,70), que se constitui em uma emulsão de gorduras e água, estabilizadas por uma dispersão coloidal de proteínas, em uma solução de sais, vitaminas, peptídeos, lactose, oligossacarídeos, caseínas e outras proteínas. Possui também enzimas, anticorpos, hormônios, pigmentos (carotenos, xantofilas, riboflavina), células (epiteliais, leucócitos, bactérias e leveduras) e gases dissolvidos ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  e  $\text{N}_2$ ) (WALSTRA, 2001).

Por definição biológica, leite é o fluido produzido por glândulas mamárias de mamíferos fêmeas (mais de 4.500 espécies), com a finalidade de nutrir a prole, e normalmente é a única fonte de alimentação do jovem mamífero. Sua função é proporcionar à cria energia e nutrientes para sua subsistência. Assim, o leite é um alimento de alto valor nutricional, com digestibilidade facilitada, visando à assimilação rápida de seus constituintes. A composição centesimal do leite varia entre as espécies, uma vez que as necessidades nutricionais são diferentes de uma espécie para a outra. O leite oferece ainda inúmeras funções fisiológicas, sendo provavelmente a mais importante delas aquela relativa à proteção. Muitas dessas funções são proporcionadas por proteínas e peptídeos que incluem enzimas, imunoglobulinas, inibidores de enzimas, fatores de crescimento, hormônios e agentes antimicrobianos (FOX; McSWEENEY, 2003).

Segundo a definição do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), leite é o produto normal, fresco e integral, oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 1996, 2002).

Os lipídios do leite formam uma emulsão com sua fração aquosa. Os triglicerídeos representam aproximadamente 98% da fração lipídica do leite. Diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos, fosfolípidos e colesterol também estão presentes em menor quantidade. A lactose, dissacarídeo formado por uma molécula de galactose e uma de glicose, é o principal carboidrato do leite. As proteínas do leite estão distribuídas em duas frações

distintas: caseínas e proteínas do soro. A caseína corresponde a 80% do total protéico no leite bovino e pode ser subdividida em quatro frações principais,  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ - caseína, que se associam para formarem a micela de caseína. As proteínas do soro apresentam formato globular, e as principais encontradas no leite bovino são  $\beta$ - lactoglobulina,  $\alpha$ - lactoalbumina, albumina do soro sanguíneo (BSA) e imunoglobulinas. O leite bovino também possui quantidade expressiva de minerais, em que se destacam o cálcio e o fósforo, além de vitamina A do complexo B (FOX; McSWEENEY, 2003).

As vitaminas são compostos naturais indispensáveis e, do ponto de vista fisiológico-nutritivo, os componentes minoritários mais importantes do leite. A deficiência de vitaminas na dieta provoca enfermidades que podem ser muito graves. O homem, ao contrário das plantas e microrganismos, não tem capacidade de sintetizar quantidade suficiente de vitaminas e, portanto, tem que ingeri-las na alimentação ou por meio de suplementos. Esse grupo de substâncias minoritárias, que pertencem a diferentes classes de substâncias químicas e que estão presentes no leite em pequenas quantidades, pode ser hidrossolúvel, tais substâncias quais se encontram no soro, ou lipossolúveis presentes na parte lipídica do leite. A vitamina B<sub>2</sub> (riboflavina) é a base das coenzimas flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) e, portanto, está relacionada com reações de oxirredução, de suma importância no metabolismo energético (cadeia respiratória, transferência de prótons). O conteúdo médio de riboflavina no leite de vaca é de 1,6 mg.L<sup>-1</sup> (SCHLIMME; BUCHHEIM, 2002).

O leite é um alimento altamente perecível, pois sua rica composição o torna um meio suscetível à deterioração pela ação de enzimas ou pelo desenvolvimento microbiano. Dessa forma, faz-se necessário um tratamento para preservar o leite e assegurar sua utilização e segurança (MARTH; STEELE, 2001). No Brasil, são comumente utilizados os tratamentos térmicos: pasteurização e esterilização por ultra-alta temperatura (UAT), com o objetivo de eliminar todos os patógenos do leite e garantir maior estabilidade do produto.

A Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), define leite

pasteurizado como o leite fluido elaborado a partir do leite cru refrigerado na propriedade rural, submetido ao tratamento térmico na faixa de temperatura de 72 a 75 °C durante 15 a 20 seg, seguido de resfriamento imediato em temperatura igual ou inferior a 4 °C e envase no menor prazo possível, sob condições que minimizem contaminações. Define, ainda, leite UAT como o leite homogeneizado submetido à temperatura de 130 a 150 °C por 2 a 4 seg, mediante o processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado na temperatura inferior a 32 °C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (BRASIL, 2002).

Durante a pasteurização não há perdas nutricionais significativas no leite. Vitaminas lipossolúveis A, D e E e vitaminas hidrossolúveis biotina, ácido nicotínico, ácido pantotênico e riboflavina são relativamente estáveis ao calor (ROCHA, 2004). A esterilização, por sua vez, provoca modificações tanto no valor nutritivo do leite quanto nas suas características sensoriais, pois desenvolve um sabor cozido que é considerado inaceitável por alguns consumidores (LORTAL; DELAGE, 2008). Entretanto, o leite UAT teve, ao longo da década de 1990, crescente participação no mercado de leite fluido, em detrimento do leite pasteurizado. A produção nacional de leite pasteurizado, que em 1990 era cerca de 4 bilhões de litros, caiu para 1,63 bilhão em 2000, correspondendo a uma redução de 245% ao longo do período. Em 2004, o consumo de leite pasteurizado correspondia a 27% do total de leite fluido consumido no Brasil. Nos Estados Unidos da América, essa situação é diferente, pois o leite UAT era o tipo mais consumido até o final dos anos 1980, e nas últimas décadas o leite pasteurizado vem tendo predominância no mercado norte-americano, provavelmente devido às melhores características de sabor (EMBRAPA, 2008).

O consumo *per capita* de leite fluido no Brasil em 2007 era de 77 kg.pessoa<sup>-1</sup>.ano<sup>-1</sup>, enquanto nos Estados Unidos esse valor era de 95,6 kg.pessoa<sup>-1</sup>.ano<sup>-1</sup> e nos países da União Europeia, cujo consumo de leite fluido tem decrescido, o consumo *per capita* em 2007 foi de 69,1 kg.pessoa<sup>-1</sup>.ano<sup>-1</sup> (EMBRAPA, 2008).

### **2.3. Qualidade de Leite de Consumo**

Qualidade é a adequação para uso, e isso se aplica quando as expectativas dos consumidores são atendidas. Dessa forma, os atributos de qualidade são muito variáveis e não significam simplesmente que o produto cumpre os requisitos legais ou atende às ideias preconcebidas pelos produtores. Os tecnólogos de alimentos desempenham papel fundamental na definição dos processos de qualidade dentro de critérios definidos e no desenvolvimento de métodos para determinar quando e em que extensão um critério deve ser cumprido. Em alguns casos, a qualidade pode ser medida por métodos mais ou menos objetivos, como segurança, vida de prateleira ou painel de provadores (WALSTRA, 2001).

Na avaliação da qualidade do leite, devem-se levar em consideração as características sensoriais, nutricionais, físico-químicas e microbiológicas. A qualidade do processo também deve ser garantida para não causar danos ambientais, como poluição ou uso excessivo de fontes energéticas e de água (ZOCCHÉ et al., 2002).

Diversos fatores intrínsecos e extrínsecos podem afetar a qualidade final do leite. Os fatores intrínsecos incluem a raça do animal, o período de lactação, o número de parições, a dieta oferecida à vaca e seu estado de saúde. Os fatores extrínsecos, por sua vez, são aqueles capazes de afetar a qualidade do produto após sua produção, a exemplo do manejo e da higiene da ordenha, a velocidade e temperatura de resfriamento, o transporte e armazenamento do leite antes de seu processamento (SANVIDO, 2007).

A qualidade microbiológica do leite é um termo amplo e genérico. Os microrganismos envolvidos com a contaminação do leite são bactérias, vírus, fungos e leveduras. Com relação às bactérias, o leite pode proporcionar o desenvolvimento de dois grandes grupos: os mesófilos e os psicotróficos (ZOCCHÉ et al., 2002). As bactérias mesófilas aeróbias e anaeróbias facultativas são capazes de se multiplicarem em temperaturas entre 20 e 45 °C, e a temperatura ótima de crescimento é em torno de 32 °C. Países de clima tropical apresentam temperaturas ambientes mais elevadas, proporcionando ótimas condições para o rápido desenvolvimento desse grupo de microrganismos (FRANCO; LANDGRAF, 1996). A importância



desse grupo de bactérias se deve ao fato de compreender a maioria dos contaminantes do leite, tanto deteriorantes quanto patógenos. Dessa forma, sua contagem é considerada um bom indicador da qualidade microbiológica do leite (JAY et al., 2006). Bactérias psicrotróficas são capazes de se multiplicarem e formar colônias quando incubadas a 7 °C durante 7 a 10 dias, apesar de a sua temperatura de crescimento ótimo ser 21 °C (FRANK; YOUSEF, 2004). Essas bactérias produzem proteases e lipases que atuam sobre as proteínas e lipídios, originando *off flavors*. Apesar de os psicrotróficos serem destruídos pelo calor, as enzimas que produzem são termorressistentes e geram *flavors* estranhos e alteram as propriedades físico-químicas do leite (WALSTRA, 2001). As bactérias psicrotróficas normalmente isoladas dos produtos lácteos incluem uma variedade de gêneros: *Pseudomonas*, *Flavobacteria*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus* e *Lactobacillus*. Alguns patógenos isolados de leite também são psicrotróficos, como *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* (FRANK; YOUSEF, 2004).

Os processos industriais utilizados para o controle das populações microbianas do leite, como o tratamento térmico e a refrigeração, não são suficientes para assegurar a qualidade do leite e de seus derivados, pois nenhum dos processos tem a capacidade de corrigir os problemas da matéria-prima. Portanto, é importante obter-se leite com a melhor qualidade higiênica possível, a qual somente será assegurada quando todos os elos da cadeia, da propriedade à comercialização, estiverem atuando em consonância, para assim obter um produto final de excelente nível nutricional e higiênico e de longa durabilidade (LANGE; BRITO, 2005). A qualidade do leite está associada à carga microbiana e à taxa de multiplicação desses microrganismos que dependem, basicamente, dos seguintes fatores: carga microbiana do leite dentro da própria glândula mamária do animal, ou seja, da saúde do rebanho em termos de mastite; higiene da ordenha; condição da limpeza e higienização dos utensílios utilizados na ordenha; qualidade da água utilizada no estábulo e do binômio tempo/temperatura de armazenamento do leite (GUIMARÃES, 2002).

A saúde do animal pode alterar substancialmente a composição e qualidade do leite, em especial quando este apresenta inflamação da

glândula mamária, comumente chamada de mastite. Nesse quadro inflamatório, que em geral é detectado pelo aumento da contagem de células somáticas (CCS) no leite, o funcionamento das células epiteliais mamárias é modificado, devido à alteração da permeabilidade das membranas e à redução da síntese dos componentes do leite e do aumento da concentração celular responsável pela modificação das atividades enzimáticas no leite. O leite com CCS alta sofre mudança na composição, como decréscimo do conteúdo de lactose e da relação entre o nitrogênio caseínico e o nitrogênio total (WALSTRA et al., 2001, 2006).

Outro sinalizador da qualidade do leite são as análises físico-químicas, cuja importância consiste na avaliação do crescimento de microrganismos acidificantes, na detecção de fraudes, como a adição de água, soro, neutralizantes de acidez, reconstituintes de densidade ou superaquecimento e na verificação da adequação aos índices legais (ZOCCHÉ et al., 2002).

A contaminação pelo ar é um grande problema em indústrias de alimentos que se preocupam com o controle de qualidade de seus produtos, principalmente nas áreas de embalagens e de produtos lácteos não fermentados. A presença de microrganismos no ambiente de processamento dos alimentos pode levar à contaminação do produto acabado, reduzindo a sua qualidade. O objetivo do controle de contaminação do ar é a extensão da vida de prateleira dos produtos. Conforme recomendação da *American Public Health Association* (APHA), os ambientes são considerados em condições higiênicas satisfatórias, adequadas ao processamento de alimentos quando apresentarem uma contagem de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos de até 30 UFC.cm<sup>-2</sup>.semana<sup>-1</sup> (APHA, 2001).

A legislação brasileira, por meio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, na Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002, aprovou o regulamento técnico de produção, identidade e qualidade de leite pasteurizado, fixando os requisitos mínimos de qualidade que deve ter o leite pasteurizado. Entre eles, as características físico-químicas e microbiológicas (Tabela 1).

Tabela 1 – Requisitos físico-químicos e microbiológicos de qualidade de leite pasteurizado, fixados pela legislação brasileira

Requisito	Leite Cru		Leite Pasteurizado		
		Integral	Padronizado	Semi-desnatado	Desnatado
Teor de gordura (g/100 g)	> 3,0	Teor original	3,0	0,6 a 2,9	Máx. 0,5
Acidez (g ácido láctico/100 mL)	0,14 a 0,18			0,14 a 0,18	
Proteína Total (g/100 g)	Min. 2,9			-	
Índice crioscópico máximo	- 0,530 °H			-0,530 °H	
Contagem padrão em placas (UFC. mL <sup>-1</sup> )	Max. 5x10 <sup>5</sup>			n = 5; c = 2; m = 4,0x10 <sup>4</sup> M = 8,0x10 <sup>4</sup>	
Coliformes (NMP mL <sup>-1</sup> ) (30/35 °C)	-			n = 5; c = 2; m = 2 M = 5	
Coliformes (NMP.mL <sup>-1</sup> ) (45 °C)	-			n = 5; c = 2; m > 1 M > 2	
<i>Salmonella</i> ssp./25 mL	-			n > 5; c > 0; m > ausência	

Fonte: IN 51, de 18/09/2002, do MAPA (BRASIL, 2002).

#### 2.4. Vida de Prateleira de Leite de Consumo

A qualidade da maioria dos alimentos e bebidas diminui com a estocagem, e existe um tempo finito antes de o produto se tornar inaceitável. Esse tempo entre a produção e a inaceitabilidade é conhecido como vida de prateleira, ou seja, se refere ao tempo que o alimento pode manter-se na prateleira do varejista ou do consumidor antes de se tornar inaceitável. Três fatores controlam a vida de prateleira: as características do produto; o ambiente que o produto é exposto durante a distribuição; e as propriedades de embalagem (ROBERTSON, 1993).

O leite pasteurizado tem uma vida de prateleira curta, e entre os fatores que envolvem a deterioração desse produto durante a estocagem incluem fatores intrínsecos, como nível de ácidos graxos livres e conteúdo natural de metais do leite ou fatores externos e de processamento incluindo manuseio, agitação, estocagem, temperatura, exposição à luz e contaminação por metais ou microrganismos (RAVANIS; LEWIS, 1995; VASSILA et al., 2002). Esses fatores podem ser classificados em nutricional, como a destruição de vitaminas e sensorial, como desenvolvimento de *off-flavor*. Considerando as causas da redução da vida de prateleira, os fatores podem ser classificados como químicos (oxidação lipídica), físico-químicos

(oxidação pela luz), nutricionais (degradação de vitaminas) ou microbiológicos (deterioração por bactérias). Dessa forma, deve-se monitorar tanto a qualidade microbiológica quanto físico-química do leite pasteurizado durante a estocagem, para manutenção de sua qualidade nutricional.

Durante o armazenamento do leite ocorrem alterações em sua composição que determinam sua vida de prateleira. As modificações oxidativas dos lipídios consistem, na maioria das vezes, na oxidação induzida de ácidos graxos insaturados provocados pela ação de oxigênio ativado (singlete). Temperaturas elevadas, a luz e alguns elementos que atuam cataliticamente podem promover essa reação e, como consequência, produzir defeitos de sabor no leite (SCHLIMME; BUCHHEIM, 2002).

A contaminação pós-pasteurização é sinalizada por contribuir com o crescimento de microrganismos no leite e, conseqüentemente, pela sua deterioração. O tempo requerido para que ocorram as mudanças de *flavor* depende do número e tipo de microrganismos presentes (ERICKSON, 1997). Os microrganismos psicotróficos crescem a uma temperatura de 0 a 7° C, independentemente de sua temperatura ótima de crescimento. A temperatura em que o leite é refrigerado durante sua vida de prateleira favorece o crescimento desses organismos. Muitos deles produzem enzimas que não são destruídas pelo tratamento térmico (LANGE; BRITO, 2005).

A oxidação lipídica está na origem do desenvolvimento do ranço, da produção de compostos responsáveis por *off flavors*. Esse tipo de reações não só diminuem o tempo de vida de prateleira e o valor nutritivo dos produtos alimentares, como também podem gerar compostos nocivos (SILVA et al., 1999).

No Brasil, as alterações mais comuns que ocorrem no leite pasteurizado são ocasionadas por bactérias psicotróficas, que atacam proteínas e lipídios provocando *off-flavor* (WALSTRA, 2006). Entre os defeitos do leite produzido na Grécia, o *off-flavor* induzido pela luz é provavelmente o mais comum e pode ser causado por *flavor* de queimado desenvolvido durante os primeiros dias de armazenamento, causado por produtos da degradação de aminoácidos das proteínas de soro, que possuem enxofre na estrutura (metionina, por exemplo); ou, ainda, é um *off-*

*flavor* metálico ou de papelão atribuído à oxidação de lipídios. A exposição à luz, especialmente em comprimento de ondas menores que 500 nm, também causa destruição de vitaminas sensíveis à luz, principalmente riboflavina e vitamina A (MOYSSIADI et al., 2004).

A luz do sol se estende aproximadamente de 380 a 750 nm no espectro visível e de 200 a 380 nm no ultravioleta. Esse espectro de emissão é vasto e rico em energia. Em se tratando de fotodegradação do leite todo tipo de exposição ao sol, mesmo que por poucos minutos, deve ser evitado. A luz artificial (de lâmpadas fluorescentes), por sua vez, é menos rica em energia. Elas emitem uma luz policromática (branca), podendo estar agrupada em duas grandes classes:

1) Branco “frio”, relativamente rico em todos os componentes coloridos do espectro visível, e por isso é desaconselhado utilizar esse tipo de lâmpada para iluminar vitrines e *displays* de gêneros alimentícios fotossensíveis, como o leite e produtos lácteos.

2) Branco “quente”, rico nos componentes amarelo, laranja e vermelho, porém muito pobre nos componentes violeta, azul e verde, sendo, assim, menos rico em energia.

A restrição da luz chamada de branco “frio” também é devida à sua forte emissão no comprimento do azul-verde (aproximadamente 444 nm), onde está a terceira faixa de absorção da riboflavina, conforme apresentado na Figura 1 (situada na região do visível) (BOSSET et al., 1993).

Segundo Bosset et al. (1993), os principais fatores extrínsecos que afetam a fotodegradação do leite são intensidade e duração da incidência de luz, a translucidez da embalagem e sua permeabilidade ao oxigênio, bem como a temperatura de estocagem. Fatores esses que devem estar relacionados com os intrínsecos, como pH e conteúdo global.

O oxigênio tem efeito na diminuição da qualidade de um alimento, pois provoca reações de oxidação nas gorduras, alterando significativamente o seu sabor; o O<sub>2</sub> atua ainda no escurecimento enzimático, diminui o valor nutricional pela oxidação das vitaminas e promove a proliferação de microrganismos que deterioram o alimento (BARCELOS; LIMA, 2006).

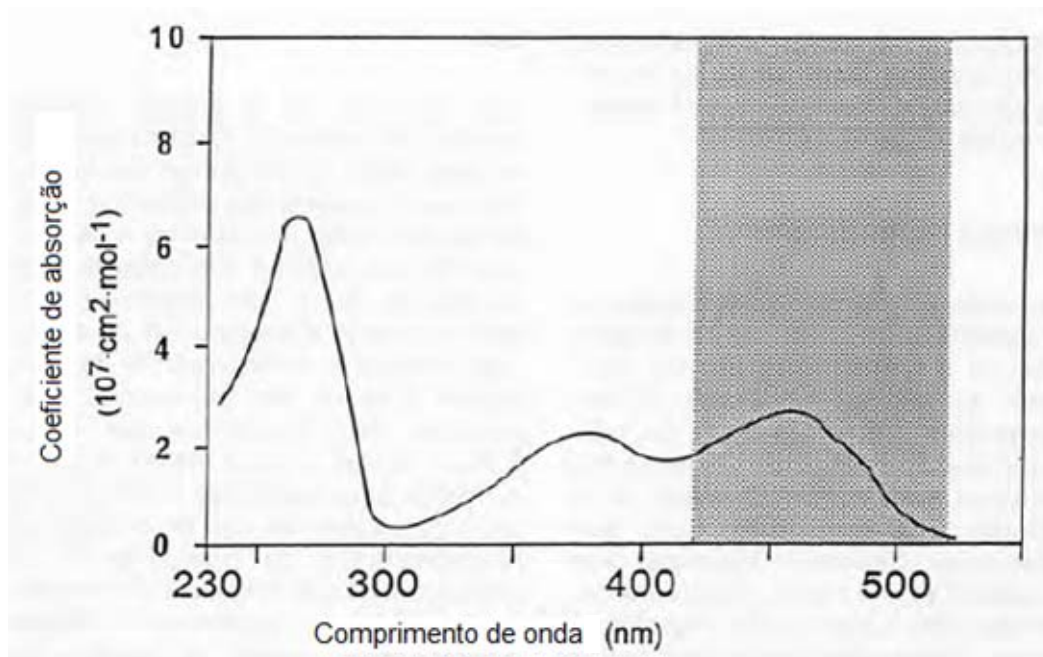


Figura 1 – Espectro de absorção da riboflavina.  
 Fonte: BOSSET et al., 1993.

Para que a função de proteger o alimento, principalmente se estes são sensíveis ao O<sub>2</sub>, seja satisfatoriamente atendida, há a necessidade do uso de materiais de embalagens que funcionem como completa barreira à passagem dos gases (MERGEN, 2004). O material de embalagem é a chave para a proteção do *flavor* e qualidade nutricional do leite fluido comercializado (ROBERTSON, 1993). E, portanto, a escolha da embalagem deve obedecer às mesmas regras das fontes luminosas em razão da terceira banda de absorção da riboflavina. Deve-se também evitar que as embalagens permitam passar as bandas azul-verde, preferindo embalagens pigmentadas com marrom-vermelho; entretanto, certa translucidez é desejada por deixar o produto mais atrativo (BOSSET et al., 1993).

## 2.5. Embalagens Multicamadas

Os consumidores têm buscado produtos com característica de fresco e com alta qualidade. Nesse contexto, crescem as pesquisas envolvendo embalagens multicamadas. As adoções de tecnologias modernas para produção de materiais de embalagens flexíveis e de barreira contribuem

para o aumento de vida de prateleira de alimentos e de uma substancial redução no custo quando comparado com materiais de embalagens tradicionalmente usados (ZYGOURA et al., 2004; HOTCHKISS et al., 1999; BARCELLOS; LIMA, 2006; NOGUEIRA et al., 2007; CRIPPA et al., 2007).

Aplicações em embalagens requerem polímeros com boas propriedades de barreira para que se obtenha uma longa vida de prateleira para o produto. Entretanto, se apenas um polímero é utilizado na composição de um filme de embalagem, é muito difícil obter todas as propriedades requeridas para a conservação do produto; nesse caso, uma opção é utilizar os filmes multicamadas (CRIPPA et al., 2007). Estas vêm apresentando alto crescimento no mercado, destacando-se principalmente em relação ao custo, peso e tamanho, quando comparadas com as demais embalagens, como o cartão. Encontram-se disponíveis no mercado inúmeras opções de embalagens plásticas flexíveis, com diferentes características de barreira para atender a diferentes exigências de mercado (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

Filmes multicamadas são comumente utilizados em embalagens de produtos alimentícios, em razão de propriedades como resistência mecânica, barreira ao oxigênio e, ou, à água, barreira a luz, fácil processabilidade e flexibilidade, aliadas a um custo compatível (CRIPPA et al., 2006b).

Materiais multicamadas podem ser obtidos através de laminação ou coextrusão, sendo os laminados definidos como materiais constituídos por camadas de dois ou mais tipos de polímeros, unidos por um adesivo adicionado na etapa de laminação dos filmes, visando à melhoria quanto à capacidade de conservação, proteção e visual do material final. Os filmes coextrusados são constituídos de várias camadas, porém são obtidos em uma única etapa de extrusão, em que cada material é alimentado em uma camada diferente. No caso de materiais incompatíveis é usado, no processo de coextrusão, um adesivo especial (adesivo de coextrusão) para evitar a delaminação das camadas (NOGUEIRA et al., 2007). A coextrusão permite enaltecer as características dos polímeros mais caros, otimizando a quantidade necessária para desenvolver finalidades específicas de selagem, aderência, rigidez, resistência ao impacto, ao rasgo, perfuração, brilho etc. (CRIPPA et al., 2007).

Diferentes processos e tipos de resina podem afetar significativamente a estrutura química e, por consequência, as propriedades das embalagens; portanto, a caracterização das diferentes camadas constitui importante ferramenta para a adequada aplicação de cada material (NOGUEIRA et al., 2007).

## **2.6. Ferramentas para Caracterização de Embalagens**

As propriedades de tração são úteis para identificação e caracterização de filmes flexíveis, com aplicação na especificação do material, considerando-se desempenho mecânico esperado e no controle de sua qualidade. As propriedades de tração expressam a resistência do material ao alongamento e, mesmo, ao rompimento quando submetido à tração, solicitação característica das máquinas de envase, dos processos de conversão (impressão, laminação etc.) e do manuseio de embalagens. Na Figura 2 é apresentada uma curva característica da relação força (ou resistência à tração) *versus* deformação (ou alongamento) de filmes flexíveis. Observa-se que, inicialmente, o material oferece resistência crescente à solicitação de tração, a qual provoca seu alongamento. A partir de certo ponto, o aumento de resistência passa a ser menor para um mesmo aumento de deformação até o ponto de escoamento, a partir do qual é possível alongar o material sem que este responda com aumento de resistência. Continuando o alongamento, o material irá resistir até que ocorra sua ruptura (OLIVEIRA et al., 1996).

A Microscopia de Varredura por Sonda ou Microscopia de Força Atômica é uma técnica microscópica que constitui ferramenta poderosa para a caracterização morfológica de materiais poliméricos. Ela ocupa posição cada vez mais importante no cenário científico e tecnológico, devido ao seu alto poder de resolução, facilidade na preparação de amostras e menor custo instrumental quando comparado com metodologias usuais, como a microscopia eletrônica de varredura e de transmissão (COSTA et al., 2002). Nessa técnica, uma ponta, com raio de curvatura entre 5 e 10 nm, é conectada a um oscilador piezoelétrico, sendo forçada a vibrar perto da frequência de vibração; quando a altura da amostra varia, são traduzidas por software, produzindo uma imagem da amostra (VANETTI et al., 2008).



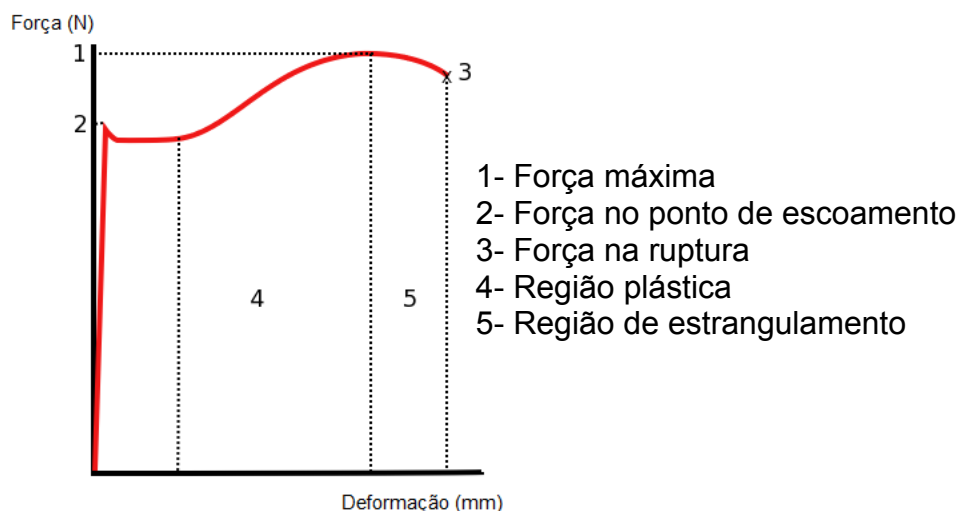


Figura 2 – Curva característica da relação resistência à tração *versus* deformação.

A interação de microrganismos com materiais de embalagens deve-se à sua hidrofobicidade e capacidade de adesão (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006). Acredita-se que as interações hidrofóbicas tenham papel relevante na aderência de organismos patogênicos e não patogênicos a tecidos vivos e que mecanismos similares podem ser responsáveis pela adesão a substratos inanimados (ANDRADE et al., 2008a). A hidrofobicidade de dado material é expressa como a energia livre de interação entre dois entes físicos: (i) imersos na água (a). Se a variação da energia livre das forças dos entes físicos e da água for menor que 0 ( $\Delta G_{iai} < 0$ ), há preferencialmente maior interação entre os entes físicos que entre um ente físico e a água, e a substância é considerada hidrofóbica. Se  $\Delta G_{iai} > 0$ , a substância é hidrofílica (van OSS, 1995). Como todo sistema na natureza, a interação microrganismo e superfície também se procede em direção à diminuição da variação de energia livre, e a adesão do microrganismo ocorrerá se a variação da energia for negativa ( $\Delta G_{TOTAL} < 0$ ) e a adesão será termodinamicamente desfavorável se positiva ( $\Delta G_{TOTAL} > 0$ ) (ANDRADE et al., 2008a).

O conhecimento sobre a permeabilidade à umidade, gases e à luz é de grande importância para o estudo da embalagem em função do tempo de vida útil do alimento. A barreira a gases de uma embalagem é avaliada em

termos de taxa de permeabilidade a gases, ou seja, pela quantidade de gás que passa através de uma unidade de área superficial da embalagem por unidade de tempo, a determinada temperatura e sob certo gradiente de pressão parcial do gás-teste e a determinada umidade relativa (MARGEN, 2004).

A área, espessura e características moleculares do polímero são as principais variáveis do material de embalagem relacionadas à quantidade de gases e vapores que permeiam o filme. A taxa de permeabilidade é proporcional à área exposta a permeação e, em geral, inversamente proporcional à espessura (SARANTÓPOULOS et al., 2002). As características moleculares dos polímeros também influenciam a permeabilidade. A difusão ocorre pela movimentação do permeante através de espaços vazios que se formam no polímero, devido à ação de um gradiente de pressão ou concentração. Esses espaços vazios se relacionam ao volume livre no polímero, à densidade e ao grau de compactação das cadeias. A facilidade de formação desses espaços vazios depende da rigidez das cadeias e das forças de ligação no polímero (SARANTÓPOULOS et al., 2002). Quanto à estrutura molecular, um polímero, para ter boas propriedades de barreira, deve possuir as seguintes propriedades (MARGEN, 2004):

- Certo grau de polaridade, como a dos grupos nitrilo, cloreto, fluoretos, acrílico e éster, no caso de permeantes apolares, como o oxigênio.
- Alta rigidez da cadeia.
- Inércia em relação ao permeante.
- Possibilidade de alto grau de compactação das cadeias, advindo da simetria molecular, grau de cristalização ou orientação.
- Algum grau de ligação ou atração entre as cadeias.
- Alta temperatura de transição vítrea (Tg).

### **3. OBJETIVOS**

Este trabalho teve como objetivos caracterizar e avaliar propriedades como permeabilidade ao oxigênio, transmissão de luz, elasticidade e tração de filmes multicamadas, bem como verificar o número de camadas de cada embalagem e a rugosidade da superfície em contato com o alimento e sua hidrofobicidade. Essas características foram estudadas para avaliar a aplicação dessas embalagens em leite de consumo pasteurizado e, portanto, foram comparadas com as mesmas características da embalagem utilizada comercialmente.

E após a caracterização de cada embalagem, avaliar a influência de diferentes barreiras na vida de prateleira do leite, considerando a estabilidade microbiológica, físico-química, sensorial e nutricional de leite em condições comerciais de armazenamento.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se filmes com diferentes barreiras fornecidos pela empresa DuPont Packaging. Avaliaram-se filmes multicamadas coextrusados com diferentes barreiras:

- 1- SCLAIRFILM - 90E0323W7.
- 2- SCLAIRFILM - 90B0324PW.
- 3- SCLAIRFILM - 80E0337W7.
- 4- Filme de Polietileno de baixa densidade (PEBD) – controle.

Os filmes 1 e 3 têm duas camadas distintas: uma branca e outra preta. Cada camada é composta por várias camadas de polietileno de baixa densidade, sendo na parte branca suas várias camadas unidas por um adesivo de cor branca e a outra por um adesivo de cor preta.

O filme 2 contém apenas adesivo branco unindo suas camadas de polietileno.

O filme 4 é um PEBD monocamada, pigmentado com óxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ), utilizado normalmente no envase de leite pasteurizado.

## **4.1. Caracterização dos filmes**

### **4.1.1. Transmissão de luz**

As características do espectro de transmissão sobre o comprimento de onda de 250-780 nm (RYSSTAD et al., 1998; van AARDT et al., 2001; ZYGOURA et al., 2004; MOYSSIADI et al., 2004), em todos os materiais de embalagem, foram medidos com um espectrofotômetro Shimadzu model 1601 UV-Vis (Kyoto, Japão), no Laboratório de Secagem e Pigmentos Naturais do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

As amostras foram cortadas com aproximadamente 1 cm de largura e dispostas dentro da cubeta, de maneira que a superfície externa recebia o feixe de luz. Seguiu-se à leitura de absorvância de cada amostra.

### **4.1.2. Teste de Permeabilidade ao Oxigênio**

A taxa de permeabilidade ao oxigênio (TPO) foi determinada por método coulométrico, conforme descrito na norma ASTM (1985). A TPO foi medida em um 6600 Headspace Oxygen/Carbon dioxide analyzer (Illinois Instruments, USA), no Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

Os testes foram conduzidos em um ambiente com umidade relativa de 60% e temperatura de 21 °C, sendo expressa em  $\text{cm}^3\text{O}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$ . O teste foi realizado em quadruplicata.

Os procedimentos foram os que se seguem:

- Foram preparados saquinhos, de cada embalagem, com área conhecida.
- Acrescentou-se nitrogênio nos saquinhos, de maneira que a concentração de oxigênio foi reduzida o máximo possível.
- Foram feitas medições de oxigênio, em tempos determinados, no equipamento descrito anteriormente, previamente calibrado.

#### **4.1.3. Análise Mecânica dos Filmes**

Esta análise foi realizada no Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

Os filmes foram analisados quanto às propriedades de tração, que expressam a resistência do material ao alongamento e, mesmo, ao rompimento quando submetido à tração, características importantes para máquinas de envase e acondicionamento, dos processos de conversão e do manuseio da embalagem.

As propriedades de tração analisadas, conforme ASTM (2002), foram: resistência à tração na ruptura (carga máxima no ponto de ruptura, N) e resistência à elasticidade na carga máxima (deformação relativa na carga máxima, %).

Utilizou-se o Aparelho Universal de Teste Instron (modelo 3367, USA), com célula de carga de 1 kN (100 kg), velocidade de tração de 500 mm.min<sup>-1</sup> e distância entre as garras de 35 mm. Os experimentos foram conduzidos com oito repetições com corpos de prova de 3 x 2 cm.

#### **4.1.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar a estrutura da superfície dos filmes estudados. Todo procedimento foi realizado no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa.

As amostras foram imersas em nitrogênio líquido e cortadas de forma a permitir a observação da seção transversal e das superfícies de contato com o alimento. Em seguida, as amostras receberam uma cobertura de ouro, em um metalizador da marca Balzers, modelo FDU 010, para permitir a posterior visualização no microscópio eletrônico de varredura da marca LEO, modelo VP 1430.

#### 4.1.5. Microscopia de Varredura por Sonda (MVS)

As amostras foram firmemente fixadas sobre o suporte do microscópio, e seguiu-se à varredura na área 100 x 100 µm.

Neste trabalho, utilizou-se um microscópio da marca NT-MDT, modelo NTEGRA PRIMA, operando no modo de força atômica de contato periódico, em temperatura ambiente. As imagens topográficas e de contraste foram obtidas simultaneamente utilizando sondas de silício com raio de curvatura de 10 nm, constante de mola entre 0,4 e 2,7 N/m e frequência de ressonância de aproximadamente 82 KHz. A velocidade de varredura foi de duas linhas por segundo. A razão entre a amplitude de oscilação livre e a amplitude mantida durante uma varredura foi mantida constante em 50%.

Essa técnica permite calcular os valores de rugosidade Ra, Rq e Rz, que são, respectivamente, rugosidade média, média da raiz quadrada das rugosidades e média dos pontos mais irregulares dos filmes.

Esta análise foi realizada no Laboratório de Nanoscopia, do Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa.

#### 4.1.6. Estudo da Hidrofobicidade dos Filmes

Determinou-se a hidrofobicidade dos filmes, utilizando o equipamento Goniômetro (Kruss®) pelo método da gota séssil. Os ângulos de contato foram determinados com água, formamida e α-bromonaftaleno para as superfícies avaliadas. O cálculo da energia livre de interação global ( $\Delta G^{\text{tot}}$ ) foi feito, seguindo-se as equações propostas por van Oss (1995).

$$\Delta G^{\text{tot}} = \Delta G_{sas}^{\text{LW}} + \Delta G_{sas}^{\text{AB}}$$
$$\Delta G_{sas}^{\text{LW}} = -2 \cdot \sqrt{\gamma_s^{\text{LW}} - \gamma_a^{\text{LW}}}$$
$$\Delta G_{sas}^{\text{AB}} = -4 \left( \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-} + \sqrt{\gamma_a^+ \gamma_a^-} - \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_a^-} - \sqrt{\gamma_a^+ \gamma_s^-} \right)$$

em que  $\Delta G_{sas}^{\text{LW}}$  é a energia livre das interações de Lifshitz-van der Waals;  $\Delta G_{sas}^{\text{AB}}$  é a energia livre das interação ácido-base de Lewis;  $\gamma^+$  é a tensão interfacial do componente acceptor de elétrons do componente ácido-base;

e  $\gamma^-$  é a tensão interfacial do componente doador de elétrons do componente ácido-base. Sendo  $s$  e  $a$  superfície e água, respectivamente.

Os valores das tensões interfaciais da superfície foram obtidos por meio da determinação do ângulo de contato da superfície com os três líquidos de polaridades diferentes e aplicando equações de van Oss (van OSS et al., 1987; van OSS, 1994).

## **4.2. Aplicação das embalagens em leite pasteurizado**

Utilizou-se leite produzido com boas práticas agropecuárias e recebido pelo Laticínios Union Ltda. O leite foi padronizado por meio de máquina padronizadora (West Falia, tipo MM3004D) a 3,0% de gordura e pasteurizado à temperatura de 74 °C por 15 seg em trocador de calor de placas (BRAS HOLANDA, modelo 5000) e resfriado a 4 °C. O leite foi imediatamente envasado, em cada uma das quatro embalagens, em equipamento próprio (BRASPAC, modelo 1250), sendo o volume de cada embalagem 1.000 mL. O leite embalado foi transportado, em caixas isotérmicas, para o Laboratório de Pesquisa de Leite e Derivados, do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (LPLD/DTA/UFV), onde foi armazenado por 21 dias a 5 °C, em um refrigerador com vitrine que permitia a incidência de luz.

### **4.2.1. Testes microbiológicos**

Utilizaram-se as técnicas apresentadas no *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* of American Public Health Association (APHA, 2001). Foram realizadas no Laboratório de Leite e Derivados (LPLD) do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), sendo a Contagem Padrão em Placas e a contagem de microrganismos psicrotóxicos realizadas a cada três dias de armazenamento. Realizaram-se análises de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Salmonella* sp. apenas no dia de embalagem do leite.



#### **4.1.1.1. Contagem-padrão em placas**

Colocou-se 1 mL da amostra em 9 mL de diluente (água peptonada 0,1%) e homogeneizada em *Vortex* (IKA, modelo MS2). A partir dessa diluição inicial ( $10^{-1}$ ) foram efetuadas as demais diluições desejadas em água peptonada (OXOID Ltd., Inglaterra) 0,1%. Em seguida, 1 mL de cada diluição foi transferida para placas *Petrifilm™* para contagem total (*Petrifilm™* AC), devidamente identificadas. As placas foram incubadas a  $32 \pm 2$  °C por 48 h. Após esse tempo, foram calculadas o número de unidades formadoras de colônias por mililitro da amostra (UFC.mL<sup>-1</sup>).

#### **4.2.1.2. Contagem de microrganismos psicotróficos**

Colocou-se 1 mL da amostra em 9 mL de diluente (água peptonada 0,1%) e homogeneizada em *Vortex*. A partir dessa diluição inicial ( $10^{-1}$ ), foram efetuadas as demais diluições desejadas em água peptonada a 0,1 %. Em seguida, procedeu-se ao plaqueamento no método *Pour Plate*, em que 1 mL de cada diluição e da própria amostra foi transferido para placas de Petri, que posteriormente foram adicionadas de ágar de contagem-padrão – Plate Count Agar (PCA) (HIMEDIA, Itália). As placas foram incubadas a  $7 \pm 1$  °C por 7 a 10 dias. Após esse tempo, foi calculado o número de unidades formadoras de colônias por mililitro da amostra (UFC.mL<sup>-1</sup>).

#### **4.2.1.3. Coliformes totais – Método do número mais provável – NMP**

##### **Teste presuntivo**

Transferiu-se 1 mL da amostra e das diluições necessárias para a série de três tubos contendo caldo lauril sulfato de sódio (LST) e adicionados de tubos de *Durham* invertidos. Os tubos foram incubados a  $30^{\circ} \pm 1$  °C por  $24 \pm 2$  horas. Após o período de incubação, os tubos com produção de gás foram tidos como positivos e passaram por um teste confirmativo. Os tubos negativos foram incubados novamente por mais  $24 \pm 2$  horas. Com base nos tubos positivos por série, pode-se calcular o NMP de coliformes por mL de amostra do teste presuntivo, utilizando tabela apropriada.

## **Teste confirmativo**

Para tubos com 10 mL de caldo verde brilhante lactose bile 2%, transferiu-se uma alçada das amostras dos tubos de caldo LST positivo (do teste presuntivo). Esses tubos foram incubados a  $30^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Com base nos tubos que se apresentaram com gás, pode-se confirmar e reportar o NMP de coliformes.mL<sup>-1</sup> de amostra.

### **4.2.1.4. Coliformes termotolerantes**

As amostras dos tubos de LST positivos, provenientes do teste presuntivo da determinação de coliformes totais, foram transferidas para caldo EC, com o auxílio de alça bacteriológica. Incubou-se por  $48 \pm 2$  h a  $45,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  (banho-maria). Alíquotas dos tubos positivos (com produção de gás) foram estriadas em Ágar EMB e as placas, incubadas a  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas.

### **4.2.1.5. Salmonella**

#### **Amostragem e Pré-enriquecimento**

Foram pesados assepticamente 25 g de amostra e acrescentados 225 mL de caldo lactose (MERCK KGaA, Alemanha) estéril.

#### **Enriquecimento seletivo**

A amostra pré-enriquecida foi homogeneizada e, em seguida, transferido 1 mL dessa mistura para 10 mL de caldo selenito cistina – SC (MERCK KGaA, Alemanha) e outro 1 mL para 10 mL de caldo tetrionato – TT (OXOID Ltd., Inglaterra). Os caldos SC e o TT foram incubados a  $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  /  $24 \pm 2$  h.

## **Isolamento**

A partir dos caldos, cada amostra foi semeada com alça bacteriológica em placas de Petri, contendo ágar XLD (OXOID Ltd., Inglaterra) e ágar Hektoen (OXOID Ltd., Inglaterra) e incubadas a  $35 \pm 1$  °C/  $24 \pm 2$  h. Quando se encontram colônias típicas, segue-se a contagem, e os resultados são expressos em colônias.25 mL<sup>-1</sup>.

### **4.2.1.6. Sedimentação de microrganismos do ar em meio sólido**

A técnica da sedimentação foi realizada expondo-se, por 15 min, uma placa de Petri contendo ágar PCA solidificado, em quatro regiões diferentes da sala de envase do leite, de maneira que toda região de envase fosse avaliada. Em seguida, as placas foram incubadas a  $35 \pm 1$  °C/  $48 \pm 2$  h. O resultado foi expresso em UFC.cm<sup>-2</sup>.semana<sup>-1</sup>, de acordo com recomendação da APHA. Para cálculo da área da placa, considerou-se o diâmetro de 9,1 cm, sendo, portanto, a área de 65 cm<sup>2</sup>.

### **4.2.2. Análises físico-químicas**

Para avaliar a qualidade do leite, realizaram-se no tempo 0 (dia de processamento do leite) os seguintes testes: teor de proteínas, extrato seco, teor de gordura e lactose, densidade e crioscopia para o leite cru e o leite pasteurizado. E para determinar a vida de prateleira realizaram-se, a cada três dias, análises de pH e acidez no leite embalado em quatro embalagens diferentes. Esses testes foram realizados segundo a Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2006), no LPLD/DTA/UFV.

Avaliou-se, ainda, a degradação de vitaminas e oxidação de lipídeos durante o tempo de armazenamento, a cada cinco dias.

#### 4.2.2.1. pH

O pH foi determinado em medidor de pH da marca GEHAKA, modelo PG 1800. Fez-se a calibração do equipamento com os tampões de referência de pH 4 e 7 e, em seguida, as leituras das amostras.

#### 4.2.2.2. Acidez

Esta análise consiste na titulação de determinado volume de leite por uma solução alcalina de concentração conhecida, utilizando-se como indicador a fenolftaleína.

Transferiram-se, para um erlenmeyer de 125 mL, 20 g de leite, e acrescentou-se a mesma massa de água destilada. Em seguida, adicionaram-se 2 mL de indicador, e titulou-se por uma solução de hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  até a viragem, que se reconheceu pela alteração da cor de branca para róseo-claro. O resultado foi calculado da seguinte forma:

$$A = (C_i \times V \times 9) / g$$

em que:

A = acidez expressa em % de ácido láctico (m/V), ou seja,  $\text{g}_{\text{ácido láctico}} / 100 \text{ g}$  da amostra;

$C_i$  = concentração da solução de hidróxido de sódio ( $\text{mol.L}^{-1}$ );

V = volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra;

g = massa da amostra; e

9 = relacionado com o peso equivalente do ácido láctico.

#### 4.2.2.3. Extrato seco

Consiste na perda da umidade por dessecação e pesagem do extrato seco total de uma quantidade determinada de amostra. Para isso, colocaram-se areia purificada em metade de uma placa de Petri e um bastão de vidro apoiado na borda do recipiente. Secou-se em estufa a  $102 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1 h e, em seguida, deixou esfriar em dessecador. Pesou-se o recipiente em balança analítica, e anotou-se a massa (T). Pesaram-se em balança analítica, aproximadamente, 5 g da amostra diretamente no recipiente com

areia; anotou-se a massa (Pi). Esse sistema foi colocado em estufa a  $102 \pm 2$  °C, por 3 h. Pesou-se, após esfriar em dessecador, e anotou-se a massa. Esse procedimento foi repetido (a amostra ficava na estufa por 30 min apenas) até que a diferença entre duas pesagens consecutivas fosse inferior ou igual a 0,1 mg. Anotou a massa final (Pf). Para calcular o teor de extrato seco total (% ES), utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ ES} = ( \text{ Pf } - \text{ T } ) / ( \text{ Pi } - \text{ T } ) \times 100$$

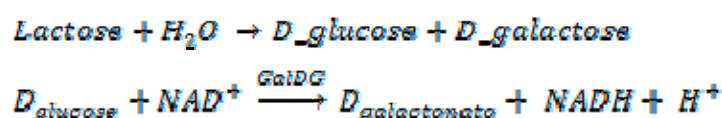
#### 4.2.2.4. Teor de gordura

Este teste se baseia no ataque seletivo da matéria orgânica, por meio de ácido sulfúrico, com exceção da gordura que será separada por centrifugação, auxiliada pelo álcool isoamílico, que modifica a tensão superficial.

Foram adicionados a um butirômetro 10 mL da solução de ácido sulfúrico e, em seguida, lentamente e pela parede do butirômetro (para evitar que se misture com o ácido), 11 mL de amostra homogeneizada e 1 mL de álcool isoamílico. Fechou-se o butirômetro com rolha apropriada e, em seguida, agitou-o, de modo a promover a mistura completa dos líquidos no interior do aparelho. Centrifugaram-se, durante 5 min, de 1.000 a 1.200 RPM e transferiram-no para banho-maria a 65 °C, por 5 min. Foram lidas as porcentagens de gordura diretamente na escala do aparelho e na base do menisco formado pela camada de gordura, imediatamente após retirar o aparelho do banho-maria.

#### 4.2.2.5. Teor de lactose

Neste teste, a lactose é hidrolisada em glicose e galactose na presença de B-galactosidase e água.  $\beta$ -galactose é, então, oxidada por NAD a ácido galactônico, na presença de  $\beta$ -galactose deidrogenase, conforme esquema a seguir.



A quantidade de NADH formado, que é estequiometricamente proporcional ao conteúdo de lactose, é medida pela absorvância a 340 nm. O resultado é obtido pela diferença de densidade ótica (DO) do ensaio de determinação de lactose + galactose e do ensaio de determinação de galactose.

Utilizou-se o kit Lactose/Galactose (Cat. No. 014), que é um teste de dosagem enzimática em UV a 340 nm da BioSentec (Toulouse, França). O teste foi realizado conforme instruções do fabricante (Tabela 2).

Tabela 2 – Procedimentos para realização e cálculos do teste de dosagem enzimática em UV a 340 nm, para análise do teor de lactose em leite

	Lactose		Galactose	
	Branco	Amostra	Branco	Amostra
<b>Tampão pH 4,5</b>	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL
<b>β-galactosidase 100 U</b>	0,05 mL	0,05 mL	0	0
<b>Amostra</b>	0	0,1 mL	0	0,1 mL
<b>Agitar e esperar 20 min</b>				
<b>Tampão 8,6 e NAD 35 mg</b>	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
<b>Água</b>	2 mL	1,9 mL	2,05 mL	1,95 mL
<b>Agitar e ler DO</b>	DO <sub>1</sub>	DO <sub>1</sub>	DO <sub>1</sub>	DO <sub>1</sub>
<b>GaIDH 40 U</b>	0,05 mL	0,05 mL	0,05 mL	0,05 mL
<b>Agitar, aguardar 30 min e ler DO</b>	DO <sub>2</sub>	DO <sub>2</sub>	DO <sub>2</sub>	DO <sub>2</sub>
<b>Cálculos:</b>				
A partir dos dados da galactose:				
$\Delta DO_{\text{galactose}} = [DO_2 - DO_1]_{\text{amostra}} - [DO_2 - DO_1]_{\text{branco}}$				
A partir dos dados da lactose:				
$\Delta DO_{\text{lactose + galactose}} = [DO_2 - DO_1]_{\text{amostra}} - [DO_2 - DO_1]_{\text{branco}}$				
$\Delta DO_{\text{galactose}} = \Delta DO_{\text{lactose + galactose}} - \Delta DO_{\text{galactose}}$				

Fonte: Manual do kit lactose/galactose, BioSentec (modificado).

#### **4.2.2.6. Densidade**

Transferiram-se cerca de 500 mL de leite para uma proveta de capacidade correspondente, evitando incorporação de ar e formação de espuma. O termolactodensímetro (ABRA) foi imerso na amostra, deixando-se flutuar sem que se encostasse à parede da proveta. Observou-se a densidade aproximada no próprio equipamento. Anotou-se a temperatura (fez-se a leitura no termolactodensímetro), para fazer a correção, com base na tabela de conversão.

#### **4.2.2.7. Crioscopia**

Em recipiente apropriado, adicionaram-se 2,5 mL da amostra em cada determinação. Realizaram-se três determinações em crioscópio (Laktron, modelo KP 7000), em cada amostra, em três tubos distintos. Os resultados dos testes foram lidos no aparelho na escala Hortvet (°H)

#### **4.2.2.8. Teor de proteínas**

O teor de proteínas foi avaliado pelo método *Kjeldahl*.

O método desenvolve-se em três etapas. A primeira é a digestão da amostra (3 mL) por uma solução digestora a quente, rompendo, assim, a estrutura proteica para liberação do nitrogênio sob a forma de sais de amônio. Dessa forma, a solução ficará transparente. O resíduo obtido dessa etapa passa para a segunda fase, ainda no frasco de digestão. Nessa fase, o resíduo é aquecido em bloco digestor até o líquido se tornar límpido e transparente, de tonalidade azul-esverdeada. Este é, finalmente, conectado ao destilador, diretamente a um apetrecho para liberação do hidróxido de sódio. A saída do condensador deve estar mergulhada em solução de ácido bórico 4%, adicionada de indicadores (10 mL); nesse caso, a amônia liberada reage com o ácido bórico formando metaborato de amônio. Esse sal (aproximadamente 200 mL de solução) é titulado (3ª etapa) por neutralização com ácido clorídrico, representando a fração nitrogenada que se deseja determinar.

Paralelamente, foi feito o teste-branco, que tem por diferença a utilização de água destilada no lugar da amostra.

Para calcular o teor de proteína bruta, fez-se o seguinte cálculo:

$$\% \text{ Proteína bruta} = \% \text{ Nitrogênio total} \times 6,38$$

Para cálculo de nitrogênio total:

$$\% \text{ Nitrogênio total} = [(A-B) \times C_i \times f_c \times 1,4] / V$$

em que:

A = volume de solução de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra;

B = volume de solução de ácido clorídrico gasto na titulação da prova em branco;

C<sub>i</sub> = concentração inicial (mol/L) da solução de ácido clorídrico;

f<sub>c</sub> = fator de correção para a solução de ácido clorídrico;

V = volume da amostra; e

1,4 = está relacionado com peso equivalente do nitrogênio.

Neste experimento, utilizou-se na etapa 2 bloco digestor da marca Büchi, modelo 435 (Switzerland), sendo o destilador (etapa 3) utilizado da marca Tecnal, modelo TE-036/1.

#### **4.2.2.9. Determinação do teor de riboflavina**

Esta análise foi realizada nos dias 0, 5, 10, 15 e 20 de armazenamento. O método utilizado foi cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), como proposto por Albalá-Hurtado et al. (1997). Todo procedimento foi realizado no Laboratório de Análise de Vitaminas, do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

Avaliaram-se as características analíticas do método utilizado, por meio dos seguintes parâmetros:



Linearidade – A determinação da faixa de linearidade foi realizada pela injeção, em duplicata, de oito concentrações crescentes de solução-padrão entre 0,05 e 5 mg.L<sup>-1</sup>, preparadas em ácido acético 2,4%. Os dados das áreas dos picos na concentração usada em cada composto estudado foram utilizados para análise de regressão linear. A avaliação da linearidade foi feita pelo coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) (ALBALÁ-HURTADO et al., 1997).

Recuperação – Determinado pelo procedimento de adição de padrão às amostras. As porcentagens de recuperação foram obtidas a partir da diferença percentual entre os teores iniciais analisados e os adicionados às amostras previamente homogeneizadas.

Adicionou-se uma concentração conhecida de padrão à amostra, e realizou-se todo o procedimento de extração (conforme descrito a seguir). Como forma de comparação, procedeu-se à extração da mesma amostra sem adição de padrão de riboflavina. O cálculo do percentual de recuperação foi dado por:

$$\% R = (V_f - V_{ad})/V_i \times 100$$

em que:

% R = percentual de recuperação;

V<sub>i</sub> = concentração de vitamina no início;

V<sub>ad</sub> = concentração de vitamina adicionada; e

V<sub>f</sub> = concentração de vitamina no final, ou seja, concentração na amostra adicionada de padrão.

#### **4.2.2.9.1. Curva-Padrão**

A curva-padrão de riboflavina foi construída de acordo com a concentração esperada no leite analisado. Utilizou-se injeção em duplicata de oito concentrações crescentes de solução-padrão entre 0,05 e 5 mg.L<sup>-1</sup>, preparadas em ácido acético 2,4%.

Preparou-se uma solução-estoque de 100 mg/L de padrão de riboflavina (Sigma, Alemanha) em ácido acético glacial (Vetec, Brasil) 2,4%

(v/v) e a partir desta, uma solução intermediária de 10 mg/L de riboflavina em ácido acético.

As soluções-padrão foram filtradas antes de serem injetadas na coluna cromatográfica, em membranas Whatman (0,45  $\mu\text{m}$ , PVDC, 13 mm). Durante todo o procedimento, foram protegidas da luz.

A curva-padrão da riboflavina está apresentada na Figura 3.

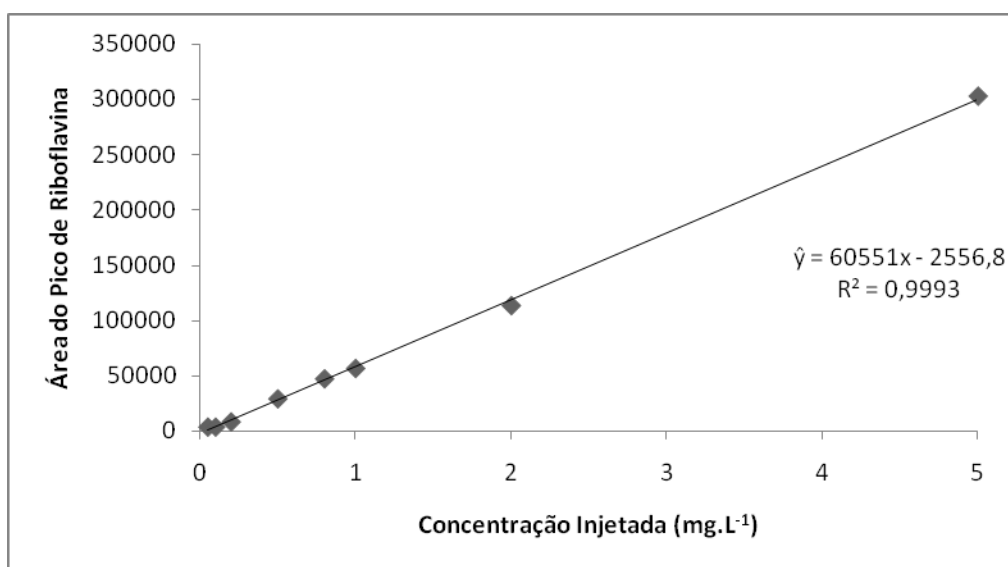


Figura 3 – Correlação linear entre a concentração de riboflavina e a área dos picos correspondentes.

### 3.2.2.9.2. Análise de Riboflavina

A análise foi realizada por CLAE, coluna Merck Lichrospher 100 RP-18 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.00 mm. A área do pico da amostra foi medido e comparado com o padrão. As condições foram: fase móvel (preparado com o citado acima); fluxo 1 mL.min<sup>-1</sup>; detector UV/visível e 50  $\mu\text{L}$  de volume injetado. Os cromatogramas foram lidos em comprimento de onda de 373 nm. A fase móvel foi composta por 5 mM sal heptanossulfônico (Sigma, Alemanha), 0,5% trietilamina (Tedia, USA), 2,4% ácido acético glacial (Vetec, Brasil) e 15% de metanol (Tedia, USA) preparados da seguinte forma: foram

transferidos 1,10 g de sal ácido de heptanossulfônico de sódio e aproximadamente 800 mL de água destilada para um béquer de 2 L. Em seguida, acrescentaram-se 24 mL de ácido acético glacial e 5 mL de trietilamina, e a solução foi cuidadosamente misturada. Por fim, acrescentaram-se 150 mL de metanol grau HPLC (agitando-se cuidadosamente), e a solução foi transferida para um balão volumétrico de 1 L, sendo o volume completado com água ultrapura. Antes da utilização, a solução foi filtrada em membrana Millipore (0,45  $\mu\text{m}$ , Teflon (PTFE) hidrofóbico, 47 mm) e degasada em ultrasson.

Antes da injeção, as amostras foram preparadas da seguinte forma: em um *erlenmeyer* de 125 mL foram acrescentados 10,5 g da amostra. Em seguida, adicionou-se 1 g de ácido tricloroacético (Tedia, USA), agitou-se vigorosamente por 10 s e, depois, em ultrasson por 10 min. Filtrou-se em filtro Whatman nº 1 (125 mm), retirando o máximo de filtrado possível. Em seguida, filtrou-se novamente em filtros Whatman (0,45  $\mu\text{m}$ , PVDC, 13 mm), para injetar HPLC.

Para conhecer das perdas no processo de extração, fez-se o cálculo de perda de umidade do papel filtro Whatman nº 1 (125 mm), da primeira filtração, da seguinte maneira: o papel-filtro (de massa seca conhecida,  $m_1$ ) com o retentado (mais seco possível) foi colocado em estufa a 105 °C, por cerca de 3 h; em seguida, deixou esfriar em dessecador. Pesou-se o papel em balança analítica, anotando-se a massa. Esse procedimento foi repetido (e a amostra ficava na estufa por 30 min apenas) até que a massa do papel fosse constante ( $m_2$ ). Anotou-se a massa final. Dessa forma, a quantidade de amostra perdida pela filtração ( $p$ ) foi calculada da seguinte forma:

$$p = m_2 - m_1$$

As amostras foram protegidas da luz, cobrindo-se os frascos com papel-alumínio ou utilizando frascos âmbar.

A partir das curvas-padrão obtidas, foram calculadas as concentrações da riboflavina nas amostras. O valor real da concentração nas amostras foi obtido pela razão entre o valor encontrado a partir da curva-

padrão e o fator de perda de amostra durante a realização da extração (f), de maneira que f foi calculado da seguinte forma:

$$f = \frac{m_i}{m}$$

em que:

$m_i$  = a massa no início da extração, que corresponde à massa de amostra, somada à massa de TCA adicionada; e

$m$  = a massa de amostra ao final da extração, que corresponde a  $m_i$  subtraído do valor perdido na filtração (p).

#### 4.2.2.10. Oxidação de lipídios

Oxidação de lipídios foi avaliada espectrofotometricamente pelo teste do ácido tiobarbitúrico (TBA), que se trata de um teste baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malonaldeído (MA), um aldeído com três átomos de carbono. Neste ensaio, uma molécula de MA reage com duas moléculas de TBA para formar um complexo de cor vermelha, o qual absorve a 532-535 nm e apresenta máximos de absorção secundários a 245 e 305 nm. A reação ocorre em meio ácido (pH 1-2) e em alta temperatura (100 °C), no sentido de aumentar a sua velocidade e sensibilidade (SILVA et al., 1999).

Aqueceram-se 17,6 mL até 30 °C, e adicionaram-se 1 mL de solução (1 g.mL<sup>-1</sup>) de ácido tricloroacético (Tedia, USA) e 2 mL de etanol 95% (v/v) (Vetec, Brasil). Agitou-se a solução por 10 s e a deixou repousando por 5 min. Em seguida, filtrou-se essa solução em filtro Whatman nº 1 (125 mm), e em 4 mL do filtrado foi adicionado 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (2-thiobarbituric acid, Spectrum), que foi preparada dissolvendo-se 1,4 g de ácido 2-tiobarbitúrico em etanol 95% para um volume final de 100 mL (para facilitar, pode-se aquecer em banho-maria a 60 °C). Colocou-se em banho-maria a 60 °C por 60 min. Em seguida, fizeram-se as leituras de absorbância a 532 nm em espectrofotômetro GBC modelo 918 UV-Vis, instalado no Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos

da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os resultados foram expressos em unidades de absorvância por unidade de peso da amostra.

### **4.3. Análise sensorial**

A avaliação da aceitabilidade sensorial do leite foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV. Os testes de aceitação do leite envasado nas quatro embalagens (1, 2, 3 e 4 descritas anteriormente) foram realizados com 1, 5, 9 e 13 dias de armazenamento. Aproximadamente 100 consumidores de leite avaliaram as amostras previamente codificadas com números de três dígitos, que foram servidas em uma mesma sessão. Em cada amostra servida, o provador recebeu um copo de água em temperatura ambiente para enxaguar a boca entre as avaliações.

Em cada tempo de análise experimental, os provadores avaliaram as amostras utilizando a escala hedônica de nove pontos (Figura 4), indicando quanto gostaram ou desgostaram das amostras de leite em relação ao sabor, aroma e impressão global.

Os dados foram submetidos à análise de regressão (tempo de armazenamento X atributo) e também analisados pela técnica de mapa de preferência interno, na qual se considera a resposta individual de cada consumidor e não apenas a média do grupo de consumidores que avaliaram o produto. Para obtenção do Mapa de Preferência Interno, os dados de aceitação foram organizados em uma matriz de amostras (em linhas) e consumidores (em colunas) e submetidos à Análise de Componentes Principais (ACP) (MINIM, 2006). Os dados obtidos na ACP foram dispostos em um gráfico de dispersão, representando as amostras (tratamentos) e os “loadings” (cargas), em relação aos dois primeiros componentes principais.

Nome: _____ Data: ____/____/____	
E-mail: _____ Sexo: ( )F ( )M	
Por favor, avalie a amostra de leite, utilizando a escala abaixo para descrever quanto você gostou ou desgostou de cada atributo (sabor, aroma e impressão global) do produto.	
<b>ESCALA HEDÔNICA</b>	<b>Código da amostra:</b> _____
<b>9</b> – gostei extremamente	Sabor: _____
<b>8</b> – gostei muito	Aroma: _____
	Impressão Global: _____
	<b>Código da amostra:</b> _____
<b>7</b> – gostei moderadamente	Sabor: _____
<b>6</b> – gostei ligeiramente	Aroma: _____
	Impressão Global: _____
	<b>Código da amostra:</b> _____
<b>5</b> – nem gostei nem desgostei	Sabor: _____
<b>4</b> – desgostei ligeiramente	Aroma: _____
<b>3</b> – desgostei moderadamente	Impressão Global: _____
	<b>Código da amostra:</b> _____
<b>2</b> – desgostei muito	Sabor: _____
<b>1</b> – desgostei extremamente	Aroma: _____
	Impressão Global: _____
Comentários:	

Figura 4 – Ficha do teste de aceitação utilizada na avaliação do sabor, aroma e impressão global de leite, com o auxílio de uma escala hedônica de nove pontos.

## 5. DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

Utilizou-se o delineamento estatístico em parcelas subdividas, em que os níveis de um fator (leite pasteurizado) foram aplicados ao acaso nas parcelas (embalagens), que por sua vez foram subdividas nas subparcelas (tempo). Os tratamentos aplicados às parcelas foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado. O modelo estatístico pode ser representado por:

$$X_{ij} = m + E_i + e_{ij} + T_k + (ET)_{ik} + e_{ijk}$$

em que:

$X_{ij}$  = valor observado na resposta (variável dependente), na unidade experimental referente ao nível  $i$  de  $E$  e  $j$  de  $T$ ;

$m$  = a média geral;

$E_i$  = efeito da embalagem no nível  $i$  (parcela);

$e_{ij}$  = erro aleatório associado à parcela, pressuposto normal e independentemente distribuído, com média zero e variância constante  $\sigma^2$ ;

$T_k$  = efeito do tempo no nível  $k$  (subparcela);

$(ET)_{ik}$  = efeito da interação Embalagem X Tempo; e

$e_{ijk}$  = erro aleatório associado à subparcela, pressuposto normal e independentemente distribuído, com média zero e variância constante  $\sigma^2$ .

Os dados foram submetidos à análise de variância, e, quando houve diferença significativa entre as variáveis estudadas, realizou-se o teste de médias (teste de Tukey). Ajustaram-se curvas de regressão nas variáveis que tinham interação significativa com o tempo. Consideraram-se 5% de probabilidade.

Foram empregados procedimentos do sistema estatístico SAS (Statistical Analysis System – SAS Institute Inc., North Carolina, USA), versão 9.1, licenciado para uso pela Universidade Federal de Viçosa, 2008.



## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Transmissão de luz

A medida de absorbância indica que, quanto maior o seu valor, menor a ação do feixe de luz no alimento. Dessa forma, quando toda a luz é absorvida, a transmitância percentual é zero.

Os valores de transmitância das quatro embalagens são apresentados na Tabela 3. As embalagens 1 e 3 mostraram transmitância percentual igual a zero na faixa de comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 250 a 780 nm. Isso indica que esses materiais bloqueiam os efeitos da luz nessa faixa de comprimento de onda, o que inclui a faixa de degradação da riboflavina (400 – 500 nm). Dessa forma, esses materiais são indicados para utilização como barreira contra a fotodegradação de riboflavina e outras vitaminas ou compostos que são degradados pela luz nos comprimentos de onda visível e UV.

A embalagem 2 bloqueia os efeitos da luz apenas na faixa de 250 – 400 nm, sendo na faixa de degradação da riboflavina o percentual de transmitância da luz cerca de 75%. Porém, esse valor é menor que o encontrado na embalagem 4 (aproximadamente 100% de transmitância), que não bloqueia a luz na faixa de 250 a 780 nm. Dessa forma, a embalagem 4 não seria recomendada para produtos sensíveis à luz nos comprimentos de onda de 250 a 780 nm.

Tabela 3 – Transmitância percentual em quatro embalagens na faixa de comprimento de onda de 250 a 780 nm: Polietileno (PE) SCLAIRFILM – 90E0323W7 (1); PE SCLAIRFILM – 90B0324PW (2); PE SCLAIRFILM – 80E0337W7 (3); e PE monocamada (4)

Embalagem	Faixa de Comprimento de Onda (nm)		
	250 – 400	400 – 500	500 – 780
1	0	0	0
2	0	0 – 75%	75 – 88%
3	0	0	0
4	25 – 90%	90 – 99%	99%

## 6.2. Teste de permeabilidade ao oxigênio

A barreira a gases das embalagens é medida pela quantidade de gás que passa através de uma unidade de área superficial do material de embalagem por unidade de tempo, ou seja, taxa de permeabilidade a gases, a determinada temperatura e sob certo gradiente de pressão parcial do gás de teste e espessura do filme. Utilizou-se a unidade  $\text{cm}^3$  de gás (CNTP)/( $\text{m}^2 \cdot \text{dia}$ ).

Houve diferença ( $P < 0,05$ ) na taxa de permeabilidade ao oxigênio (TPO) em cada embalagem (Tabela 4).

Tabela 4 – Taxa de permeabilidade ao oxigênio (TPO) das embalagens: Polietileno (PE) SCLAIRFILM – 90E0323W7; PE SCLAIRFILM – 90B0324PW (2); PE SCLAIRFILM – 80E0337W7 (3); e PE monocamada (4)

Embalagens	TPO ( $\text{cm}^3/\text{m}^2 \cdot \text{dia}$ )*
1	0,3110 <sup>b</sup>
2	0,2336 <sup>b</sup>
3	20,807 <sup>a</sup>
4	21,618 <sup>a</sup>

\*Valores na coluna seguidos por letras diferentes são significantemente diferentes ( $P < 0,05$ ).

A maior taxa foi observada na embalagem 4, o que indica que esse material expõe o alimento à autooxidação mais que os outros materiais. A embalagem 3 também apresentou alta taxa de permeabilidade, e isso pode afetar o teor nutricional dos alimentos que ela acondiciona, mesmo sendo um filme de alta barreira à luz.

Segundo Mergem (2004), a área, a espessura e as características moleculares do polímero são as principais variáveis do material de embalagem relacionadas à quantidade de gases que permeiam o filme. A taxa de permeabilidade é proporcional à área exposta à permeação e, em geral, inversamente proporcional à espessura. A área dos corpos de prova foi a mesma, porém a espessura do filme 4 é menor. Isso pode estar relacionado com seu alto valor de permeabilidade, o que não se aplica ao filme 3, que possui espessura próxima à dos filmes 1 e 2, todavia a permeabilidade destes foi muito menor. Provavelmente, as características moleculares do filme 3, como densidade e grau de compactação dos polímeros que o compõem, são diferentes daqueles que têm a mesma espessura.

### **6.3. Análise mecânica dos filmes**

As propriedades de tração dos filmes analisados estão listadas na Tabela 5. Tais características são úteis na identificação e caracterização de filmes flexíveis, considerando-se o desempenho mecânico esperado, e no controle de qualidade desses materiais.

As variáveis testadas foram afetadas ( $P < 0,05$ ) pelo aumento de camadas nos filmes.

O filme monocamada exigiu força menor antes de se romper, o que é caracterizado pelo menor valor de carga máxima. Isso demonstra que esse filme é menos resistente e menos elástico do que os demais quando submetido à tração.

Apesar de as três amostras multicamadas apresentarem o mesmo valor de carga máxima, o filme 2 (PE Branco) teve menor deformação relativa na carga máxima e extensão na quebra, caracterizando-se, assim, como um filme mais forte que os outros.

Tabela 5 – Propriedades de tração e elasticidade das embalagens: Polietileno (PE) SCLAIRFILM – 90E0323W7; PE SCLAIRFILM – 90B0324PW (2); PE SCLAIRFILM – 80E0337W7 (3); e PE monocamada (4)

Embalagens	Carga Máxima (N)	Deformação Relativa na Carga Máxima (%)
1	43,250 <sup>a</sup>	946,6 <sup>a</sup>
2	45,256 <sup>a</sup>	792,85 <sup>b</sup>
3	42,392 <sup>a</sup>	1001,18 <sup>a</sup>
4	27,468 <sup>b</sup>	1025,56 <sup>a</sup>

\*Valores na coluna seguidos por letras diferentes são diferentes ( $P < 0,05$ ) entre si, pelo teste de Tukey.

<sup>1</sup> Ponto de escoamento – ponto a partir do qual é possível alongar o material sem que este responda a um aumento de resistência.

#### 6.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram analisadas por MEV as superfícies dos filmes para identificar possíveis diferenças topográficas e morfológicas.

As imagens dos cortes transversais (Figura 5), com aumento de 500 vezes, permitiram observar que há diferenciação dos filmes 1, 2 e 3, em duas camadas, o que não acontece com filme monocamada. As imagens mostram que todas as embalagens multicamadas foram compostas por dois filmes, com espessuras determinadas.

#### 6.5. Microscopia eletrônica de força atômica

Nas Figuras 6 e 7 são apresentadas as imagens tridimensionais das superfícies internas dos filmes testados, obtidas no microscópio de varredura por sonda. Os pontos brancos caracterizam-se por elevações e os pontos mais escuros, por depressões, conforme escala ao lado de cada figura.

O filme 4 (PE monocamada) apresentou a maior média de rugosidade, como se pode observar nos valores de Ra e Rq da Tabela 6. E o filme 1 (PE SCLAIRFILM – 90E0323W7) mostrou a menor rugosidade, sendo o aumento de rugosidade do filme 4 em relação aos demais de 250 a 500%. Dessa forma, pode-se dizer que as superfícies dos filmes multicamadas são relativamente planas.

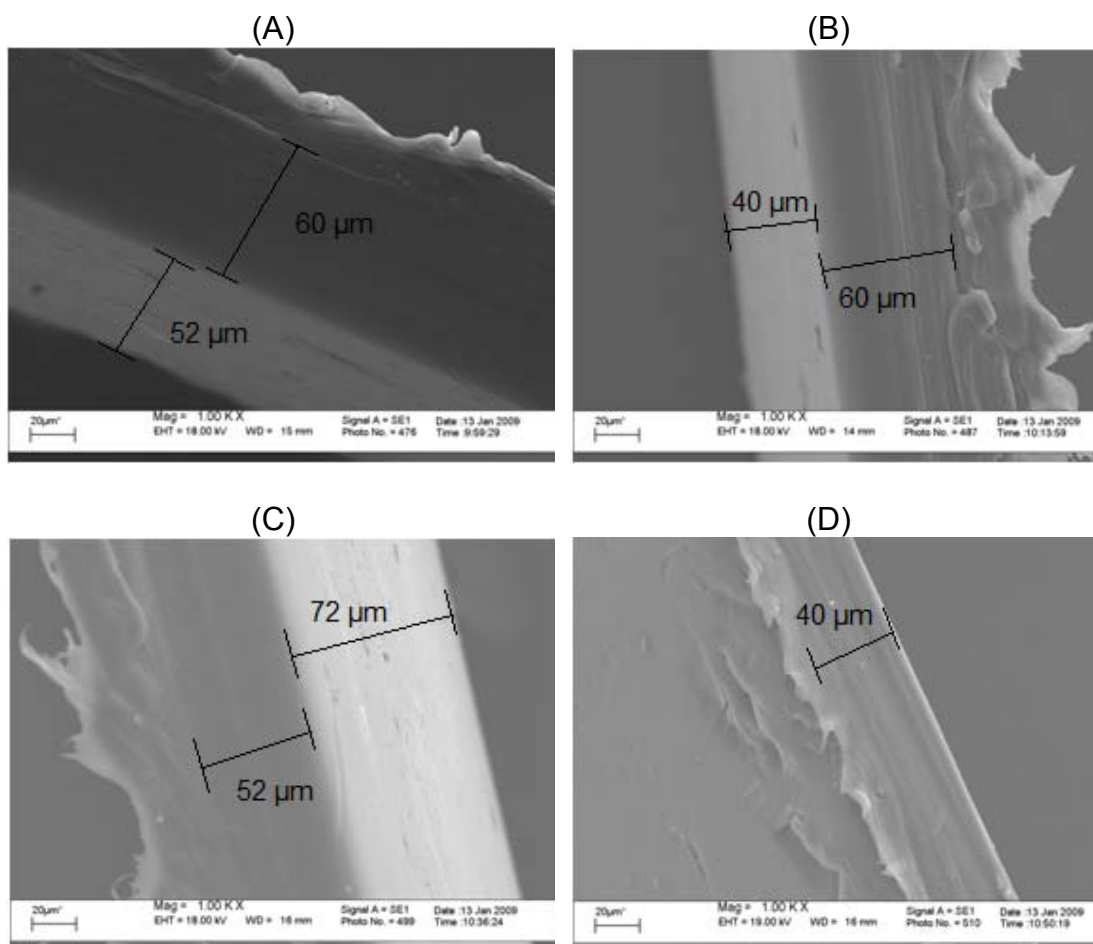


Figura 5 – Imagens por microscopia eletrônica de varredura de cortes transversais de quatro embalagens multicamadas: (A) Polietileno (PE) SCLAIRFILM – 90E0323W; (B) PE SCLAIRFILM – 90B0324PW; (C) PE SCLAIRFILM – 80E0337W7; e (D) PE monocamada.

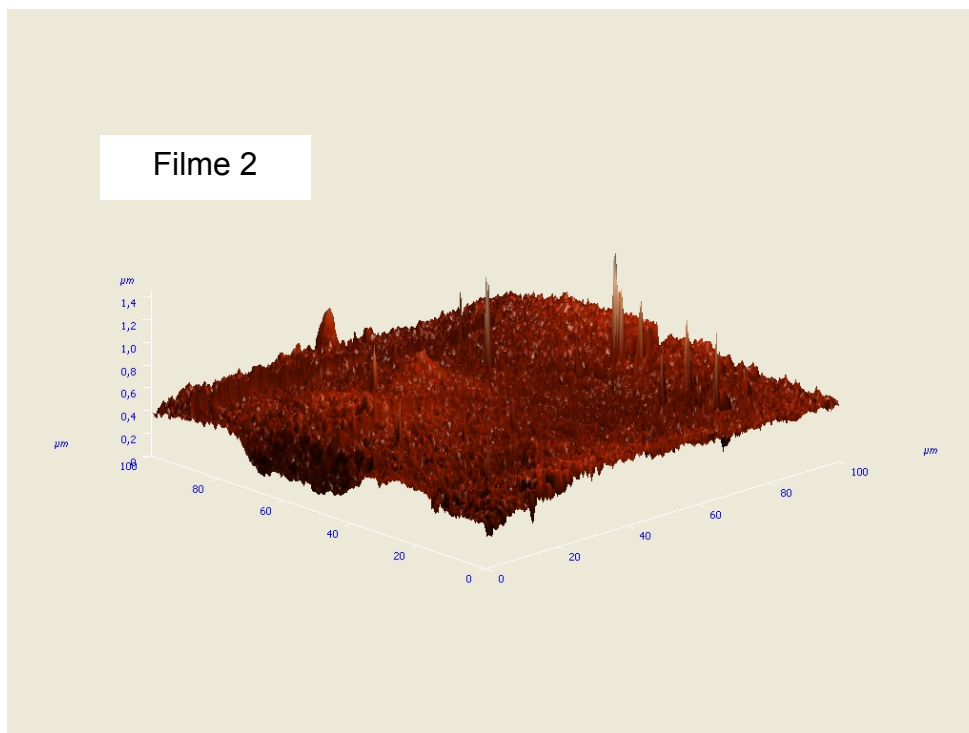
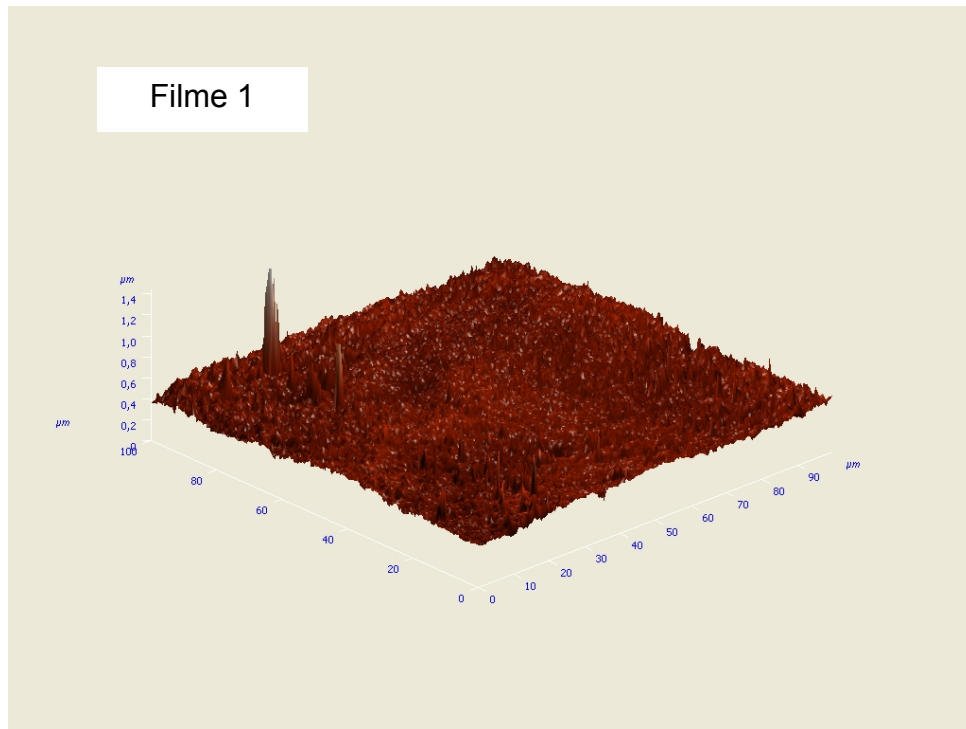


Figura 6 – Fotomicrografia tridimensional da superfície ( $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ ) dos filmes 1 (Polietileno (PE) SCLAIRFILM – 90E0323W7) e 2 (PE SCLAIRFILM – 90B0324PW).

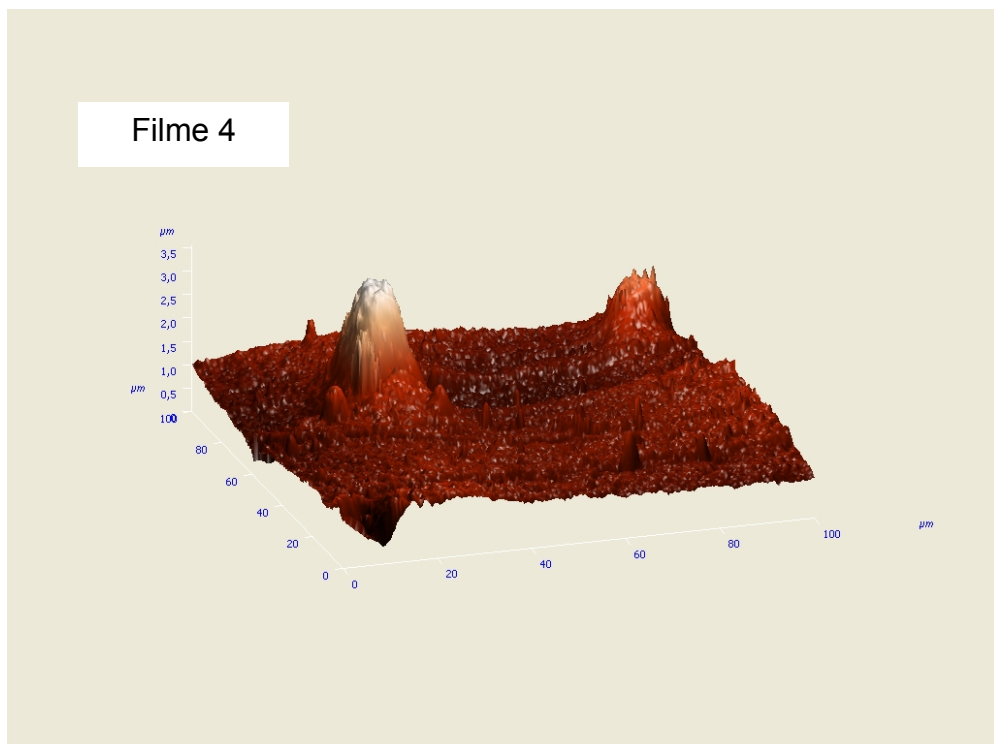
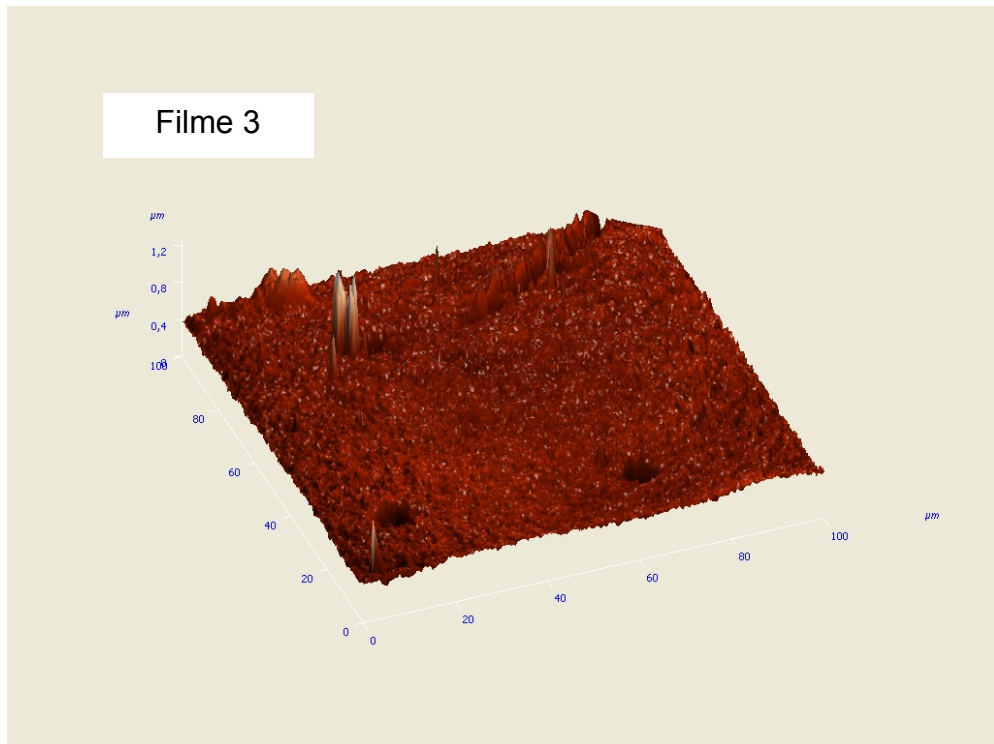


Figura 7 – Fotomicrografia tridimensional da superfície ( $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ ) dos filmes 3 (PE SCLAIRFILM – 80E0337W7) e 4 (PE monocamada).

Tabela 6 – Rugosidade média (Ra), média da raiz quadrada das rugosidades (Rq) e média dos pontos mais irregulares (Rz) dos filmes 1 (Polietileno (PE) SCLAIRFILM – 90E0323W7), 2 (PE SCLAIRFILM – 90B0324PW), 3 (PE SCLAIRFILM – 80E0337W7) e 4 (PE monocamada), obtidas por microscopia de varredura por sonda

Embalagens	Ra (nm)	Rq (nm)	Rz (nm)
1	34,9029	48,1949	712,588
2	60,2530	80,8400	690,177
3	36,0501	56,7647	625,310
4	213,067	348,638	1781,57

Esses valores de rugosidade indicam que o filme 4 apresenta superfície mais propícia ao alojamento e adesão de bactérias. Além disso, as imperfeições da superfície podem proteger os microrganismos do contato direto com radiação UV, nos tratamentos de sanitização da embalagem, reduzindo, assim, a eficiência do tratamento e, conseqüentemente, a vida de prateleira do produto embalado.

Com relação às médias dos picos mais altos e mais baixos (Rz) das superfícies, o filme 4 também apresentou maior valor, o que indica que os vales e picos encontrados possuem valores mais altos que os dos demais filmes. Essa característica indica regiões de difícil acesso que podem reduzir a eficiência do procedimento de sanitização da embalagem.

## 6.6. Estudo da hidrofobicidade dos filmes

As superfícies foram consideradas hidrofóbicas por apresentarem variação de energia livre de Gibbs (Tabela 7) menor que zero ( $\Delta G_{sas}^{TOT} < 0$ ), sendo a superfície da embalagem 4 mais hidrofóbica ( $- 82,217 \text{ mJ.m}^{-2}$ ) do que as demais. A hidrofobicidade do polietileno é explicada pela sua composição, ou seja, em virtude da presença de longas cadeias de hidrocarbonetos em sua estrutura.

A adesão é uma condição indispensável na formação de biofilmes e torna-se um fator de proteção da bactéria ligada, que interfere na ação de bactericidas. Os estudos sobre adesão microbiana indicam que vários fatores influenciam o processo, sendo a interação termodinâmica um deles.



Tabela 7 – Valores dos ângulos de contato ( $\theta$ ) da superfície das embalagens 1 (Polietileno (PE) SCLAIRFILM – 90E0323W7), 2 (PE SCLAIRFILM – 90B0324PW), 3 (PE SCLAIRFILM – 80E0337W7) e 4 (PE monocamada) com líquidos padrões e da energia livre global de interação ( $\Delta G_{sas}^{TOT}$ )

Amostras	$\theta_W^*$	$\theta_F^{**}$	$\theta_B^{***}$	$\Delta G_{sas}^{TOT}$ (mJ/m <sup>2</sup> )
1	96,5 ± 0,25	85,68 ± 0,35	40,2 ± 0,33	-76,971
2	91,6 ± 0,42	77,92 ± 0,30	33,17 ± 0,63	-74,096
3	96,6 ± 0,41	81,72 ± 0,38	31,0 ± 0,58	-72,003
4	98,7 ± 0,32	73,45 ± 0,55	29,7 ± 0,50	-82,217

\* $\theta_W$  = ângulo de contato da superfície com água.

\*\* $\theta_W$  = ângulo de contato da superfície com formamida.

\*\*\* $\theta_W$  = ângulo de contato da superfície com bromonaftaleno.

Na Tabela 8 é apresentada a caracterização geral das embalagens, com base nos resultados obtidos durante a caracterização delas.

Tabela 8 – Características dos filmes utilizados neste experimento

Embalagens	Caracterização Geral
1	Alta barreira ao oxigênio e à luz; rígido; resistente a tração
2	Alta barreira ao oxigênio; baixa barreira à luz; muito resistente a tração; muito rígido
3	Baixa barreira ao oxigênio; alta barreira à luz; baixa resistência a tração; baixa rigidez
4	Baixa barreira ao oxigênio; muito baixa barreira à luz; baixa resistência a tração; baixa rigidez

## 6.7. Qualidade inicial do leite

Os resultados das análises do leite cru e do leite logo após a pasteurização são apresentados na Tabela 9. O leite utilizado tinha alta qualidade tanto físico-química quanto microbiológica, em conformidade com os padrões de identidade e qualidade estabelecidos pela legislação brasileira (Tabela 1).

Tabela 9 – Características físico-químicas e microbiológicas do leite utilizado deste experimento, antes e logo depois da pasteurização

	Leite Cru		Leite Pasteurizado	
	Média	Desvio- Padrão	Média	Desvio- Padrão
Crioscopia (°H)	-0,538	0,003	-0,532	0,003
Gordura (%)	3,57	0,160	2,95	0,265
Acidez (g ácido láctico. 100 mL <sup>-1</sup> )	NR*	NR	0,15	0,005
Extrato seco (%)	11,64	0,630	10,0316	1,554
Densidade (g.L <sup>-1</sup> )	1031,7	0,420	1031,5	0,808
Proteína total (%)	3,28	0,025	3,27	0,031
Teor de riboflavina (mg.L <sup>-1</sup> )	1,26	0,046	1,37	0,050
Contagem padrão em placas (UFC.mL <sup>-1</sup> )	5,0 x 10 <sup>5</sup>	0,343	3,0 x 10 <sup>3</sup>	0,062
Coliformes (NMP. mL <sup>-1</sup> ) (30/35 °C)	NR	-	3	-
Coliformes (NMP.mL <sup>-1</sup> ) (45 °C)	NR	-	< 3	-
<i>Salmonella</i> sp./25 mL	NR	-	Ausência	-

\* NR = não realizado.

A qualidade do ar do ambiente de envase foi avaliada por sedimentação de microrganismos do ar em meio PCA, sendo a contagem de mesófilos aeróbios média de  $1,46 \times 10^2$  UFC.semana<sup>-1</sup>.cm<sup>-2</sup>. Isso indica um ambiente inadequado para a manipulação de alimentos, pois conforme a recomendação da APHA deveria ser 30 UFC.semana<sup>-1</sup>.cm<sup>-2</sup>. Essa é uma constatação comum em estudos de ambientes de processamento de alimentos (TROLLER; BUSSE, 1993; SIQUEIRA JÚNIOR et al., 2005; MARTINS et al., 2006).

Esse fato pode levar a uma diminuição da vida de prateleira e qualidade do leite envasado. Ren e Frank (1992), analisando microrganismos no ar de várias plantas de fabricação de leite e de sorvete, constataram que as principais vias de contaminação do leite, através do ar, incluem a sala de envase ou o enchimento de embalagens, através do ar da embalagem.

Dessa forma, como garantia de qualidade do produto final, faz-se necessária a aplicação da tecnologia de salas limpas, ou seja, maior controle da concentração de partículas presentes no ar do ambiente de processamento, que deve ser construído de forma a minimizar a introdução, geração e retenção de partículas dentro da sala e que permita, ainda, o controle de fluxos de ar, temperatura, umidade, pressão, vibração, ruído, microrganismos vivos e iluminação.

## **6.8. Testes ao longo da vida de prateleira**

### **6.8.1. Testes microbiológicos**

Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre as embalagens quanto à contagem microbiana (mesófilos e psicotróficos), durante a vida de prateleira do leite. A embalagem com multicamadas representa barreira, entre outras coisas, à entrada de oxigênio (que pode aumentar o crescimento microbiano) ou de outros contaminantes, podendo, assim, aumentar a vida de prateleira dos produtos. Porém, na temperatura de armazenamento de 5 °C, por 21 dias, as embalagens multicamadas não afetaram o crescimento de microrganismos mesófilos estritos e facultativos e, portanto, não influenciaram a vida de prateleira do leite quando comparadas com a embalagem monocamada tradicionalmente utilizada. Resultado semelhante foi apresentado por Moyssiadi et al. (2004), que não observaram diferença no crescimento de mesófilos no leite, ao longo da vida de prateleira, entre as embalagens testadas (polietileno de alta densidade (PEAD) pigmentadas (mono e multicamada) e polietileno tereftalato (PET) transparente e pigmentado). Da mesma forma, Vassila et al. (2002), que testaram a ação de diferentes barreiras de PEBD (mono e multicamadas, pigmentadas e transparentes) sobre as características microbiológicas do leite, não observaram diferença na contagem de mesófilos e de psicotróficos nos leites em todas as embalagens testadas, mas apenas entre os tempos de análise.

As estimativas da contagem-padrão em placas de microrganismos mesófilos aeróbios em função do tempo de armazenamento do leite (Figura 8), a partir da média das quatro embalagens, evidenciam contagem de mesófilos aeróbios estritos e facultativos acima dos requisitos mínimos de qualidade descritos em Brasil (2002) após 12 dias de armazenamento. Porém, com base no limite máximo de  $10^6$  a  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, apresentado pelo IDF (1986), o leite manteve suas características de qualidade até os 21 dias. Walstra et al. (2001) expuseram que as modificações devidas ao crescimento de bactérias no leite geralmente não são perceptíveis até que atinja uma contagem de  $5 - 20 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>, dependendo das espécies bacterianas.

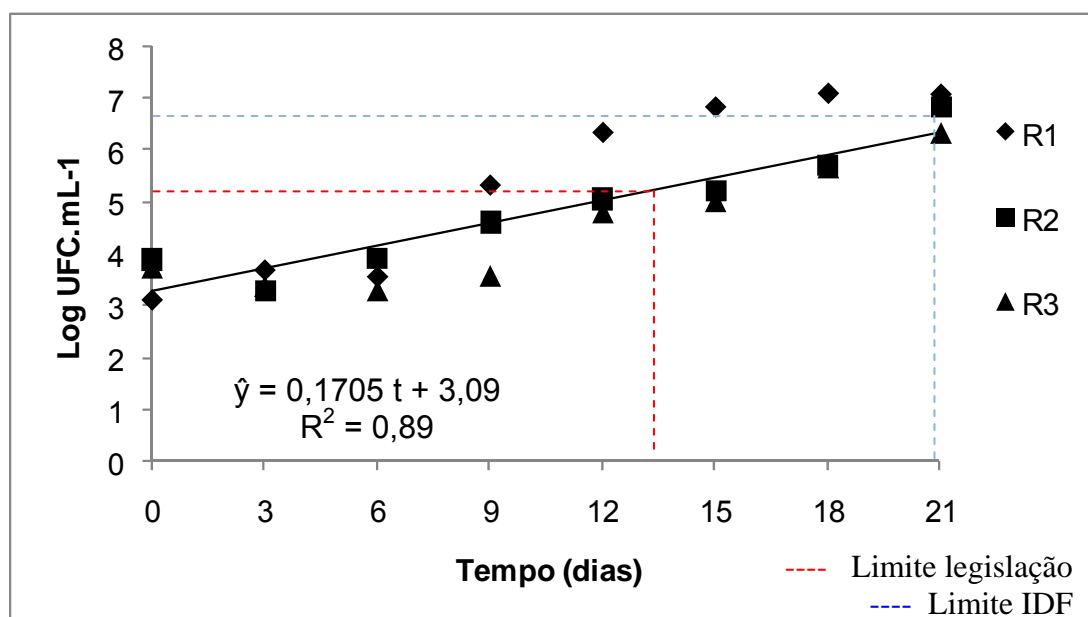


Figura 8 – Estimativa da contagem de mesófilos aeróbios estritos e facultativos (log UFC.mL<sup>-1</sup>) em leite pasteurizado e estocado a 5 °C. Valores obtidos pela média da contagem por embalagem nas três repetições realizadas (R1, R2 e R3).

Na Figura 9 é apresentada a estimativa da contagem de psicrotróficos no leite em função do tempo de estocagem das quatro embalagens. Aos 12

dias de armazenamento, a contagem aumentou cerca de três ciclos log. Ao final do estudo, com 21 dias de estocagem a 5 °C a microbiota psicotrófica estava na faixa de  $10^6 - 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Segundo Walstra et al. (2001), no leite pasteurizado os defeitos de *flavor* só aparecem em contagens acima de  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> de psicotróficos.

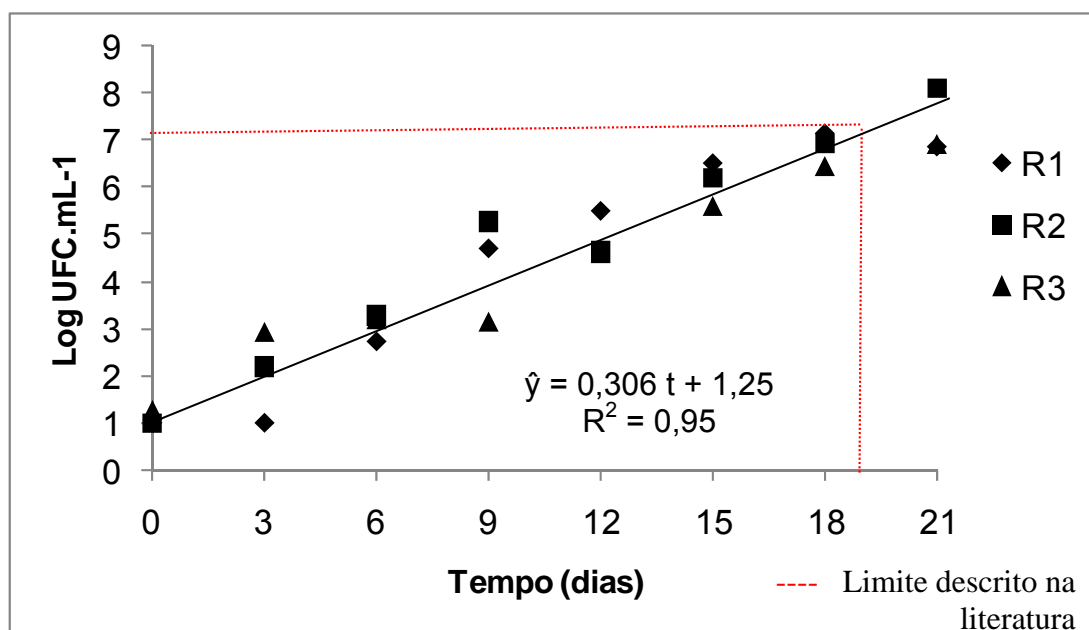


Figura 9 – Estimativa da contagem de psicotróficos (log UFC.mL<sup>-1</sup>) em leite pasteurizado e estocado a 5 °C. Valores obtidos pela média da contagem por embalagem nas três repetições realizadas (R1, R2 e R3).

### 6.8.2. Análises físico-químicas – pH e Acidez

Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) da acidez e do pH do leite pasteurizado entre as diferentes embalagens, porém houve variação ( $P < 0,05$ ) apenas com o tempo, conforme apresentado nas Figuras 10 e 11. As equações lineares ajustadas foram  $\hat{y} = 0,0022 t + 0,14$  e  $\hat{y} = 0,0084 t + 6,74$  para acidez e pH do leite, respectivamente.

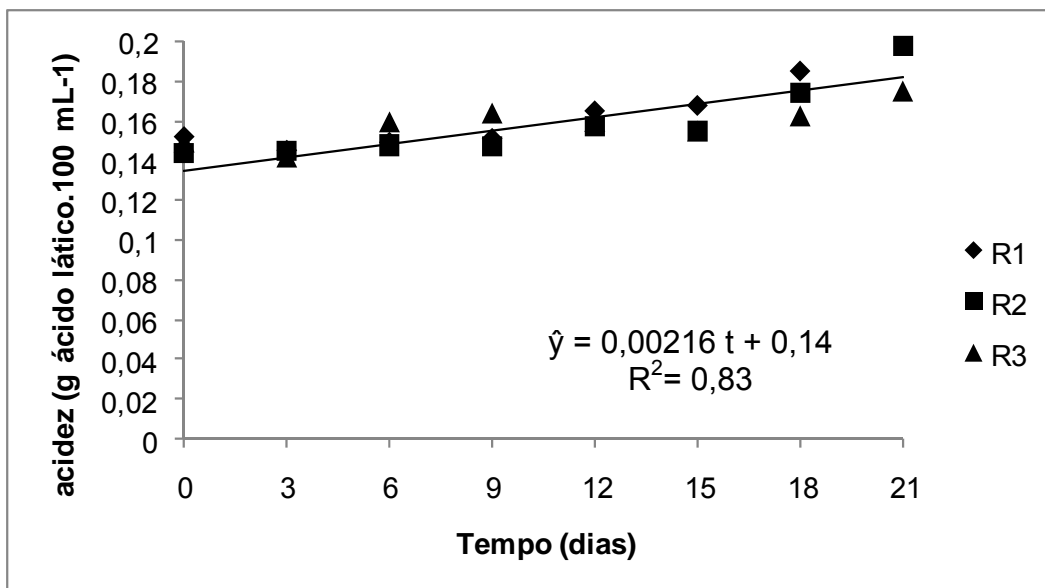


Figura 10 – Estimativa da acidez (g ácido láctico.100 mL<sup>-1</sup>) em leite pasteurizado e estocado a 5 °C. Valores obtidos pela média da acidez do leite por embalagem nas três repetições realizadas (R1, R2 e R3).

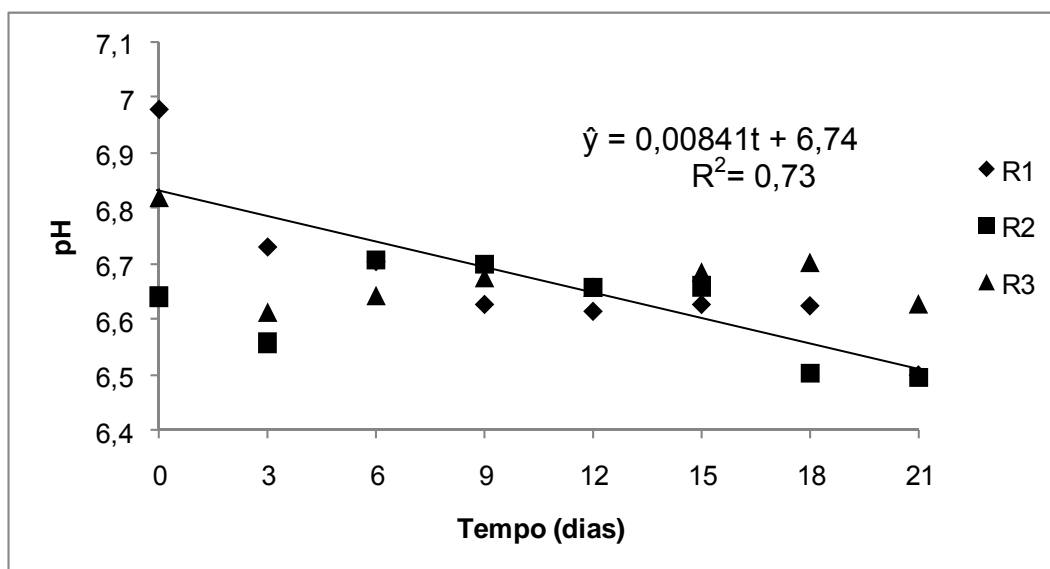


Figura 11 – Estimativa de pH do leite pasteurizado e estocado a 5 °C. Valores obtidos pela média de pH do leite por embalagem nas três repetições realizadas (R1, R2 e R3).

### 6.8.3. Análises físico-químicas – Oxidação de lipídios e degradação de vitamina (riboflavina)

A oxidação de lipídios e o teor de vitaminas não diferiram ( $P > 0,05$ ) durante o tempo de armazenamento, nem entre as diferentes embalagens. A média de oxidação encontrada em unidades de densidade ótica a 532 nm foi  $0,055 \pm 0,015$  para os leites testados. E o teor médio de riboflavina no leite testado foi de  $1,37 \pm 0,08 \text{ mg.L}^{-1}$ . Gebhardt e Thomas (2002) citaram que o valor médio de riboflavina para leite integral é de  $1,6 \text{ mg.L}^{-1}$ .

A Figura 12 mostra o perfil cromatográfico típico do padrão e de uma amostra analisada neste trabalho. As condições cromatográficas utilizadas permitiram boa resolução da riboflavina, o que permitiu sua quantificação segura nas amostras. O tempo de retenção foi de aproximadamente 25 min.

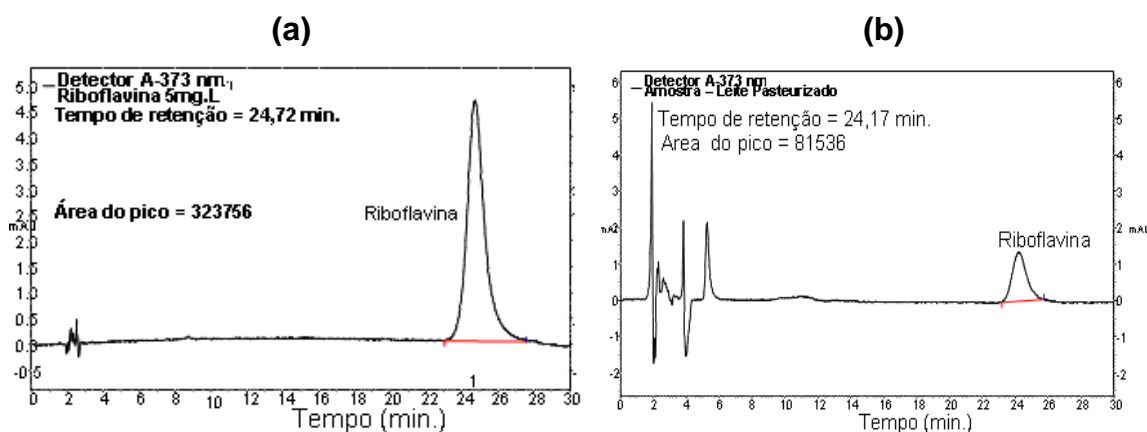


Figura 12 – Análise por CLAE de riboflavina em leite pasteurizado. Cromatogramas obtidos no modo isocrático de solução-padrão (a) e de uma amostra de leite (b). Coluna Merck Lichrospher 100 RP-18  $5 \mu\text{m}$ ,  $250 \times 4.00 \text{ mm}$ ; fluxo  $1 \text{ mL.min}^{-1}$ ; volume de injeção de  $50 \mu\text{L}$ . Fase móvel: 5 mM sal heptanossulfônico, 0,5% trietilamina, 2,4% ácido acético glacial e 15% de metanol. Detector de arranjo de diodos e leitura dos cromatogramas a 373 nm.

Ao contrário do esperado, a oxidação de lipídios não aumentou ( $P > 0,05$ ) com o passar do tempo e também não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre as embalagens, mesmo cada uma apresentando diferentes barreiras,

tanto ao oxigênio quanto à luz. Moyssadi et al. (2004) fizeram um teste com embalagens de polietileno de alta densidade (PEAD) pigmentadas (mono e multicamada) e PET (transparente e branco) e mostraram que a oxidação lipídica foi maior na embalagem PET transparente com relação às demais, e eles indicaram que o efeito da luz foi primordial para isso. Outra observação foi que o grau de oxidação se apresentou maior no leite das embalagens PET do que nas embalagens de PEAD e explicaram esse fenômeno devido à maior espessura dessas últimas. Cladman et al. (1998) também observaram o aumento do grau de oxidação de lipídios de leite integral durante o tempo de armazenagem. Eles observaram, ainda, que houve diferença na degradação conforme diferenciava a embalagem do leite (garrafas de PET transparente e verde, saquinhos de PEBD e garrafas de PEAD), e aos 14 dias de armazenamento o menor nível de oxidação era da embalagem PET com pigmento verde.

Os fenômenos de oxidação dos lipídios dependem de mecanismos reacionais diversos e extremamente complexos, os quais estão relacionados com o tipo de estrutura lipídica e o meio onde esta se encontra. O número e natureza das insaturações presentes, o tipo de interface entre os lipídios e o oxigênio (fase lipídica contínua, dispersa ou em emulsão), a exposição à luz e ao calor e a presença de antioxidantes são fatores determinantes da estabilidade oxidativa dos lipídios (SILVA et al., 1999). O leite possui antioxidantes naturais, como tocoferóis, proteínas lácteas, carotenoides e enzimas com atividades antioxidantes, lactoperoxidase, por exemplo (SCHLIMME; BUCHHEIM, 2002).

As embalagens que bloqueiam a luz, no comprimento de onda que causa degradação de vitaminas (400 – 500 nm), não protegeram o leite mais que as outras embalagens, e não houve redução ( $P < 0,05$ ) no teor de riboflavina em nenhum dos tratamentos, sendo no início encontrado cerca de  $1,24 \text{ mg.L}^{-1}$  e ao final, cerca de  $1,37 \text{ mg.L}^{-1}$ . Moyssiadi et al. (2004) observaram que as embalagens pigmentadas protegeram mais a riboflavina do leite do que as embalagens transparentes. Vassila et al. (2002) citaram que, após sete dias de armazenagem, houve perda na faixa de 18,8% a 21,1% de riboflavina em leite embalado em filmes multicamadas pigmentados com  $\text{TiO}_2$  e carbono preto, enquanto em filmes multicamadas pigmentados apenas com  $\text{TiO}_2$  e multicamada transparente a perda foi de 34,4% e 36,7%, respectivamente. Já nos filmes monocamadas pigmentados



com  $\text{TiO}_2$  a perda de riboflavina no sétimo dia da vida de prateleira foi de 42,2%, valor muito próximo do encontrado no filme monocamada transparente (45,3%).

O componente apresentou boa linearidade nas faixas de concentrações utilizadas, e de modo geral encontrou-se boa porcentagem de recuperação para os componentes analisados, o que aumenta as chances de perdas reduzidas durante o processo de extração e análise e garante confiabilidade aos métodos utilizados.

Para o leite pasteurizado, a recuperação média (três repetições) de riboflavina foi de 111,78%.

## **6.9. Análise sensorial**

Os dados da aceitação em relação ao sabor, aroma e impressão global foram analisados estatisticamente por meio de análise de regressão, utilizando-se as médias dos provadores para cada atributo em cada tempo de análise. Os dados foram analisados também, no primeiro e último dias de análise, pela técnica de Mapa de Preferência considerando a resposta individual de cada consumidor e não apenas a média do grupo de consumidores que avaliaram o produto.

Os dados de aceitação quanto aos atributos testados não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre as embalagens ao longo do tempo. Isso indica que as alterações no aroma, sabor e impressão global do leite com o passar do tempo não influenciaram a sua aceitação pelos consumidores e também que não houve diferença na aceitação do leite devido às diferentes embalagens (Figura13). A média das notas dos provadores das amostras ao longo do tempo foi 6,3, que corresponde aos termos hedônicos “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”.

Na Figura 14, cada ponto em preto representa as correlações entre os dados de aceitação de um consumidor e os dois primeiros componentes principais (obtidos pela análise multivariada de mapa de preferência), e, dessa forma, cada ponto preto está associado a um provador. As figuras geométricas coloridas se referem às diferentes embalagens. Na análise por Mapa de Preferência, a distribuição dos consumidores demonstrou que a aceitação foi bastante homogênea ao longo do período de armazenamento, confirmando que não houve definição de aceitação por nenhuma amostra específica.

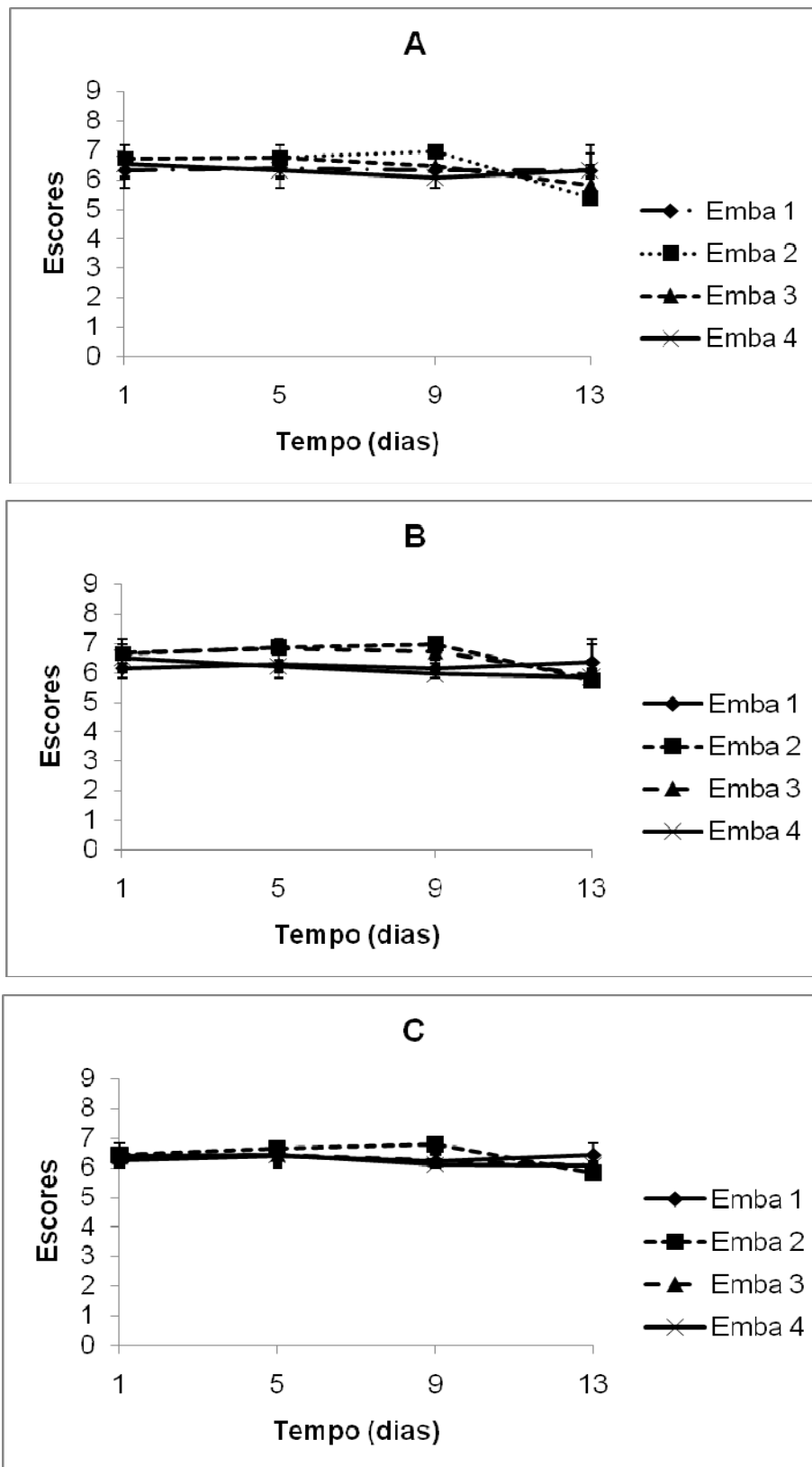
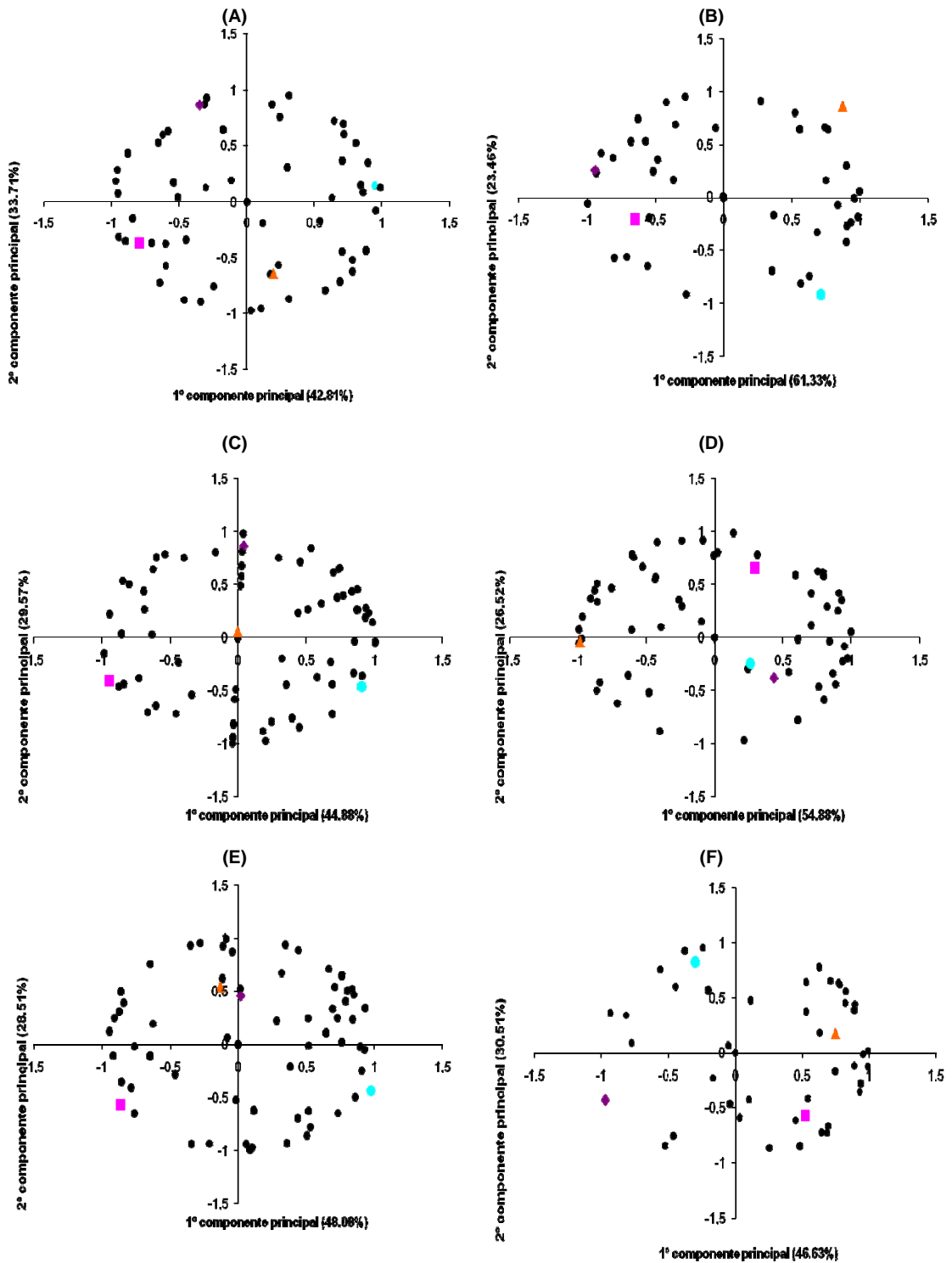


Figura 13 – Médias dos escores de aceitação dos provadores de leite pasteurizado, ao longo de sua vida de prateleira. (A) Impressão Global; (B) Sabor; e (C) Aroma. As barras de erros representam o desvio-padrão.



\* Pontos pretos estão associado a cada provador.

Pontos coloridos correspondem às embalagens: embalagem 1 (●), embalagem 2 (■), embalagem 3 (▲) e embalagem 4 (◆).

Figura 14 – Mapa de Preferência Interno dos atributos aroma, sabor e impressão global para leite envasado em quatro embalagens e armazenado durante 1 dia e 13 dias: Gráficos A (Aroma - 1 dia de armazenamento), B (Aroma - 13 dias de armazenamento), C (Sabor - 1 dia de armazenamento), D (Sabor - 13 dias de armazenamento), E (Impressão Global - 1 dia de armazenamento) e F (Impressão Global - 13 dias de armazenamento).

## 7. CONCLUSÃO

A avaliação das quatro embalagens flexíveis para aplicação em leite pasteurizado permitiu concluir, com base nas propriedades mecânicas e na permeabilidade ao oxigênio e barreira à luz das embalagens, que os filmes multicamadas 1, 2 e 3 apresentaram características favoráveis à sua aplicação em leite de consumo, podendo, inclusive, ser utilizadas como ferramenta para aumentar a sua vida de prateleira:

- As embalagem 1 e 3 apresentaram alta barreira à luz.
- As embalagens 1 e 2 proporcionaram alta barreira ao oxigênio e apresentam também alta resistência à tração e rigidez.
- Os materiais das embalagens 3 e 4 apresentaram baixa rigidez e resistência à tração.
- Os filmes 1, 2 e 3 possuem superfícies com baixa rugosidade e hidrofobicidade.

A vida de prateleira do leite pode ser determinada por fatores microbiológicos, físico-químicos, sensoriais ou nutricionais. Após a avaliação desses fatores em leite pasteurizado ao longo de sua vida de prateleira e a interferência das quatro embalagens, concluiu-se que as embalagens não afetaram ( $P > 0,05$ ) a contagem de mesófilos e psicrotróficos, a acidez e o pH do leite durante sua estocagem, de maneira que o fim da vida de prateleira, com relação à contagem de mesófilos, incidiu aos 12 dias e 18 dias com relação à contagem de psicrotróficos. Quanto à acidez e ao pH, o

término da vida de prateleira ocorreu aos 18 dias de armazenamento, quando atingiu o limite máximo em que é considerado, pela legislação brasileira, um leite de qualidade, igual a 0,18%. As barreiras oferecidas pelas embalagens também apresentaram efeitos semelhantes no teor nutricional do leite pasteurizado armazenado a 5 °C, por 21 dias, pois não houve variação ( $P > 0,05$ ) no teor de riboflavina e nem oxidação de lipídios induzida pelo oxigênio. A aceitabilidade sensorial também não variou, sendo a média das notas dos provadores das amostras ao longo do tempo igual a 6,3, que está situado entre os termos hedônicos “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”.

Todos os materiais de embalagens avaliados podem prover proteção suficiente à qualidade do leite pasteurizado, e se observadas as condições de qualidade da matéria-prima e considerada a integridade da cadeia de frio, de maneira que garanta uma temperatura de armazenamento do leite a 5 °C em todas as etapas da cadeia produtiva, o leite pode atingir uma vida de prateleira de 21 dias, se acondicionado em qualquer uma das embalagens.

## 8. REFERÊNCIAS

ALBALÁ-HURTADO, S.; VECIANA-NOGUÉS, T.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; MARINÉ-FONT, A. Determination of water-soluble vitamins in infant Milk by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 778, p. 247-253, 1997.

ALVES, R.M.V.; GARCIA, E.E.C.; DANTAS, S.T.; PADULA, M. **Embalagem para Produtos de Laticínios**. Campinas, SP: ITAL/CETEA, 1994. 85 p.

ANDRADE, N.J.; FIGUEIREDO, H.M.; AKUTSU, C.K.; ALBUQUERQUE, C.M.; SILVA, C.A.S.; ANTUNES, M.A. Testes em uso simulado para avaliação de processos de adesão e formação de biofilmes bacterianos. In: ANDRADE, N.J. **Higiene na indústria de alimentos**. 1. ed. São Paulo: Varela, 2008b. cap.3, 412 p.

ANDRADE, N.J.; PINTO, C.L.O.; LIMA, J.C. Adesão e Formação de Biofilmes Microbianos . In: ANDRADE, N.J. **Higiene na indústria de alimentos**. 1. ed. São Paulo: Varela, 2008a. cap.1, 412 p.

APHA (American Public Health Association). **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 17th. ed. Washington, D.C., 2001.

ASTM D 638-99. **Standard test method for tensile properties of plastics**. Philadelphia, PA: Annual Book of ASTM, 1999.

ASTM D 3985-02. Standard test method for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using a coulometric sensor. **Amer. Soc. for Testing and Materials**, Annual Book of ASTM, Philadelphia, PA, 2002.

BARCELLOS, R.C.; LIMA, M.F.S. Caracterização e avaliação da permeabilidade ao vapor de água e ao oxigênio de embalagens flexíveis multicamadas utilizadas no setor de alimentos. **Tecnologia**, v. 7, n. 1, p. 93-102, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 de 07 de Março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, de 11/03/1996, Seção 1, Página 3977. Brasília, DF: Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, 18 de setembro de 2002. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado. **Diário Oficial da União**. Brasília: Ministério da Agricultura, Secretaria de Inspeção de Produto Animal, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos. **Diário Oficial da União**, de 14/12/2006, Seção 1, Página 8. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Secretaria de Defesa Agropecuária, 2006.

BOSSET, J.O.; GALLMANN, P.U.; SIEBER, R. Influence de la translucidité de l'emballage sur la conservation du lait et des produits laitiers. **Lait.**, v. 73, p. 3-49, 1993.

BOSSET, J.O.; GALLMANN, P.U.; SIEBER, R. Influence of light transmittance of packaging materials on the shelf life of milk and dairy products - a review. In: MATHLOUTHI, M. (Ed.). **Food packaging and preservation**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1994. p. 222-268,

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

COSTA, C.A.R.; RIPPEL, M.M.; GALEMBECK, F. Heterogeneidade da capacidade dissipativa e do módulo de Young em superfícies poliméricas: contraste de fase em AFM com contato periódico. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.12, n. 3, p. 188-192, 2002.

COUTINHO, F.M.B.; MELLO, I.L.; SANTA MARIA, L.C.S. Polietileno: principais tipos, propriedades e aplicações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.13, n. 1, p.1-13, 2003.

CRIPPA, A. Estudo do desempenho de filmes multicamadas em embalagens termoformadas. 2006. 136 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006a.

CRIPPA, A.; SYDENSTRICKER, T.H.D.; AMICO, S.C.; ROCHA, A.P. Influência do processamento por termoformação nas propriedades de filmes multicamadas de média e alta barreira ao oxigênio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS (CBECIMat), 17., 2006, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu, PR, 2006b.

CRIPPA, A.; SYDENSTRICKER, T.H.D.; AMICO, S.C.; ROCHA, A.P. Desempenho de filmes multicamadas em embalagens termoformadas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, n. 3, p. 188-193, 2007.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Embrapa Gado de Leite. **Estatísticas do leite**. 2008. Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br>>. Acesso em: 20 jan. 2009.

ERICKSON, M.C. Chemical and microbial stability of fluid milk in response to packaging and dispensing. **International Journal of Dairy Technology**, v. 50, n. 3, p. 107-111, 1997.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. **Advanced dairy chemistry**. Parte A. 3. ed. v. 1. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J.C. Polímeros biodegradáveis – Uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, 2006.

FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

FRANK, J.F.; YOUSEF, A.F. Test of groups of microorganisms. In: APHA (American Public Health Association). **Standard methods for the examination of dairy products**. 17<sup>th</sup>. ed. Washington, D.C., 2004. p. 227-247,

GEBHARDT, S.E.; THOMAS, R.G. Nutritive value of foods. U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service. **Home and Garden**, n. 72, 2002.

GUIMARÃES, R. Importância da matéria-prima para a qualidade do leite fluido de consumo. **Higiene Alimentar**, v. 16, p. 25-34, 2002.

HOTCHKISS, J.H.; CHEN, J.H.; LAWLESS, H.T. Combined effects of carbon dioxide addition and barrier films on microbial and sensory changes in pasteurized milk. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 4, p. 690-695, 1999.

IDF (International Dairy Federation). **Pasteurization**, 1986. (Bulletin 200).

JAY, J.M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D.A. **Modern food microbiology**. 7. ed. [S.I.], Springer, 2006. p. 480.



LANGE, C.C.; BRITO, J.R.F. **Microrganismos que deterioram a qualidade do leite**. REHAGRO – Recursos Humanos no Agronegócio. On line, 2005. Disponível em: <<http://www.rehagro.com.br/siterehagro/printpublicacao.do?cdnoticia=728>>. Acesso em: 15 jan. 2009.

LORTAL, S.; DELAGE, M-M. **Comment conserver le lait?** La science et vous – Dossiers Scientifique de L'INRA, 2008. Disponível em: <<https://www.inra.fr>>. Acesso em: 10 jan. 2009.

MARTH, E.H.; STEELE, J.L. **Applied Dairy Microbiology**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001. 744 p.

MARTINS, J.F.L.; AZEREDO, R.M.C.; MILAGRES, R.C.R.M.; COELHO, A.I.M.; SANTANA, A.M.C. Avaliação da contaminação do ar em serviços de alimentação. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 58., 2006, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, jul. 2006.

MERGEN, I.Z. **Estudo da perda de vácuo em embalagens plásticas multicamadas para produtos cárneos curados cozidos**. 2004. 117 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

MINIM, V.P.R. **Análise sensorial: estudos com consumidores**. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2006. v. 1, 225 p.

MOYSSIADI, T.; BADEKA, A.; KONDYLI, E.; VAKIRTZI, T.; SAVVAIDIS, I.; KONTOMINAS, M.G. Effect of light transmittance and oxygen permeability of various packaging materials on keeping quality of low fat pasteurized milk: chemical and sensorial aspects. **International Dairy Journal**, v.14, p. 429-436, 2004.

NOGUEIRA, L.M.; DUTRA, R.C.; DINIZ, M.F.; PIRES, M.; EVANGELISTA, M.; SANTANA, F.A.; TOMASI, L.; SANTOS, P.; NONEMACHER, R. Avaliação da aplicabilidade de técnicas MIC/FT-IR/DSC para a caracterização de filmes multicamadas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 7, n. 2, p. 158-165, 2007.

OLIVEIRA, L.M.; ALVES, R.M.V.; SARANTÓPOULOS, C.I.G.L. **Ensaio para avaliação de embalagens plásticas flexíveis**. Campinas, SP: ITAL, CETEA, 1996. 219 p.

PETRUS, R.R.; FARIA, J.A.F. Testing a small scale aseptic system for milk in plastic bottles. **Food Science and Biotechnology**, v. 16, n.1, p. 18-22, 2007.

RAVANIS, S.; LEWIS, M.J. Observations on the effect of raw milk quality on the keeping quality of pasteurized milk. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p.164–167, 1995.

REN, T.J.; FRANK, F.J. Sampling of microbial aerosols at various locations in fluid milk and ice cream plants. **J. Food Protect.**, v. 55, p. 279-283, 1992.

ROBERTSON, G.L. Packaging of dairy products. In: **Food Packaging: Principles and practice**. New York: Marcel Dekker, 1993. cap.17, p. 507-549.

ROCHA, G.L. **Influência do tratamento térmico no valor nutricional do leite fluido**. 2004. 44 f. (Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Católica de Goiás “UCG”) – Universidade Católica de Goiás. Departamento de Matemática e Física – Engenharia de Alimentos, Goiânia, 2004.

RYSSTAD, G.; EBBESEY, A.; EGGESTAD, J. Sensory and chemical quality of UHT milk stored in paperboard cartons with different oxygen and light barriers. **Food Additives and Contaminants**, v.15, n.1, p.112–122, 1998.

SANVIDO, G.B. **Efeito do tempo de armazenamento do leite cru e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado sobre sua vida de prateleira**. 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Campinas, Campinas, 2007.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; OLIVEIRA, L.M.; CANAVESI, E. **Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis**. 1. ed. Campinas, SP: CETEA/ITAL, 2002.

SCHLIMME, E.; BUCHHEIM, W. **La leche y sus componentes – Propriedades químicas y físicas**. 2. ed. Espanha: Editorial Acribia, 2002. 121 p.

SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante – Revisão. **Química Nova**, v. 22, n. 1, 1999.

SIQUEIRA JUNIOR, W.M.; CARELI, R.T.; SALUSTIANO, V.C.; ANDRADE, N.J.; MENDONÇA, R.C.S. Qualidade microbiológica do ar de ambientes de uma indústria de processamento de carnes, avaliada pelas técnicas da sedimentação em placas e impressão em meio sólido. **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 135, p. 98-102, set. 2005.

SOARES, N.F.F.; MELO, N.R. **Material didático da disciplina embalagem de alimentos**. Viçosa, MG, Ciência e Tecnologia de Alimentos/UFV, 2007.

TROLLER, M.; BUSSE, M. **Sanitation in food processing**. 2<sup>nd</sup>. ed. London: Academic Press, 1993. 478 p.

van AARDT, M.; DUNCAN, J.S.E.; MARCY, E.; LONG, T.E.; HACKEY, C.R. Effectiveness of poly(ethylene terephthalate) and highdensity polyethylene in protection of milk flavor. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p.1341-1347, 2001.

van OSS, C.J. **Interfacial forces in aqueous media**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1994. 440 p.

van OSS, C.J.; CAHAUDHURY, M.K.; GOOD, R.J. Monopolar surfaces. **Advanced Colloid Interface Science**, v. 28, n. 1, 1987. p. 35-64.

van OSS, C.J.; GIESE, R.F. The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals. **Clay Minerals**, v. 43, p. 474-477, 1995.

VANETTI, C.A.; CECOTTO, G.; ALVES, E.; ANDRADE, N.J. Técnicas em microscopia usadas no estudo da adesão e da formação de biofilmes microbianos. In: ANDRADE, N.J. **Higiene na indústria de alimentos**. 1. ed. São Paulo: Varela, 2008. cap. 2, 412 p.

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

WALSTRA, P.; GEURTS, T.J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; van BOEKEL, M.A.J.S. **Ciencia d ela Leche y tecnología de los productos lácteos**. Espanha: Editorial ACRIBIA S.A., 2001. 730 p.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. Dairy science and technology. 2. ed. New York: Taylor and Francis Group, 2006. 782 p.

ZOCHE, F.; BERSOT, L.S.; BARCELLOS, V.C.; PARANHOS, J.K.; ROSA, S.T.M.; RAYMUNDO, N.K. Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região Oeste do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v. 7, n. 2, p. 59-67, 2002.

ZYGOURA, P.; MOYSSIADI, T.; BADEKA, A.; KONDYLI, E.; SAVVAIDIS, I.; KONTOMINAS, M.G. Shelf life of whole pasteurized milk in Greece: effect of packaging material. **Food Chemistry**, v. 87, p.1-9, 2004.