

MARIA PATRICIA MILAGRES

**LEITE DE VACA COM CONCENTRAÇÃO AUMENTADA DE  
MELATONINA: OBTENÇÃO, AVALIAÇÃO SENSORIAL E BIOLÓGICA**

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012

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

T

M637L  
2012

Milagres, Maria Patricia, 1983-

Leite de vaca com concentração aumentada de melatonina:  
obtenção, avaliação sensorial e biológica / Maria Patricia  
Milagres. – Viçosa, MG, 2012.  
xvii, 105f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Valéria Paula Rodrigues Minim.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Leite - Análise. 2. Sono. 3. Melatonina - Uso terapêutico.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 637.1

MARIA PATRICIA MILAGRES

**LEITE DE VACA COM CONCENTRAÇÃO AUMENTADA DE MELATONINA:  
OBTENÇÃO, AVALIAÇÃO SENSORIAL E BIOLÓGICA**

Tese 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 *Doctor Scientiae*

APROVADA: 15 de junho de 2012.

Ana Clarissa dos Santos Pires

Aline Cristina Arruda Gonçalves

Luis Antônio Minim  
(Coorientador)

Maria do Carmo Gouveia Peluzio

Valéria Paula Rodrigues Minim  
(Orientadora)

*Dedico este trabalho a vocês que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e trabalharam muito para que eu pudesse realizá-los, meus pais, Virgílio e Cormarie, e ao meu irmão Rodrigo.*

*A você Ramon, companheiro no amor, na vida e nos sonhos, que sempre me apoiou nas horas difíceis e compartilho comigo as alegrias.*

Façamos da interrupção, um caminho novo.  
da queda, um passo de dança,  
do medo, uma escada,  
do sonho, uma ponte, da procura, um encontro!

*Fernando Sabino*

## Agradecimentos

---

A Deus, por ter me concedido força para lutar, sabedoria na tomada de decisões e luz para guiar o meu caminho.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Departamento de Tecnologia de Alimentos que há mais de 10 anos tem sido fonte de conhecimento, aprendizado, e apoio em minha vida acadêmica, contribuindo fortemente pela minha formação pessoal e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo apoio financeiro na realização da pesquisa.

À professora Valéria Paula Rodrigues Minim, pela orientação durante este trabalho, por todo o esforço realizado para que esta pesquisa acontecesse, pela amizade, compreensão, respeito, e por contribuir para minha formação pessoal e profissional. O meu doutorado termina aqui, mas a amizade e respeito por você seguirão sempre.

Aos meus coorientadores Professor Luis Antônio Minim e Professora Hércia Stampini Duarte Martino, por todos os esclarecimentos e contribuições durante todo o trabalho.

Às Professoras Aline Cristina Arruda Gonçalves, Ana Clarissa dos Santos Pires e Maria do Carmo Gouveia Peluzio, pela participação da banca.

À minha mãe, que, com carinho e alegria, sempre me apoiou em meus estudos, pelos favores prestados, que ajudaram muito na otimização do meu tempo, por todas as madrugadas em que precisei da companhia dela no estábulo e pelas contribuições em tantas outras etapas deste trabalho e de minha vida.

Ao meu pai, que é meu exemplo de esforço e dedicação. Ele me ensinou que com muito trabalho, esforço e coragem é possível atingir grandes objetivos. Por todas as noites que me levou ao estábulo leiteiro e demais contribuições ao longo do trabalho. Por todo o apoio durante toda minha vida acadêmica, se esforçando sempre para me dar suporte pessoal e financeiro.

Ao meu irmão, pela amizade, compreensão, carinho, apoio em diversas fases do meu trabalho e por ser uma pessoa tão especial.

Ao meu tio Marcelo, que sempre foi mais que um tio, foi um irmão. Obrigada pela ajuda com as embalagens.

Ao meu namorado Ramon, pela paciência que teve com meus estresses, por ouvir minhas reclamações tantas vezes, por participar de forma tão efetiva deste trabalho. Agradeço a você também pelas renúncias feitas em sua vida para meu bem profissional. Você é um grande companheiro, e seus esforços não serão em vão.

Ao Departamento de Nutrição e Saúde, especialmente ao Laboratório de Nutrição Experimental, pelo apoio e atenção durante o desenvolvimento do ensaio biológico. E à técnica Fabiana, pela disponibilidade e atenção.

Ao Laboratório Nutrição e Metabolismo, do Departamento de Fisiologia Vegetal, pelo apoio na realização dos ensaios imunoenzimáticos, especialmente a Maria Mercês de Souza Gomes, por todos os esclarecimentos.

Aos funcionários do Estábulo Leiteiro, do Departamento de Zootecnia, pelas concessões, esclarecimentos e contribuições para o trabalho. Especialmente ao Professor Marcos Inácio Marcondes, que possibilitou o uso do estábulo, ao funcionário Almiro, que ajudou de forma tão especial e atenciosa nas ordenhas diurnas e noturnas, e ao Leonardo Knupp e Evaldo Firmino.

À equipe do Laboratório de Propriedades Tecnológicas e Sensoriais composta por Ana Cristina, Márcia, Naiara, Vanelle, Simone, Erika, Ana Paula, Gabriele, e em especial aos meus estagiários Liliane, Jociele, Aline, Betânia, Andréia e Rafael, por toda a ajuda e dedicação durante o experimento, sem vocês este trabalho não seria possível.

À equipe do laboratório de Desenvolvimento e Simulação de Processos, por todo o carinho, respeito, ajuda e esclarecimentos durante o período em que utilizei as instalações do laboratório.

À empresa Multicor, especialmente ao Tiago Araujo e à Tribuna Gráfica, especialmente a Roberto e João, pela dedicação ao trabalho realizado.

Enfim, a todos os que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

## **Biografia**

---

Maria Patrícia Milagres, filha de Virgílio de Paula Milagres e de Cormarie Geralda Reis Milagres, nasceu em São Miguel do Anta, Minas Gerais, no dia 28 de agosto de 1983.

Em março de 2000, iniciou o Curso de Ciências e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em janeiro de 2005. Em agosto de 2005, iniciou no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, nível de mestrado, na mesma Universidade, concluindo-o em julho de 2008.

Em agosto de 2008, iniciou o Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, nível de doutorado, na Universidade Federal de Viçosa.

De 2009 a 2011, ministrou disciplinas na área de Projetos Agroindustriais, como Professora Substituta no Departamento de Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Viçosa.

Em abril de 2012, foi aprovada no concurso de Professor Adjunto, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Em junho de 2012, concluiu o Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, nível de Doutorado, na Universidade Federal de Viçosa.

## Sumário

---

Lista de Figuras	x
Resumo	xiv
Abstract	xvi
Introdução Geral	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	2
CAPÍTULO 1 - Referencial Teórico	4
1-O envelhecimento da população.	4
2-Transtornos do Sono.	6
3- Metabolismo e excreção de melatonina.	9
4-Funções da Melatonina.	11
5 -A melatonina no leite.	13
6 - Efeito do triptofano na síntese de seratonina.	15
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPÍTULO 2-Pesquisa Mercadológica- Qualidade do Sono da População.	24
1-INTRODUÇÃO	24
2-MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1- Definição do questionário.	25
2.2- Amostragem.	27
2.3- Análise dos resultados.	28
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1- Grupo de portadores de insônia.	30
3.2- Grupo dos não portadores de insônia.	34
4-CONCLUSÃO	37
5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
CAPÍTULO 3- Influência do horário de ordenha na concentração de melatonina no leite de vaca.	41
1-INTRODUÇÃO	41
2-MATERIAIS E MÉTODOS	42
2.1- Ordenha dos animais.	42
2.2- Determinação da concentração de melatonina nos leites.	43
2.3- Desenvolvimento das formulações e análise físico-química e microbiológicas.	43

2.4- Ensaio biológico.	44
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1 -Ensaio Biológico	47
4-CONCLUSÃO	51
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
CAPÍTULO 4-A kinetic study on the thermal degradation of melatonin in milk.	54
1. INTRODUCTION	54
2. MATERIALS AND METHODS	55
2.1. Chemicals and reagents.	55
2.2. Sample preparation.	56
2.3. Thermal Treatment of samples.	56
2.4. Assay procedure.	56
2.5. Mathematical Modeling.	57
2.6. Experimental design and statistical analysis.	57
3. RESULTS AND DISCUSSION	58
4. CONCLUSION	62
5- REFERENCES	62
CAPÍTULO 5- Influência da Informação na Aceitação do Leite com Concentração Aumentada de Melatonina.	66
1-INTRODUÇÃO	66
2-MATERIAIS E MÉTODOS	68
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
3.1- Comparação entre as sessões.	72
3.2- Comparação entre os grupos de consumidores (idade inferior a 50 anos, e idade superior a 50 anos).	74
4-CONCLUSÃO	76
5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
CAPÍTULO 6- Análise Conjunta de Fatores na Definição da Embalagem para Leite com Concentração Aumentada de Melatonina.	79
1- INTRODUÇÃO	79
2-MATERIAIS E MÉTODOS	80
2.1- Escolha dos fatores da embalagem.	80
2.2 - Coleta de dados e arranjo experimental.	82

2.3- Confecção das embalagens. _____	83
2.4- Análise dos resultados. _____	86
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	87
3.1- Opiniões e atitudes dos consumidores em relação ao rótulo de leite. _____	87
3.2- Avaliação da intenção de compra das embalagens por meio de Análise Conjunta de Fatores. _____	91
4 -CONCLUSÃO _____	95
5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	95
Conclusão Geral _____	97
ANEXO 1-QUESTIONÁRIO USADO NA AVALIAÇÃO. _____	99
ANEXO 2 – DELINEAMENTO UTILIZADO NA APRESENTAÇÃO DAS EMBALAGENS AOS CONSUMIDORES. _____	104

## Lista de Figuras

---

Figura 1.1-Pirâmides etárias brasileiras: 1950, 1980, 2000 e 2050.....	5
Figura 1.2- Produção de melatonina ao longo do dia.....	9
Figura 1.3- Variação da produção melatonina em relação à idade.....	11
Figura 2.1- Exemplo de cartão utilizado para a pergunta “Em média, em qual categoria de renda familiar mensal você se enquadra?.....	27
Figura 2.2-Percentual de pessoas com problemas de sono.....	29
Figura 2.3- Perfil dos portadores de insônia.....	31
Figura 2.4- Principais problemas de sono relatado pelos portadores de insônia.....	32
Figura 2.5- Distúrbios do sono relatados pelos portadores de insônia .....	33
Figura 2.6- Sonolência diurna apresentada pelos entrevistados na escala de Sonolência de <i>Epworth</i> .....	34
Figura 2.7- Perfil dos não portadores de insônia.....	35
Figura 2.8- Distúrbios do sono relatados pelos não portadores de insônia.....	36
Figura 2.9- Sonolência diurna apresentada pelos entrevistados na escala de Sonolência de <i>Epworth</i> .....	37
Figure 4.1 - Kinetics of thermal destruction of melatonin during heating. (●) 75 °C; (○) 80 °C; (▲) 85 °C. (Δ) 90 °C; (◆) 95 °C.....	59
Figure 4.2 -Variation of the decimal reduction time (D) with temperature for melatonin.....	61

Figure 4.3- The Arrhenius plots for degradation of melatonin in milk.....	62
Figura 5.1- Procedimento do experimento de influência de fatores não sensoriais. .....	68
Figura 5.2- Informação sobre a melatonina fornecida na sessão 3 do teste.....	69
Figura 5.3- Fichas de avaliação sensorial usadas: a- Usada na sessão 1; b- Usada na sessão 2 e 3.....	70
Figura 5.4- Frequência de notas hedônicas.....	71
Figura 5.5- Médias dos escores de aceitação do leite com concentração aumentada de melatonina.....	72
Figura 5.6- Médias dos escores de aceitação do leite com concentração aumentada de melatonina, avaliados nas sessões 1, 2 e 3.....	75
Figura 6.1- Embalagens apresentadas nas sessões de grupo de focos.....	81
Figura 6.2- Exemplos de embalagens avaliadas.....	84
Figura 6.3- Ficha usada na avaliação da intenção de compra.....	85
Figura 6.4- Primeira embalagem de leite apresentada aos consumidores para a retirada do impacto da primeira amostra.....	86
Figura 6.5- Perfil dos consumidores que participaram do grupo de focos.....	88
Figura 6.6 – Frequência de leitura dos rótulos de produtos alimentícios pelos participantes do grupo de focos.....	89
Figura 6.7- Embalagem com maior intenção de compra: a- frente e b- verso.....	94

## Lista de Tabelas

Tabela 2.1 - Resumo das questões apresentadas aos consumidores.....	26
Tabela 3.1- Composição das dietas das vacas.....	42
Tabela 3.2- Composição da dieta dos ratos em g/100g.....	45
Tabela 3.3- Análise de variância do experimento de ordenha dos animais (Delineamento em Blocos Casualizados).....	47
Tabela 3.4- Composição físico-química das amostras.....	48
Tabela 3.5- Caracterização microbiológica das amostras.....	48
Tabela 3.6- Peso inicial e final dos animais, ganho de peso e consumo de dieta, leite e melatonina dos animais.....	49
Tabela 3.7- Comparação entre a concentração de melatonina e sulfatoximelatonina nos grupo controle e L <sub>15h</sub> .....	49
Tabela 3.8- Comparação entre a concentração de melatonina e sulfatoximelatonina no grupo L <sub>15h</sub> e L <sub>2h</sub> .....	50
Tabela 3.9- Comparação entre a concentração de melatonina e sulfatoximelatonina no grupo L <sub>2h</sub> e L <sub>2h</sub> T.....	50
Table 4.1- Physicochemical composition of milk samples.....	58
Table 4.2- The kinetic parameters of melatonin degradation (Mean ± standard deviation).....	60
Tabela 5.1- Comparação entre sessões 1 e 2 usando teste t para amostras pareadas. ....	73
Tabela 5.2- Comparação entre sessões 2 e 3, usando teste t para amostras pareadas.....	73

Tabela 6.1 - Roteiro para as sessões de grupo de focos.....	81
Tabela 6.2– Fatores das embalagens e respectivos níveis.....	82
Tabela 6.3 - Tratamentos avaliados no estudo.....	83
Tabela 6.4- Resumo dos resultados da análise de agrupamento.....	91
Tabela 6.5- Resumo da análise agregada conjunta de fatores, considerando 3 grupos formados.....	92

## Resumo

MILAGRES, Maria Patricia, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2012. **Leite de vaca com concentração aumentada de melatonina: obtenção, avaliação sensorial e biológica.** Orientadora: Valéria Paula Rodrigues Minim. Coorientadores: Hércia Stampini Duarte Martino e Luis Antonio Minim.

A melatonina é responsável pela regulação circadiana e pelo controle do sono, sendo encontrada em maior concentração no organismo durante a noite. Distúrbio em sua produção pode ser responsável pela insônia. Uma queda substancial na produção de melatonina acontece com a idade, podendo prejudicar a qualidade do sono dos idosos. Desta forma, é importante a observação e a regulação da produção da melatonina no organismo, uma vez que a insônia e os distúrbios do sono causam diversos malefícios à saúde e à produtividade das pessoas. Uma forma de aumentar a melatonina no organismo é por meio da alimentação, uma vez que o composto é encontrado em diversos alimentos como mostarda, erva-doce e leite. Porém, nestes alimentos a melatonina se encontra em baixas concentrações e o seu aumento, pela adição de melatonina no alimento, não é permitido. Assim, o presente trabalho objetivou a obtenção de leite com concentração de melatonina aumentada por meio das ordenhas noturnas. Foram estudados o perfil dos portadores e não portadores de insônia, bem como os principais sintomas dos distúrbios do sono. Os resultados mostraram que há um nicho de mercado, composto principalmente por idosos e mulheres, para o desenvolvimento de produtos naturais que tenham como propriedade melhorar a qualidade do sono da população. Diferentes horários (15h00min. e 2h00min.) de ordenha foram estudados a fim de identificar o período em que o leite obtido apresenta maior concentração de melatonina. O leite obtido por meio de ordenha realizada às 2h00min. (39,43 pg/mL) apresentou concentração de melatonina nove vezes superior ao leite obtido às 15h00min. (4,03pg/mL). Ensaio biológico com ratos wistar foi realizado com objetivo de testar as 3 formulações desenvolvidas (leite obtido na ordenha das 15h00min., leite obtido na ordenha das 2h00min., leite obtido na ordenha das 2h00min. adicionado de triptofano) em relação ao aumento da melatonina sanguínea e sulfatoximelatonina urinária. O leite obtido por meio da ordenha noturna foi eficiente no aumento de melatonina sanguínea e sulfatoximelatonina urinária, porém a formulação que apresentou melhores resultados no aumento dos indicadores de qualidade do sono foi o leite ordenhado às 2h00min. e acrescido de triptofano. Para o desenvolvimento do

novo produto, foi necessário estudar a estabilidade da melatonina a tratamentos térmicos. Este estudo foi realizado, utilizando-se a cinética de destruição térmica da melatonina no leite. Os resultados indicaram que os tratamentos térmicos usados em leite causam perdas insignificantes da melatonina. As características não sensoriais (presença de melatonina, e informações sobre os benefícios do consumo de melatonina) foram testadas em dois grupos (menores de 50 anos e maiores de 50 anos). Os resultados mostraram que a informação da presença de melatonina causa impacto positivo na aceitação do leite em ambos os grupos. O conhecimento dos benefícios do consumo de melatonina também influenciou positivamente os dois grupos, porém, o grupo de pessoas maiores de 50 anos foi influenciado mais fortemente. Por meio da análise conjunta de fatores, foi definida uma embalagem para o produto desenvolvido, de *design* azul com estrelas e desenho de leite derramando, com o nome leite noturno e com texto informativo. Desta forma, foi possível obter um produto diferenciado e inovador a partir de ordenhas noturnas dos animais, nas condições climáticas do Brasil, adicionado de triptofano, visando à melhoria da qualidade do sono dos idosos e à agregação de valor ao leite, sem grandes investimentos dos produtores, e de maneira sustentável e viável.

## Abstract

MILAGRES, Maria Patricia, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June 2012. **Cow's milk with increased concentration of melatonin: acquisition, sensory and biological evaluation.** Adviser: Valéria Paula Rodrigues Minim. Co-advisers: Hércia Stampini Duarte Martino and Luis Antonio Minim.

Melatonin is responsible for circadian regulation and control of sleep, being found at greatest concentration in the body at night. Disorders in its production may be responsible for insomnia. A substantial decrease in melatonin production occurs with age and often affects the sleep quality of elderly individuals. It is therefore important to observe and regulate the production of melatonin in the body, since insomnia and sleep disorders may have diverse negative effects on health and productivity of individuals. One method of increasing melatonin in the organism is through food, since the compound is found in many different foods including mustard, fennel, and milk. However in these foods melatonin is found in low concentrations and its increase by the addition of melatonin to the food is not allowed. Therefore, the objective of the present study was to obtain milk with elevated melatonin concentrations by night milking.

The profiles of individuals with and without insomnia were studied, as well as the main symptoms of sleep disorders. Results showed that there is a large niche market composed especially of elderly women, for the development of natural products which have the properties of improving sleep quality. Different periods (15h00min. and 2h 00min,) of milking were tested in order to define the period in which the milk obtained had the highest concentrations of melatonin. Milk obtained at 2h 00min presented melatonin concentrations nine times greater than the milk obtained at 15h 00min. Biological assays with Wistar rats were conducted to test the 3 formulations developed (milk obtained from milking at 15h 00min, milk obtained from milking at 2h 00min, milk obtained from milking at 2h 00min and supplemented with tryptophan) in relation to the increase in blood melatonin and urinary sulphatoxymelatonin. Milk obtained by night milking successfully increased blood melatonin and urinary sulphatoxymelatonin, but the formulation that showed the best results by increase in the indicators quality of sleep was that obtained at 2h 00min and supplemented with tryptophan. For development of the new product a study of melatonin stability when subjected to heat treatment was necessary. This study was conducted by assessing the kinetics of thermal destruction of melatonin in milk. Results indicate that it is stable, and that the heat

treatment used in milk cause little loss of melatonin. The non-sensory characteristics (presence of melatonin and information on the benefits of consuming melatonin) were tested in two groups (individuals younger than 50 and older than 50 years). The results show that information on the presence of melatonin had a positive impact on acceptance of the milk in both groups. Knowledge of the benefits of consuming melatonin also positively influenced the two groups, however the group composed of individuals over 50 was more strongly influenced. By means of a joint analysis of factors, a blue packaging for the product was developed which was designed with stars and pouring milk, given the name night-time milk and informative text was also printed on the packaging. Thus, an innovative and unique product was developed from night milking of the animals in the climate conditions of Brazil, with the addition of tryptophan, to improve sleep quality of elderly people and add value to milk without large investments on the part of producers, in both a sustainable and viable fashion.

## Introdução Geral

---

O Brasil tem atualmente cerca de 18 milhões de pessoas com mais de 60 anos, e segundo projeção do IBGE (2010), estima-se que, em 2020, esse contingente aumentará para 30 milhões. O crescimento deste grupo etário cria novos desafios para a sociedade brasileira e inúmeras são as oportunidades de negócios emergentes para a oferta de bens e serviços visando à qualidade de vida desse segmento populacional.

A qualidade de vida dos idosos é comprometida, na maioria das vezes, pela insônia, que causa sonolência diurna, fadiga, redução da performance físico-motora e memória, estando associada diretamente a problemas de saúde como hipertensão, depressão, doenças cardiovasculares e ainda com a diminuição da produtividade no trabalho. Segundo Kessler et al. (2011), em pesquisa realizada nos Estados Unidos, a insônia, presente em várias faixas etárias, causa perda de produtividade do trabalhador, representando um prejuízo de 63,2 bilhões de dólares por ano ao país e uma perda de produtividade de 11,3 dias ao ano por pessoa.

Uma das principais causas da insônia é a queda na produção da melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), um neuro-hormônio produzido pela glândula pineal, quando se fecham os olhos. O metabolismo da melatonina no organismo acontece a partir do precursor triptofano, um aminoácido essencial presente na alimentação. Pesquisas recentes mostram que o aumento da ingestão de triptofano na dieta pode aumentar a produção de melatonina (PAREDES et al., 2008; SANCHES et al., 2008).

Melatonina não é considerada aditivo alimentar pela Lista Geral Harmonizada de Aditivos Alimentares e Suas Classes Funcionais do Mercosul (MERCOSUL/GMC/RES N° 11/2006), não sendo permitida sua adição a alimentos. Entretanto, está presente naturalmente em alguns alimentos, como, por exemplo, maracujá, maçã, erva-doce, camomila e leite.

O leite de vaca é um alimento rico em nutrientes como proteínas e carboidratos, sendo matéria-prima para geração de diversos derivados. Muitos componentes do leite vêm sendo estudados pelas suas propriedades funcionais, destacando-se entre eles a melatonina.

A cadeia produtiva do leite é um dos mais importantes agronegócios brasileiros, sendo geradora de vários empregos, porém, o baixo preço pago ao produtor faz com que

muitos agricultores mudem para outras atividades. Estratégias para a agregação de valor ao leite de maneira sustentável e viável devem ser desenvolvidas para valorização desta atividade agroindustrial.

Visto isto, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas para agregar valor ao leite, destacando-se os estudos para aumentar naturalmente a concentração de melatonina. Valtonen et al. (2001) mostraram ser possível o aumento da concentração de melatonina com mudanças nos fotoperíodos das vacas. Haigh (2003) demonstrou o aumento da concentração de melatonina no leite para até 35 pg/mL com ordenhas noturnas com iluminação máxima de 50 lux. Gnann (2011) desenvolveu método para aumentar naturalmente a melatonina no leite, fundamentado em exposição do animal à luz, com diferentes comprimentos de onda, durante o dia e à noite, e posteriores ordenhas noturnas.

Como grande parte da produção de leite no Brasil ocorre em condições de manejo semiextensivo, as metodologias de produção de leite com alta concentração de melatonina propostas por Valtonen et al. (2001), Haigh (2003) e Gnann (2011) torna-se inviável para o produtor rural brasileiro, sendo necessários grandes investimentos para utilização das metodologias propostas.

É importante ressaltar também que a composição do leite varia com a raça, alimentação, nível de estresse do animal e temperatura do ambiente (HARAGUCHI et al., 2006), não sendo possível extrapolar resultados encontrados em outros países para as condições de criação de animais no Brasil. Estudos são necessários para verificar a possibilidade de aumento natural de melatonina no leite no país em condições de manejo, viáveis aos produtores rurais.

Com base no exposto acima, o presente trabalho visa à obtenção, avaliação sensorial e biológica de leite diferenciado e inovador, coletado por meio de ordenhas noturnas dos animais, adicionado de triptofano, visando à melhoria da qualidade do sono.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

GNANN, T. Method **for the Production of Milk or Milk Products Having a High Melatonin content.**.. European Patent EP1841325, 2011.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo demográfico: resultados preliminares - 2010.

HAIGH, B. S. **Method for producing milk with an enhanced content of naturally expressed melatonin**, UK PATENT APPLICATION; 2 387 009 A, 2003.

HARAGUCHI, F. K. ; ABREU, W. C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista da Nutrição**, v.19, p.479-488, 2006.

KESSLER, R. C.; BERGLUND, P. A.; COULOUVRAT, C.; HAJAK,G.; ROTH, T.; SHAHLY, V.; SHILLINGTON, A. C.; STEPHENSON, J. J.; WALSH, J.K. Insomnia and the Performance of US Workers: Results from the America Insomnia Survey. **Sleep**, v.34, p.1161-1171, 2011.

MERCOSUL, 2006 Lista Geral Harmonizada de Aditivos Alimentares e Suas Classes Funcionais do Mercosul (MERCOSUL/GMC/RES N° 11/2006)

PAREDES, S. D.; MARCHENA, A. M.; BEJARANO, I.; ESPINO, J.; BARRIGA, C.; RIAL, R. V.; REITER, R. J.; RODRIGUES, A. B. Melatonin and Tryptophan Affect the Activity – Rest Rhythm, Core and Peripheral Temperatures, and Interleukin Levels in the Ringdove: Changes With Age. **Journal of Gerontology**, v.64, p. 340-350, 2008.

SÁNCHEZ, S.; SÁNCHEZ, C. L.; PAREDES, D.; RODRIGUEZ, A. B.; BARRIGA, C. The effect of tryptophan administration on the circadian rhythms of melatonin in plasma and the pineal gland of rats. **Journal of Applied Biomedicine**, v.6, p.177–186, 2008.

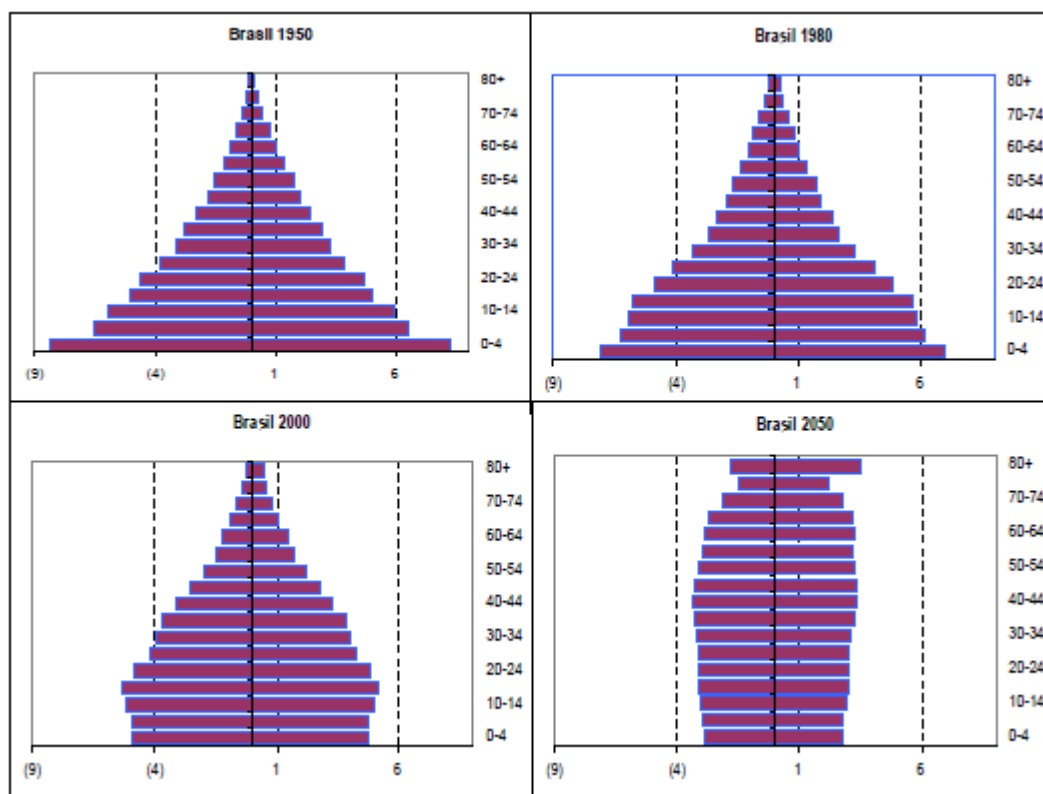
VALTONEN, M.; KANGAS, A. P.; VOUTILAINEN, M. **Method for producing melatonin rich milk**; Patent Cooperation Treaty ; WO 01/01784 A1, 2001.

**1-O envelhecimento da população.**

O crescimento da população idosa é um fenômeno mundial e, no Brasil, as modificações ocorrem de forma radical e bastante acelerada. As projeções mais conservadoras indicam que, em 2020, o Brasil será o sexto país do mundo em número de idosos, com um contingente superior a 30 milhões de pessoas (CARVALHO e GARCIA, 2003).

A população idosa passou de 4% em 1940 para 8% em 1996, e projeções mostraram que esse segmento poderá ser responsável por quase 15% da população brasileira no ano 2020 (Figura 1.1) (CAMARANO, 2002).

O Brasil hoje é um “jovem país de cabelos brancos”. A cada ano, 650 mil novos idosos são incorporados à população brasileira, a maior parte com doenças crônicas e alguns com limitações funcionais. Em menos de 40 anos, o Brasil passou de um cenário de mortalidade próprio de uma população jovem para um quadro de enfermidades complexas e onerosas, típica dos países longevos, caracterizado por múltiplas doenças crônicas que perduram por anos, com exigência de cuidados constantes, medicação contínua e exames periódicos (VERAS, 2009).



Fonte: ONU (2006) - <http://esa.un.org/unpp>

Figura 1.1-Pirâmides etárias brasileiras: 1950, 1980, 2000 e 2050.

O prolongamento da vida é uma aspiração de qualquer sociedade. No entanto, só pode ser considerada uma real conquista na medida em que se agreguem qualidade aos anos adicionais de vida. Assim, qualquer política destinada aos idosos deve levar em conta a capacidade funcional, a necessidade de autonomia, de participação, de cuidado, de autossatisfação. Também deve incentivar, fundamentalmente, a prevenção, o cuidado e a atenção integral à saúde (VERAS, 2009).

A conscientização e a mobilização da sociedade vêm demandando que cada vez mais seja internalizado o conceito de envelhecimento ativo adotado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que consiste num processo que busca otimizar as oportunidades de saúde (bem-estar físico, mental e social), participação e segurança, com a finalidade de melhorar a qualidade de vida das pessoas que envelhecem (GUIMARÃES, 2006).

Estudos têm mostrado que doenças crônicas, bem como suas incapacidades, não são consequências inevitáveis do envelhecimento. A prevenção é efetiva em qualquer

nível, mesmo nas fases mais tardias da vida. Portanto, a ênfase na prevenção é a chave para mudar o quadro atual (PARAHYBA et al., 2005; VERAS et al., 2008).

## **2-Transtornos do Sono.**

A insônia está associada diretamente a problemas de saúde como hipertensão, depressão, doenças cardiovasculares, sendo uma das responsáveis pela redução da qualidade de vida dos idosos. Esta parcela da população é desfavorecida pela diminuição da produção do hormônio do sono, sendo a maior prevalência de insônia em pessoas com idade superior a 65 anos (ORWOLL, 2005).

Os transtornos do sono são comuns e pelo menos 30% da população sofre de um distúrbio clinicamente significativo e de importância para a saúde pública. A insônia é o distúrbio do sono mais comum, seguido pela apneia e síndrome das pernas inquietas (RAM et al., 2010).

Os numerosos distúrbios do sono são definidos por diferentes sistemas classificatórios, que são independentes e utilizam diferentes critérios de inclusão, causando dificuldades para estudos epidemiológicos, de diagnóstico e de interpretação de resultados. A Classificação Internacional dos Distúrbios do Sono apresenta uma taxonomia detalhada, sendo a mais utilizada pelos profissionais da área da medicina do sono. Este sistema de classificação agrupa os transtornos do sono em quatro categorias: as dissonias, as parassonias, transtornos do sono relacionados com doenças orgânicas ou psiquiátricas e outros transtornos do sono (VANABLE et al., 2000).

As dissonias são transtornos que produzem dificuldades para iniciar ou manter o sono, ou sonolência excessiva, sendo os transtornos do sono mais importantes associados com o sono noturno perturbado ou com a vigília transtornada. E entre as dissonias, destacam-se a insônia primária, apneia e a síndrome das pernas inquietas (VANABLE et al., 2000).

Parassonias é o nome que se dá às manifestações e comportamentos peculiares que ocorrem durante o sono e que geralmente não acarretam distúrbios do tipo sonolência diurna ou sono não reparador. Na grande maioria dos casos, não constituem anormalidade, não requerendo tratamento, porém orientação ao paciente e aos familiares, destacando-se entre elas o sonambulismo, o terror noturno, o pesadelos e o bruxismo (VANABLE et al., 2000).

Dentro das dissonias, encontra-se a insônia primária, cujas características fundamentais são a dificuldade para iniciar ou manter o sono e a sensação de não ter tido um sono reparador, apresentando consequências como irritabilidade, fadiga, déficit de concentração e de memória (MULLER e GUIMARÃES, 2007).

Outra dissonia com alto índice de prevalência é a apneia, caracterizada por paradas respiratórias durante o sono, ronco excessivo e despertares que fragmentam o sono e causam hipersonolência diurna. A apneia pode causar enfermidades cardiovasculares como hipertensão arterial, acidente vascular cerebral e hipoxemia (MULLER e GUIMARÃES, 2007).

A Síndrome das Pernas Inquietas é um transtorno do sono que os pacientes descrevem como uma necessidade de movimentar as pernas ou outras extremidades durante o repouso. Isto pode ser acompanhado por sensações desagradáveis que são temporariamente aliviadas por movimentos. A síndrome das pernas inquietas leva a uma grave dificuldade em iniciar e manter o sono devido ao fato de a atividade motora realizada por pacientes em busca de alívio prolongar a latência do sono e a frequente movimentação dos membros durante o sono provoca despertares. Consequentemente, os pacientes se queixam de sono insuficiente e/ou insatisfatório e de funcionamento diurno alterado (MERLINO et al., 2007).

Os transtornos do sono estão associados a diversos problemas de saúde. Sintomas de falta de sono foram significativamente associados ao aumento da mortalidade. Eletroencefalogramas foram capazes de prever o tempo de sobrevivência em 184 idosos. O tempo de latência do sono maior que 30 minutos aumentou o risco relativo de morte para 2,14 vezes em comparação com tempo de latência menor que 30 minutos, enquanto o sono fragmentado aumentou o risco relativo de mortalidade para 1,93 (DEW et al., 2003).

As funções físicas e particularmente as quedas são uma grande preocupação em populações idosas. Dam et al. (2008) demonstraram por meio de actigrafia e polissonografia, em estudo com 2862 idosos, associação entre a falta de sono à noite com menor força de aderência, baixa velocidade nas caminhadas, incapacidade físicas e quedas.

A falta de sono também tem sido associada ao comprometimento cognitivo. Em estudo realizado por Cricco et al. (2010), foi observado que homens não deprimidos

com insônia crônica apresentaram 49% mais probabilidade de sofrer declínio cognitivo do que aqueles sem insônia.

Dificuldades para dormir ainda estão significativamente associadas a doenças com problemas psiquiátricos, doenças cardíacas e pulmonares, depressão, osteoartrose e acidente vascular cerebral (ANCOLI-ISRAEL, 2009).

A identificação da população que apresenta distúrbios do sono e a caracterização dos problemas são úteis para melhorar a qualidade de vida da população, diminuir a perda de produtividade e reduzir o número de doenças decorrentes deste mal. Devido a isto, diversas metodologias são usadas para diagnosticar os distúrbios do sono, como os questionários específicos, dosagem de melatonina, dosagem de sulfatoximelatonina e registros actigráficos ou polissonográficos.

Diferentes questionários podem ser utilizados na rotina clínica para fins diagnósticos, na monitorização da resposta aos tratamentos instituídos, em estudos epidemiológicos e em pesquisa clínica. Alguns deles avaliam o sono em seus aspectos gerais, dando enfoque ao tempo para seu início (latência do sono), qualidade, aspectos comportamentais, presença de despertares e sonolência diurna. Entre esses questionários, podemos citar o *Sleep Disorders Questionnaire*, com questões de avaliação quantitativa e qualitativa; o *Pittsburgh Sleep Quality Index*, que se refere à qualidade do sono no último mês, fornecendo um índice de gravidade e natureza do distúrbio; o *Mini-sleep Questionnaire* (MSQ), que avalia a frequência das queixas; o *Basic Nordic Sleep Questionnaire* (BNSQ), que analisa as queixas mais comuns em termos de frequência e intensidade nos últimos três meses com especificação quantitativa; e o questionário de autoavaliação do sono, utilizado em pesquisas psicofarmacológicas. O outro grupo é o dos questionários mais direcionados e específicos para determinadas alterações, tendo como mais conhecidos e utilizados a escala de sonolência de *Epworth*, cuja pontuação vai de 0 a 24, sendo caracterizada a sonolência excessiva para valores acima de 10; a escala de sonolência de *Stanford*, que se refere ao estado momentâneo de sonolência; e aqueles para avaliação dos distúrbios respiratórios do sono, como os de *Hoffstein*, *Douglass*, *Deegan* e o do *Fletcher e Luckett* (TOGEIRO e SMITH, 2005).

A actigrafia é uma técnica de avaliação do ciclo sono-vigília que permite o registro da atividade motora através dos movimentos dos membros durante 24 horas. Trata-se de um dispositivo colocado no punho que faz a detecção dos movimentos,

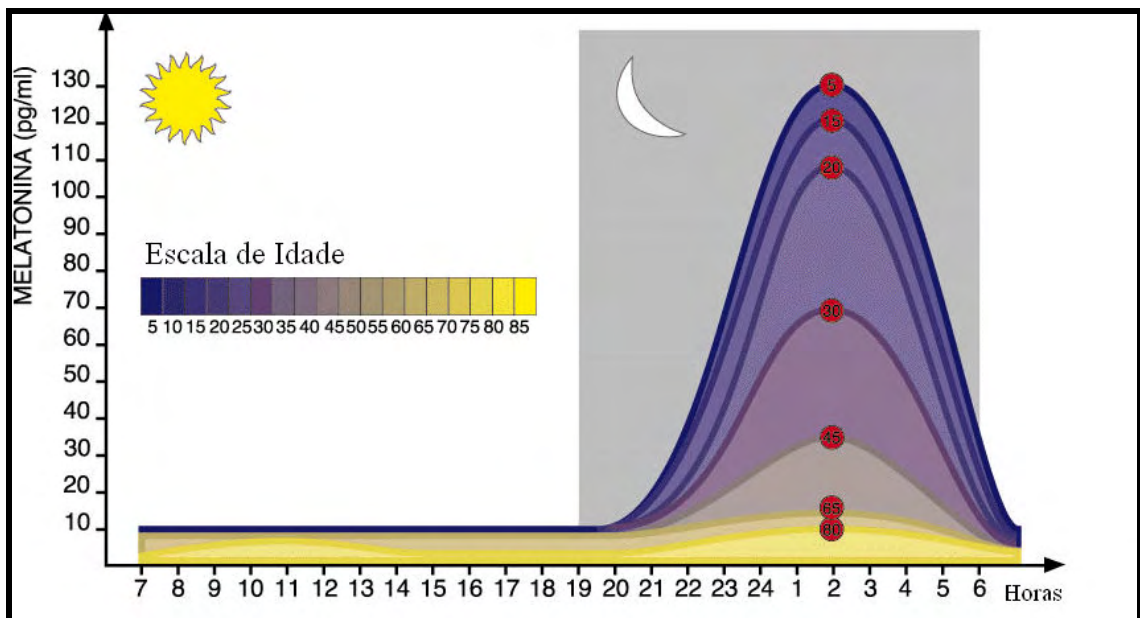
sendo esta detecção digitalizada, podendo ser transferida para um computador. Assim, podemos obter informações como o tempo total de sono, tempo total acordado, número de despertares e latência para o sono (TOGEIRO e SMITH, 2005).

O estudo polissonográfico de noite inteira feito em laboratório é o método mais eficiente para o diagnóstico dos distúrbios do sono, com a existência de uma diversidade de sistemas. A montagem polissonográfica possibilita o registro em polígrafo do eletroencefalograma, do eletrooculograma, da eletromiografia da mente e membros, das medidas do fluxo oronasal, do movimento tóraco-abdominal, do eletrocardiograma e da oximetria de pulso (TOGEIRO e SMITH, 2005).

### 3- Metabolismo e excreção de melatonina.

A melatonina é um neuro-hormônio produzida pela glândula pineal a partir do momento em que se fecham os olhos. Na ausência de luz, é enviada uma mensagem neuro-endócrina ativando sua formação, sendo a secreção dessa substância quase exclusivamente determinada por estruturas fotossensíveis, principalmente à noite (TAMURA et al., 2009).

A maior produção da melatonina ocorre à noite, entre 2h:00min. e 3h:00min., num ritmo de vida normal, e esta produção aumentada produz sono (KENNAWAY et al., 2002). A Figura 1.2 mostra o aumento da produção de melatonina à noite, ou seja, no horário de pouca iluminação.



Fonte: <http://archiwum.wiz.pl/1996/96091900.asp>

Figura 1.2- Produção de melatonina ao longo do dia.

A melatonina é produzida a partir do aminoácido triptofano, normalmente ingerido numa alimentação equilibrada (TAMURA et al., 2009). O metabolismo de triptofano em serotonina ocorre dentro dos corpos dos neurônios serotoninérgicos, envolvendo duas enzimas. A triptofano hidroxilase converte o triptofano em 5-hidroxitriptofano, que é rapidamente metabolizado, por meio da enzima descaboxilase de aminoácidos, a serotonina (KAPCZINSKI et al., 1998).

As estruturas fotorreceptivas da retina e da glândula pineal produzem a melatonina quando detectam ausência de luz, modificando a via de síntese da serotonina por meio da enzima serotonina-N-acetiltransferase (SKENE e ARENDT, 2007).

Sua síntese é controlada pelo núcleo supraquiasmático (NSQ), situado no hipotálamo, que constitui o relógio biológico mestre no organismo dos mamíferos. As fibras nervosas da retina captam a luminosidade do ambiente e transmitem essa informação para o NSQ. Durante o dia, a síntese de melatonina está reduzida, no entanto, no momento em que escurece, ocorrem a ativação e a liberação de noradrenalina (NA), que, através dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos nos pinealócitos, ativa a proteína kinase A, que aumenta a síntese de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) que, por sua vez, ativa a N-acetiltransferase (NAT) que catalisa a síntese da melatonina (AMANDO e MAZZACORATTI, 2004).

Devido ao caráter anfifílico da melatonina, ela pode atravessar facilmente as membranas celulares por difusão passiva. Em consequência, a melatonina não é armazenada no interior do pinealócito, sendo, assim, imediatamente liberada após sua formação dentro dos capilares sanguíneos que irrigam a glândula pineal (SKENE e ARENDT, 2007).

A excreção da melatonina ocorre na forma de 6-sulfatoximelatonina. Segundo Alves et al. (1998), apenas 1% da melatonina é excretada na urina em sua forma primitiva, sendo a maior parte eliminada como 6-sulfatoximelatonina. Assim, os perfis plasmáticos e urinários da 6-sulfatoximelatonina acompanham fielmente o perfil da própria melatonina.

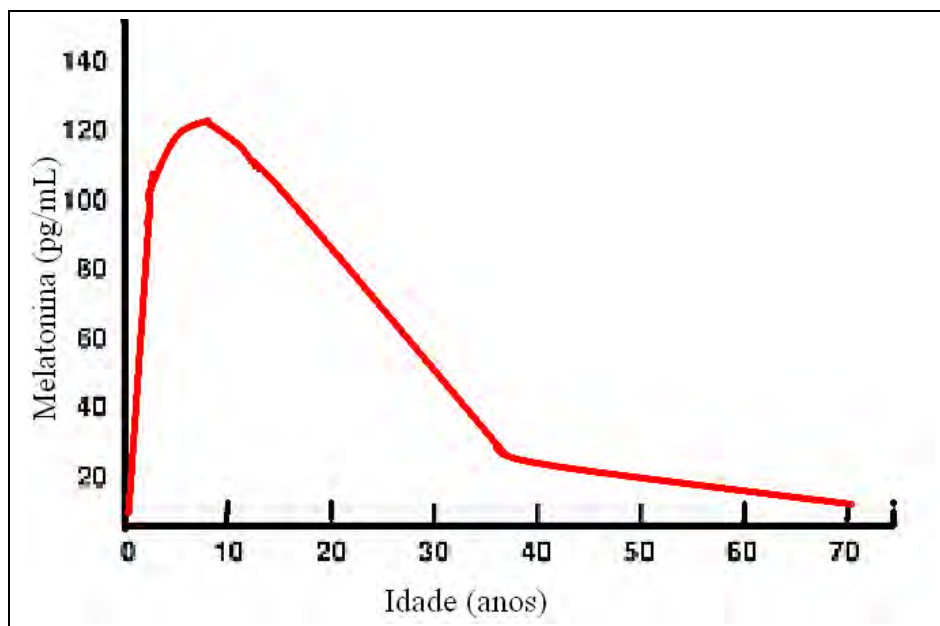
No fígado, ocorre a hidroxilação da melatonina, formando 6-hidroximelatonina, seguida de uma conjugação com sulfato ou glucoronato, sendo posteriormente excretada na urina sob a forma de 6-sulfatoximelatonina (forma mais estável e de fácil avaliação pela determinação urinária) (MAGANHIN et al., 1992).

#### 4-Funções da Melatonina.

Nas crianças, a glândula pineal é muito pequena e a secreção de melatonina não está regularizada. A melhor produção da melatonina acontece na adolescência e no adulto jovem, começando a decair após os trinta ou quarenta anos (Figura 1.3). Na idade de setenta anos, a secreção do hormônio está severamente diminuída (DAWSON e ENCEL, 1993).

A melatonina materna pode ajudar no controle do ciclo do sono do lactente. Tumura et al. (2009) mostraram que os bebês apresentavam sincronia com a mãe, como a melatonina está presente no leite materno e sua concentração é maior à noite, os bebês dormem mais com o leite oferecido à noite.

As desordens do sono são um dos efeitos do decréscimo da melatonina. Com o envelhecimento, existe uma queda na produção da melatonina, e isso faz com que alguns pacientes idosos tenham qualidade do sono pobre ou insônia (SKENE e ARENDT, 2007).



Fonte: Reiter (1995).

Figura 1.3- Variação da produção melatonina em relação a idade.

Estudos têm demonstrado que a prevalência da insônia é maior em adultos mais velhos em comparação com adultos jovens. Alta prevalência de insônia foi relatada no estudo observacional de base comunitária realizado pelo Instituto Nacional do Envelhecimento, envolvendo mais de 9.000 pacientes. Queixas de transtornos crônicos

do sono foram encontrados em mais de 50% de adultos mais velhos (maiores de 65 anos), particularmente dificuldade em iniciar ou manter o sono (FOLEY et al., 1995).

De acordo com Orwoll (2005), 44% dos homens com idade superior a 64 anos têm qualidade do sono pobre. Uma pesquisa com 3161 adultos não institucionalizados descobriu que 25% dos adultos mais velhos (65-79 anos), em comparação com 16% de adultos jovens (18 - 64 anos), sofrem de insônia (ANCOLI-ISRAEL, 2009).

Visto isto, a melatonina sintética vem sendo usada em diversas pesquisas com intuito de melhorar a qualidade do sono da população.

O primeiro relato do uso da melatonina em humanos é de Lerner et al. (1960), que a injetaram (200 mg por via endovenosa) em voluntário, obtendo como efeito uma leve sedação. Anton-Tay et al. (1971), citados por Alves et al. (1998), testaram várias doses (0,5 mg/kg a 1,25 mg/kg por via oral) em voluntários saudáveis, epiléticos e parkinsonianos. O estudo demonstrou a indução de sono, que ocorreu cerca de 15 a 20 minutos após a administração de melatonina em indivíduos normais e epiléticos. Nos pacientes epiléticos, ocorreu também aumento do limiar convulsivo; já os pacientes parkinsonianos apresentaram melhora significativa em vários testes de desempenho pela diminuição da rigidez e do tremor ao longo do tratamento.

Segundo Martinez et al. (2008), uma dose de 0,3 a 3 mg de melatonina ao entardecer contribui para o sono. Skene & Arendt (2007) relataram que a melatonina administrada ao entardecer, na dose de 0,5 mg, regulariza a fase do sono. Existe evidência de que a melatonina na dose de 2 a 5 mg, ao deitar, seja eficaz na prevenção ou redução do *jet lag* e deveria ser recomendada para quem atravessa mais de quatro fusos horários (SKENE e ARENDT, 2007).

Estudos têm demonstrado outras ações da melatonina que podem ser de grande importância médica como seu potencial antioxidante contra a ação de radicais livres na célula (BARLOW-WADEN et al., 1995; HARDELAND e RODRIGUEZ, 1995 ; REITER, 1995); sua ação antitumoral interagindo com os microtúbulos e inibindo a mitose em diferentes linhagens de células (FERREIRA et al., 2010; MEDIAVILLA et al., 2010; CASADO-ZAPICO et al., 2011); e o seu potencial benéfico na osteoporose, pela capacidade de aumentar a expressão da sialoproteína óssea (IANAS et al., 1991; PUCCI et al., 2003).

A melatonina apresenta efeitos benéficos em doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson, mal de Alzheimer, epilepsia e envelhecimento (CASTROVIEJO et al., 2002).

Algumas ações da melatonina são mediadas por receptores de membrana e algumas funções se baseiam em sítios nucleares de ligação (TUMURA et al., 2009). Três subtipos de receptores de melatonina em membranas de mamíferos têm sido estudados. Dois destes receptores, MT1 e MT2, são membros da proteína G acoplados à 7-transmembrana. O terceiro receptor, MT3, é uma enzima identificada como quinona redutase. Nos seres humanos, foram detectados receptores de melatonina em vários órgãos, incluindo o cérebro, a retina, o sistema cardiovascular, o fígado, a vesícula biliar, o intestino, o rim, as células imunes, os adipócitos, células epiteliais da próstata e da mama, o miométrio e a pele (TUMURA et al., 2009).

Apesar dos benefícios relatados sobre o uso da melatonina como medicamento e de sua liberação para uso público nos Estados Unidos pela *Food and Drug Administration*, ainda faltam informações sobre sua toxicologia. No Brasil, a Agência de Vigilância Sanitária reconhece a melatonina como um hormônio, não permitindo seu uso. Efeitos adversos como impacto sobre o sistema reprodutor, pesadelos, hipotensão, distúrbios do sono, dor abdominal etc. têm sido relatados (GUARDIOLA-LEMAITREV, 1997).

### **5 -A melatonina no leite.**

A melatonina está presente naturalmente em alguns alimentos como mostarda, vinho e camomila. O leite é um dos alimentos que contêm naturalmente a melatonina. Eriksson et al. (1998) demonstraram ser possível o aumento de melatonina no leite com ordenhas noturnas, desencadeando uma série de pesquisas com o objetivo de desenvolver leite com concentração aumentada de melatonina.

Arvidsson (2001) desenvolveu equipamento de ordenha de animal para separar o leite, dependendo do seu teor de melatonina. Um dispositivo de controle é usado para separar o leite de acordo com a hora de ordenha (dia ou noite). O leite coletado de um animal ordenhado durante a noite é dirigido para um primeiro recipiente, e o leite de um animal ordenhado durante o dia é dirigido para um segundo. O dispositivo de controle compreende um relógio que controla a hora do dia ou da noite.

Haigh (2003) observou que, em ordenhas realizadas à noite com iluminação máxima de 50 lux, obteve-se concentração mais elevada de melatonina em relação às ordenhas normais. Na ordenha feita entre 14 e 16 horas, obteve-se concentração de melatonina de aproximadamente 0 a 20 pg/mL, já nas ordenhas feitas das 2 às 4 horas da manhã, foram obtidos níveis de melatonina de 10 a 35 pg/mL.

Valtonen et al. (2001) desenvolveram um método para produzir um leite rico em melatonina estudando o tempo que a vaca era submetida à luz e o tempo em que a vaca ficava no escuro. No tratamento LD 12:12, em que os animais foram submetidos a 12 horas de claridade e 12 horas de escuridão, os níveis de melatonina no leite ficaram na ordem de 8,9 pg/mL; já no tratamento LD 17:7, em que as vacas foram submetidas a 17 horas de escuridão e 7 horas de claridade, a concentração de melatonina foi aumentada para 56,4 pg/mL.

Valtonen et al. (2005) estudaram o efeito do leite com alta concentração de melatonina em idosos. Os idosos da instituição foram divididos em dois grupos de pacientes: um grupo de 81 pacientes normais e um grupo de 70 pacientes dementes. Posteriormente, estes grupos foram divididos em 2 subgrupos: um subgrupo recebeu leite com alta concentração de melatonina (grupo tratamento) e o outro recebeu leite normal (grupo controle). Após 8 semanas de administração de 0,5 litros de leite por dia a estes pacientes, observou-se que a qualidade do sono dos pacientes normais, que receberam leite com alta concentração de melatonina, melhorou consideravelmente em relação ao controle, já nos idosos dementes, o leite com alta concentração de melatonina causou um efeito sazonal da qualidade do sono.

Gnann (2011) estudou a influência de criação de animais com luz em diversos comprimentos de onda para verificar em quais condições de iluminação os animais produziam maior concentração de melatonina no leite.

De acordo com Arvidsson (2001), uma vez que a melatonina ocorre naturalmente no leite, é possível comercializar produtos lácteos com a vantagem da sua presença. Com a constatação de que um animal produz leite com um teor mais elevado de melatonina durante a noite, os produtos lácteos podem, sem aditivo, ter um teor reforçado de melatonina. Assim, os produtos podem ser comercializados como produtos naturais que contêm uma quantidade aumentada de melatonina.

## **6 - Efeito do triptofano na síntese de seratonina.**

O triptofano é um aminoácido essencial que necessita ser fornecido pelas proteínas ingeridas. Entre os aminoácidos que constituem as proteínas, o triptofano é um dos encontrados em menor proporção nos alimentos e no plasma. O valor relativamente baixo de triptofano no corpo é uma característica singular, pois este aminoácido é conhecido por estar envolvido em diversas funções fisiológicas. De fato, além de sua incorporação a proteínas do corpo, o triptofano é também o precursor da serotonina e da síntese de niacina. A diversidade de funções fisiológicas bem como o baixo teor de triptofano no corpo aumentam o risco potencial para a criação de situações de desequilíbrio da homeostase do triptofano. Consequentemente, o suprimento exógeno de triptofano pode ser relevante para superar os efeitos adversos induzidos pela competição metabólica para sua utilização (FLOCH et al., 2010).

Uma importante função fisiológica do triptofano é seu uso na síntese de proteínas. Uma vez que os mamíferos não podem sintetizar este aminoácido, a proporção em que é metabolizado em serotonina e niacina não está disponível para a síntese proteica. O teor médio de triptofano no organismo é de 1,2 g/ 100 g de proteína, muito menor do que de outros aminoácidos essenciais como lisina (7,6 g/ 100 g), leucina (7,1 g/ 100 g) e treonina (4,0 g/ 100 g). De acordo com Sawadogo et al. (1997), em pesquisa com jovens suínos em crescimento, 54% de triptofano ingerido foi incorporado às proteínas corporais quando o triptofano foi fornecido abaixo das exigências (SAWADOGO et al., 1997).

A produção de serotonina (5-HT) é dependente da disponibilidade cerebral de seu precursor, o aminoácido L-triptofano. O aminoácido é convertido a serotonina através de uma via metabólica rápida que consiste de duas enzimas - triptofano hidroxilase e descarboxilase de aminoácidos. A taxa de limitação da triptofano hidroxilase, na via de triptofano e 5-HT, não é normalmente saturada com triptofano. Assim, aumentando os níveis de triptofano, pode-se aumentar a síntese de 5-HT, enquanto diminuir a disponibilidade de triptofano pode causar um considerável declínio na síntese de 5-HT (SILBER e SCHMITT, 2010).

O triptofano é transportado através da barreira hemato-encefálica por um sistema de transporte ativo específico, que também transporta uma série de outros grandes aminoácidos neutros com as LNAAs (leucina, isoleucina, tirosina, fenilalanina e valina) para o cérebro. Como resultado, o triptofano compete com estes outros LNAAs por

sítios do transporte ativo. Portanto, a absorção de triptofano não depende somente da sua concentração total plasmática, mas, principalmente, da relação plasmática entre triptofano e outros LNAAs. Um aumento da taxa plasmática de triptofano-LNAA pode resultar em um aumento na absorção de triptofano no cérebro. Assim, a quantidade relativa de LNAAs na dieta tem grande impacto sobre os níveis de triptofano no cérebro. Uma dieta alta em triptofano, mas com uma grande quantidade de LNAAs, não resultará em níveis mais elevados de triptofano no cérebro, podendo até diminuir a absorção de triptofano. Uma intervenção alimentar que aumente a relação triptofano/LNAAs é necessária a fim de aumentar a captação de triptofano e, conseqüentemente, a produção de serotonina no cérebro (SILBER e SCHMITT, 2010).

Uma das formas de aumentar a vantagem do triptofano, na competição para a absorção, é a ingestão do triptofano juntamente com  $\alpha$ -lactoalbumina. Esta proteína é tida como transportadora de triptofano. Booij et al. (2006) demonstraram que a ingestão de  $\alpha$ -lactoalbumina aumenta a relação triptofano-LNAA em até 130%. Segundo Haraguchi et al. (2006), o leite é um alimento rico em  $\alpha$ -lactoalbumina, representando 15-25% das proteínas do soro.

Tormo et al. (2004) estudaram a administração oral de 125 mg/kg de triptofano em ratos diabéticos e concluíram que o triptofano não modificou os níveis de glicemia ou insulinemia, mas elevou os níveis de melatonina nos ratos.

Sanches et al. (2008) analisaram os níveis de melatonina ao longo de um período de 24 horas em ratos Wistar após a administração oral de 125 mg/kg de triptofano. Os níveis de melatonina no plasma e glândula pineal foram medidos por radioimunoensaio a cada hora durante a noite e a cada 4 horas durante o dia. Os resultados indicaram que a administração de triptofano provocou aumento dos níveis de melatonina em todas as horas estudadas no plasma e na glândula pineal. Paredes et al. (2008) mostraram que a ingestão de triptofano pode aumentar os níveis de melatonina plasmática.

## **7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALVES, R. S. C.; NETO, J. C.; NAVARRO, J. M.; OKAY, Y. A melatonina e o sono em crianças. **A Revista Pediatria**, v.20, p. 99-105, 1998.

ARVIDSSON, D. A Method and an Arrangement for Milking an Animal. Patent Cooperation Treaty WO/2001/095703, 2001.

AMADO, D.; MAZZACORATTI, M. G. N. O papel da melatonina na epilepsia. **Ciências e Cultura**, v.56, p.43-44, 2009.

ANCOLI-ISRAEL, S. ; ROTH, T. Characteristics of insomnia in the United States: results of the 1991 National Sleep Foundation Survey. I. **National Sleep Foundation**, v.2, p.347-353, 1999.

BARLOW-WALDEN, L., REITER, J. J.; ABE, M.; PABLOS, M., MENDEZ-PELAEZ, A.; CHEN, L.D.; POEGGELER, B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. **Neurochemistry International**, v.26, p.497-502, 1995.

BOOIJ, L.; MERENS, W.; MARKUS, C.R.; WILLEM VAN DER DOES, A.J Diet rich in alactalbumin improves memory in unmedicated recovered depressed patients and matched controls. **Journal of Psychopharmacology**, v.20, p.526–535, 2006.

BURKHARDT, S.; REITER, R. J.; TAN, D. X.; HARDELAND, R.; CABRERA, J.; KARWOWNIK, M. DNA oxidatively damaged by chromium(III) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is protected by the antioxidants melatonin, N1-acetyl-N2-formyl-5- methoxykynuramine, resveratrol and uric acid. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biological**, v.33, p.775-783, 2001.

CAMARANO, A. A. Envelhecimento da população Brasileira: uma Contribuição Demográfica. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada**, v.858, p.1-31, 2002.

CARVALHO, J. A. M.; GARCIA, R. A. O envelhecimento da população brasileira: um enfoque demográfico. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, p.725-732, 2003.

CASADO-ZAPICO, S. ; MARTIN, V.; GARCIA-SANTOS, G.; BLANCO, J.R.; SANCHES, A.M.; LUNO, E.; SUARES, C.; PEDRERO, J.M.G.; MENENDEZ, S. T.; ANTOLIN, I.; RODRIGUES, C. Regulation of the expression of death receptors and their ligands by melatonin in haematological cancer cell lines and in leukaemia cells from patients. **Journal of Pineal Research**, v.50, p.345-355, 2011.

CASTROVIEJO, D. A.; ESCAMES, G.; CARAZO, A.; LEÓN, J.; KHALDY, H.; REITER, R. J. Melatonin, Mitochondrial Homeostasis and Mitochondrial-Related Diseases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.2, p.133-151, 2002.

CRICCO, M.; SIMONSICK, E. M.; FOLEY, D.J. The impact of insomnia on cognitive functioning in older adults. **Journal American Geriatric Society**, v.49, p.1185–1189, 2001.

DAM, T.T.; EWING, S.; ANCOLI-ISRAEL, S.; ENSRUD, K.; REDLINE, S.; STONE, K. Association between sleep and physical function in older men: the osteoporotic fractures in men sleep study. **Journal American Geriatric Society**, v.56, p.1665–1673, 2008.

DAWSON, D.; ENCEL, N. Melatonin and sleep in humans. **Journal of Pineal Research**, v.15, p.1-12, 1993.

DEW, M.A.; HOCH, C.C.; BUYSSE, D.J.; MONK, T.H.; BEGLEY, A.E.; HOUCK, P.R. Healthy older adults' sleep predicts all-cause mortality at 4 to 19 years of follow-up. **Psychosomatic Medicine**, v.65, p.63–73, 2003.

ERIKSSON, L.; VALTONEN, M. ; LAITINEN, J. T.; PAANANEN, M.; KAIKKONEN, M. Diurnal rhythm of melatonin in bovine milk: pharmacokinetics of exogenous melatonin in lactating cows and goats. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.39, p.301-310, 1998.

FERREIRA, C. S.; MAGANHIN, C. C.; SIMÕES, R. S.; GIRÃO, M. J. B. C.; BARACAT, E. C. SOARES-JR, J. M. Melatonina: modulador de morte celular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.56 p.715-719, 2010.

FLOC'H, N. L.; OTTEN, W.; MERLOT, E. Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. **Amino Acids**, v.41, p.1195-1205, 2010.

FOLEY, D.J.; MONJAN, A.A.; BROWN, S.L.; SIMONSICK, E.M.; WALLACE, R.B.; BLAZER, D.G. Sleep complaints among elderly persons: an epidemiologic study of three communities. **Sleep**, v.18, p.425–32, 1995.

GNANN, T. Method **for the Production of Milk or Milk Products Having a High Melatonin content**. European Patent EP1841325, 2011.

GUARDIOLA-LEMAITRE, B. Toxicology of Melatonin. **Journal of Biology Rhythms**, v.12, p.697-706, 1997.

GUIMARÃES, J. R. S. Envelhecimento Populacional e Oportunidades de Negócios: o Potencial Mercado da População Idosa, **XV Encontro Nacional de Estudos Populacionais**, Caxambu – MG, 2006.

HAIGH, B. S. **Method for producing milk with an enhanced content of naturally expressed melatonin**, UK PATENT APPLICATION; 2 387 009 A, 2003.

HARAGUCHI, F. K. ; ABREU, W. C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista da Nutrição**, v.19, p.479-488, 2006.

HARDELAND, R.; RODRIGUEZ, C. Versatile melatonin: a pervasive molecule serves various functions in signaling and protection. **Chronobiology International**, v.12, p.157-165, 1995.

IANAS, O.; OLENESCU, R.; BADESCU, I. Melatonin involvement in oxidative stress. **Romanian Journal of Endocrinology**, v.29, p.147–153, 1991.

LERNER, A. B.; CASE, J. D.; TAKAHASHI, Y.; LEE, T. H.; MORI, W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. **Journal American Geriatric Society**, 80:2587-2590, 1960.

KAPCZINSKI, F.; BUSNELLO, J.; ABREU, M. R.; CARRÃO, A. D. Aspectos da Fisiologia do Triptofano. **Revista de Psiquiatria Clinica**, v.25, p.158-165, 1998.

KENNAWAY, D. J.; WRIGHT, H. Melatonin and Circadian Rhythms, **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.2, p.199-209, 2002.

KESSLER, R. C.; BERGLUND, P. A.; COULOUVRAT, C.; HAJAK, G.; ROTH, T.; SHAHLY, V.; SHILLINGTON, A. C.; STEPHENSON, J. J.; WALSH, J.K. Insomnia and the Performance of US Workers: Results from the America Insomnia Survey. **Sleep**, v.34, p.1161-1171, 2011.

MAGANHIN, C. C.; CARBONEL, A. A. F.; HATTY, J. H.; FUCHS, L. F. P.; OLIVEIRA-JÚNIOR, I.S.; SIMÕES, M. J.; SIMÕES, R. S.; BARACAT, E. C.; SOARES-JÚNIOR, J. M. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão, **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.54, p.267-271, 1992.

MARTINEZ, D. ; LENZ, M. C. S.; BERRETO, L.M. Diagnóstico dos transtornos do sono relacionados ao ritmo circadiano. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.34, p.173-180, 2008.

MEDIAVILLA, D. M.; SANCHEZ-BARCELO, J. E.; TAN, X. D.; MANCHESTER, L.; REITER J.R. Basic Mechanisms Involved in the Anti-Cancer Effects of Melatonin. **Current Medicinal Chemistry**, v.17, p.4462-4481, 2010.

MERLINO, G.; FRATTICCI, L.; VALENTE, M.; GIUDICE, A. D.; NOACCO, C.; DOLSO, P.; CANCELLI, J.; SCALISE, A.; GIGLI, L. Association of Restless Legs Syndrome in Type 2 Diabetes: A Case-Control Study. **Sleep**, v.30, p.866-871, 2007.

MULLER, M. R.; GUIMARÃES, S. S. Impacto dos transtornos do sono sobre o funcionamento diário e a qualidade de vida. **Estudo de Psicologia**, v.24, p.519-528, 2007.

ORWOLL, M. M. Epidemiology of insomnia: what we know and what we still need to learn. **Sleep Medicine Reviews**, v.6, p.97–111, 2005.

OXENKRUG, G.; REQUINTINA, P.; BACHURIN, S. Antioxidant and antiaging activity of N-acetylserotonin *in vivo* models. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.939, p.190-199, 2001.

PARAHYBA, M. I.; VERAS, R.P.; MELZER, D. Incapacidade funcional entre as mulheres idosas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.39, p.383-91, 2005.

PAREDES, S. D.; MARCHENA, A. M.; BEJARANO, I.; ESPINO, J.; BARRIGA, C.; RIAL, R. V.; REITER, R. J.; RODRIGUES, A. B. Melatonin and Tryptophan Affect the Activity – Rest Rhythm, Core and Peripheral Temperatures, and Interleukin Levels in the Ringdove: Changes With Age. **Journal of Gerontology**, v.64, p. 340-350, 2008.

PUCCI, V. ; FERRANTI, A.; MANDRIOLI R.; RAGG, M. A. Determination of melatonin in commercial preparations by micellar electrokinetic chromatography and spectrofluorimetry. **Analytica Chimica Acta**, v.488, p. 97–105, 2003.

RAM, S.; SEIRAWAN, H.; KUMAR, S.K.S.; CLARK, G.T Prevalence and impact of sleep disorders and sleep habits in the United States. **Sleep Breath**, v.14, p.63–70, 2010.

REITER, R. J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. **Federation of American Societies for Experimental. Biology**, v.9, p.526-533, 1995.

SÁNCHEZ, S.; SÁNCHEZ, C. L.; PAREDES, D.; RODRIGUEZ, A. B.; BARRIGA, C. The effect of tryptophan administration on the circadian rhythms of melatonin in plasma and the pineal gland of rats. **Journal of Applied Biomedicine**, v.6, p.177–186, 2008.

SAWADOGO, M.L.; PIVA, A.; PANCIROLI, A.; MEOLA, E.; MORDENTI, A.; SEVE, B. Marginal efficiency of free or protected crystalline L-tryptophan for

tryptophan and protein accretion in earlyweaned pigs. **Journal of Animal Science**, v.75, p.1561–1568, 1997.

SILBER, B. Y.; SCHMITT, J.A.J. Effects of tryptophan loading on human cognition, mood, and sleep. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.34, p.387–407, 2010.

SKENE, D. J.; ARENDT, J. Circadian rhythm sleep disorders in the blind and their treatment with melatonin. **Sleep Medicine**, v.8, p.651–655, 2007.

TAMURA, H. ; NAKAMURA, Y.; KORKMAZ, A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D.; SUGINO, N.; REITER, R. J. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**, v.92, p. 328-343, 2009.

TOGEIRO, S. M. G. P.; SMITH, A. K. Métodos diagnósticos nos distúrbios do sono. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.27. p.8-15, 2005.

TORMO, M.A.; TEJADA A. R.; MORALES, I.; PAREDES, S.; SANCHEZ, S.; BARRIGA, C.; HERNANDEZ, R. Orally administered tryptophan and experimental type 2 diabetes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.261, p.57-61, 2004.

VALTONEN, M.; KANGAS, A. P.; VOUTILAINEN, M. **Method for producing melatonin rich milk**; Patent Cooperation Treaty ; WO 01/01784 A1, 2001.

VALTONEN, M.; NISKANEN, L.; KANGAS, A.P.; KOSKINEN, T. Effect of melatonin-rich night-time milk on sleep and activity in elderly institutionalized subjects. **Nordic Journal of Psychiatry**, v.59, p.217-221, 2005.

VANABLE, P. A.; AIKENS, J.E.; TADIMETI, L.; CARUANA-MONTALDO, B.; WENDELSON, B. Sleep Latency and Duration Estimates Among Sleep Disorder Patients: Variability as a Function of Sleep Disorder Diagnosis, Sleep History, and Psychological Characteristics. **Sleep**, v.23, p.1-9, 2000.

VERAS, R. Envelhecimento populacional contemporâneo: demandas, desafios e inovações. **Revista de Saúde Pública**, v.43, p.548-54, 2009.

VERAS, R.P.; CALDAS, C.P.; ARAÚJO, D.V.; KUSCHNIR, R.; MENDES, W.  
Características demográficas dos idosos vinculados ao sistema suplementar de saúde no  
Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.42, p.497-502, 2008.

### 1-INTRODUÇÃO

Os transtornos do sono são comuns, e, pelo menos, 30% da população sofre de um distúrbio clinicamente significativo e de importância para a saúde pública. A insônia é o distúrbio do sono mais comum, seguido pela apneia e pela síndrome das pernas inquietas (RAM et al., 2010). Os distúrbios do sono estão associados diretamente a problemas de saúde como hipertensão, depressão, doenças cardiovasculares e ainda redução da produtividade no trabalho. De acordo com Kessler et al. (2011), em pesquisa realizada nos Estados Unidos, a insônia causa perda de produtividade do trabalhador, representando um prejuízo de 63,2 bilhões de dólares por ano ao país e uma perda de produtividade de 11,3 dias ao ano por pessoa.

Estudos para desenvolver produtos ou técnicas que melhorem a qualidade do sono são extremamente necessários, uma vez que a insônia é relatada, por vários autores, como um grande problema da sociedade em diversas partes do mundo (Ancoli-Israel e Roth, 1999; Sivertsen et al., 2009; Cho et al.; 2009, Souza e Souza, 2009).

No contexto de desenvolvimento de produtos e inovações, a pesquisa mercadológica é uma das ferramentas mais empregadas para a tomada de decisão. Por sua capacidade de expressar o comportamento, desejo ou necessidade dos consumidores e por tornar possível mensurar a aceitação de certo produto, as empresas têm incorporado e aperfeiçoado continuamente técnicas de pesquisa de mercado em suas práticas mercadológicas.

Os questionários de pesquisa mercadológica são utilizados para compreender as pessoas ou organizações para quais seus produtos se destinam. É neste contexto que a

pesquisa mercadológica tem papel fundamental, pois garante decisões e investimentos baseados em informações seguras (SAMARA e BARROS, 2002). Informações sobre as expectativas e satisfação dos clientes em relação aos produtos, melhor embalagem, preço que se dispõe a pagar, motivos que o levam a comprar, hábitos e atitudes em relação aos produtos (MINIM, 2010).

Com base no exposto acima, aplicou-se a pesquisa mercadológica para identificar o perfil e as características de portadores e não portadores de problemas de sono, bem como suas motivações para o consumo ou não consumo de produtos que melhorem o sono. Objetivou-se estudar estes consumidores por meio dos grupos formados e identificar possíveis nichos de mercado para o desenvolvimento de um novo produto que melhore a qualidade do sono.

## **2-MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1- Definição do questionário.**

O questionário foi desenvolvido inicialmente pela tradução do *Sleep Disorders Questionnaire*, validado para avaliação do sono por Sweerey et al. (1998). O *Sleep Disorders Questionnaire* foi escolhido entre os questionários de avaliação do sono pelo seu caráter geral e sua forma quantitativa e qualitativa. Este questionário, após traduzido, foi transformado em questões estruturadas (sempre/eventualmente/raramente/nunca ou sim/não).

Em seguida, foi adicionada ao questionário a escala de *Epworth* validada para avaliação de sonolências na língua portuguesa por Bertolazi (2009). A escala de sonolência de *Epworth* foi usada pela existência de uma versão validada para a língua portuguesa e também por ser o questionário de avaliação da sonolência mais usado em pesquisas pela sua confiabilidade e boa relação com polissonografias (BERTOLAZI, 2009).

Ao questionário desenvolvido também foram acrescentadas questões para definir o perfil socioeconômico da população - sexo, estado civil, grau de instrução atividade profissional e renda familiar mensal - baseado em Minim (2010).

Antes da aplicação do questionário, foi feito um pré-teste com 50 pessoas. As questões de difícil entendimento, contraditórias, confusas, mal formuladas, foram reformuladas ou adaptadas, questões sugeridas pelos entrevistados foram adicionadas e

questões desnecessárias foram retiradas. A Tabela 2.1 mostra o resumo do questionário desenvolvido.

Tabela 2.1 - Resumo das questões apresentadas aos consumidores.

<b>Conteúdo das questões*</b>
Sexo, idade, estado civil, grau de instrução, renda familiar, atividade profissional.
Apresenta dificuldades para dormir.
Demora a pegar no sono.
Mexe muito na cama durante o sono.
Acorda no meio da noite.
Dorme durante a tarde.
Tem parada respiratória durante o sono.
Utiliza medicamento de uso contínuo.
Utiliza chá ou fitoterápico com objetivo de melhorar o sono.
Acorda ofegante ou sem ar durante a noite.
Sente dormência nas pernas, arrepios, câimbras enquanto dorme.
Questões sobre frequência de sonambulismo, sonhos, pesadelos, roncos.
Escala de sonolência diurna.
Se apresenta problemas relacionados ao estresse.

\*Questões fechadas com respostas de acordo com cada pergunta.

A fim de evitar viés e tendenciosidade nas escolhas, optou-se por utilizar cartões circulares não hierarquizados e de dimensões simétricas para que os entrevistados apontassem suas escolhas (Figura 2.1). Houve o cuidado de variar a posição do cartão ao apresentá-lo.

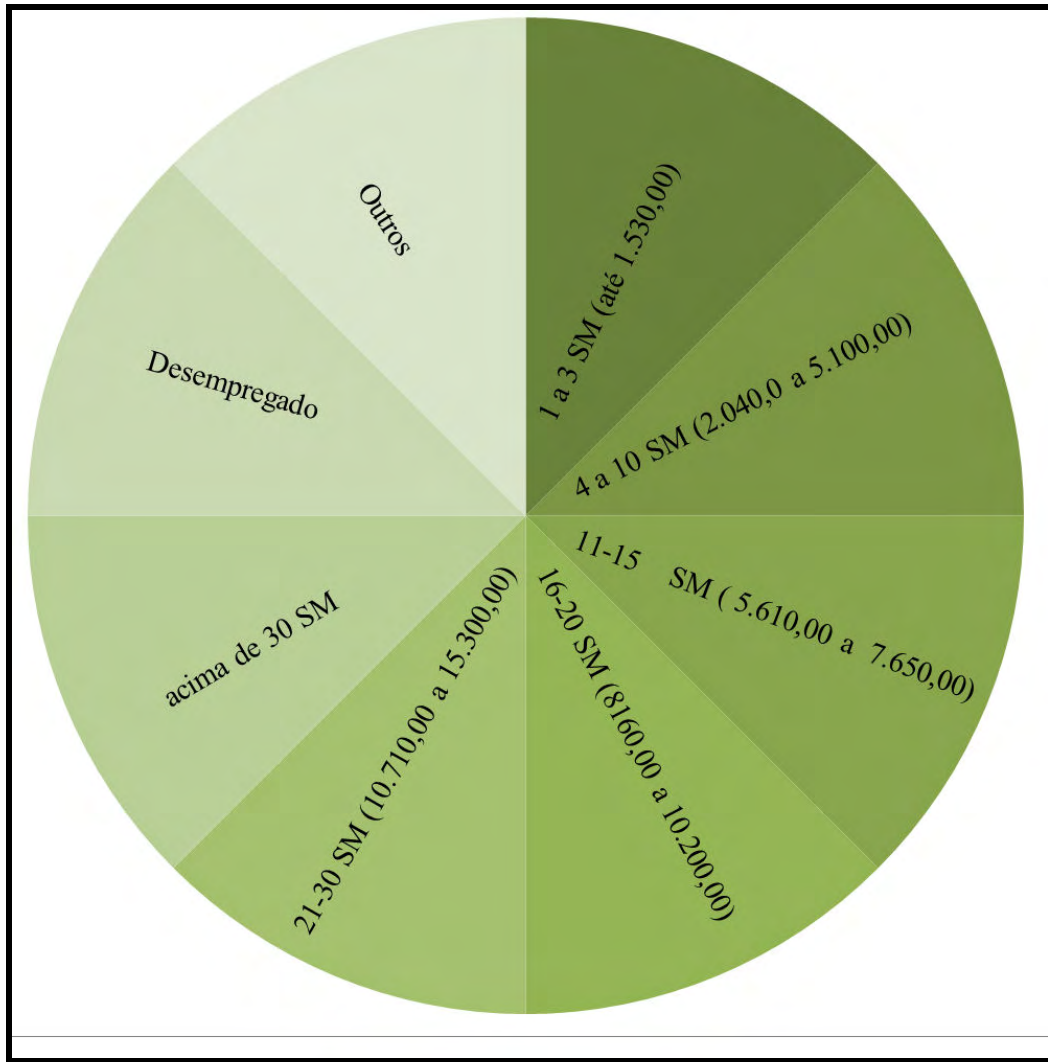


Figura 2.1- Exemplo de cartão utilizado para a pergunta “Em média, em qual categoria de renda familiar mensal você se enquadra?”

## 2.2- Amostragem.

Para definição do tamanho da amostra, utilizou-se a fórmula para amostras de populações infinitas (população estudada excede a 10.000) (TRIOLA, 2005):

$$n = \frac{z^2 \cdot \hat{p} \cdot \hat{q}}{E^2}$$

Em que:

$E$  = erro amostral;

$\hat{p}$  = proporção de favoráveis ao atributo pesquisado;

$\hat{q}$  = proporção de desfavoráveis ao atributo pesquisado;

Z= números de desvios padrão; e

n= tamanho da amostra.

Foram utilizados um nível de confiança de 95% da população e uma margem de erro  $E=0,05$ . Uma vez que as proporções de ocorrência da variável estudada na população não eram conhecidas, adotou-se  $p=q=0,50$ . Assim, foi constituída uma amostra estatisticamente significativa composta de no mínimo 385 consumidores residentes em Viçosa/MG.

Foram então aplicados 430 questionários aos entrevistados abordados aleatoriamente nos supermercados Amantino, Bahamas e Escola, no período de 4 a 15 de fevereiro de 2011. Porém, por erros de aplicação, foram considerados validos 400 questionários.

### **2.3- Análise dos resultados.**

Os entrevistados foram separados em 2 grupos: o primeiro grupo composto por portadores de insônia - entrevistados que relataram ter dificuldade para dormir sempre/eventualmente - e o segundo grupo formado por não portadores de insônia - entrevistados que relataram nunca/raramente ter dificuldades para dormir.

Para análise dos resultados da Escala de Epworth, foi somada as notas de 0 (nunca cochilar) a 3 (alta chance de cochilar) atribuídas pelos entrevistados nas ações relacionadas (sentado e lendo, assistindo à T.V, sentado inativo em uma reunião pública, como passageiro em um carro por uma hora sem, deitado à tarde em um momento de folga, sentado e conversando com alguém, sentado calmamente após o almoço, dirigir um carro que parou brevemente em uma sinal vermelho). Somas de notas que totalizaram de 0 a 9 foram classificadas como sonolência diurna normal, somas de 10 a 13 foram relatadas como sonolência diurna média, de 14 a 19, sonolência diurna moderada e de 20 a 23, sonolência diurna severa.

Para tabulação e análise dos dados referentes aos questionários aplicados, utilizou-se o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versão 15.0 licenciada. A estatística descritiva dos dados foi utilizada para interpretar as respostas dos questionários, e a tabulação cruzada e a correlação de Pearson, para relacionar as variáveis.

### 3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados revelam que problemas de sono atingem grande parte da população, uma vez que 20,3% dos entrevistados disseram apresentar dificuldades para dormir sempre, 18,3% relataram ter esta dificuldade eventualmente e apenas 36,8% dos entrevistados relataram nunca ter dificuldades de dormir (Figura 2.2).

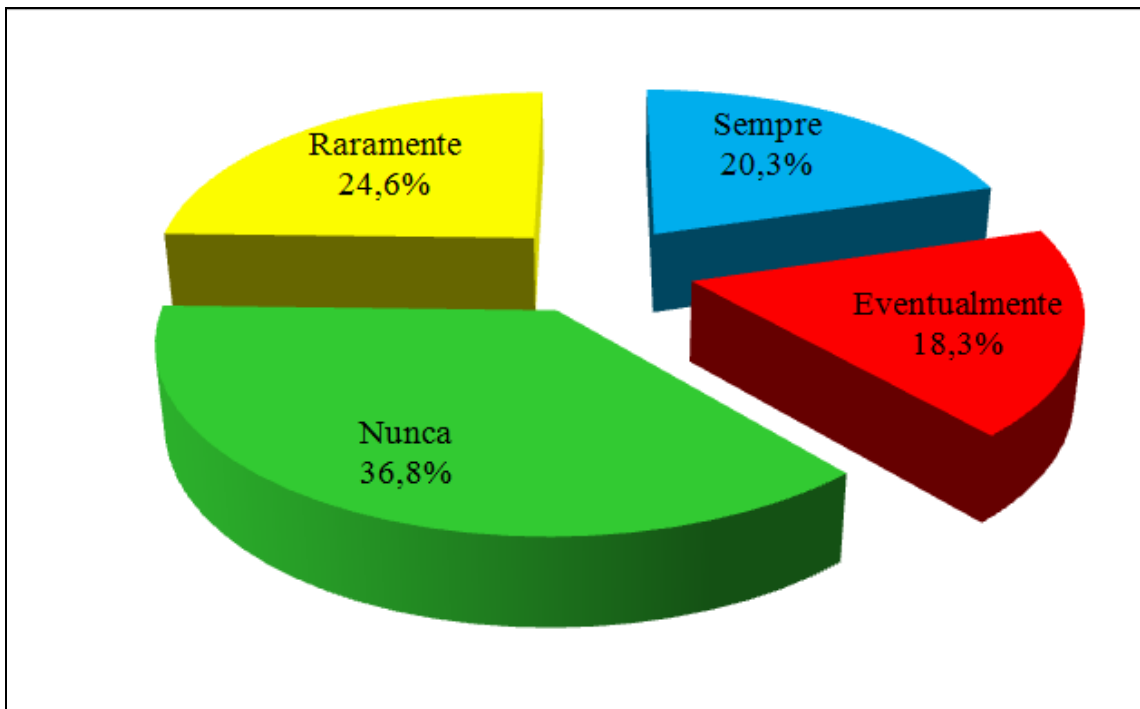


Figura 2.2-Percentual de pessoas com problemas de sono (■ apresentam problemas de sono sempre, ■ eventualmente apresentam problemas de sono, ■ raramente têm problemas de sono, ■ nunca apresentam problemas de sono).

Resultados semelhantes foram encontrados em outras localidades do mundo: os Estados Unidos, com 30,0% da população com insônia (ANCOLI-ISRAEL e ROTH, 1999); a Noruega, com 13,5% (SIVERTSEN et al., 2009); e a Coreia, com 22,8% (CHO et al., 2009).

Constatou-se que, além da alta incidência de problemas para dormir relatados como sintomologia dos próprios entrevistados, existe ainda alto índice de insônia nas famílias. Quando os entrevistados foram questionados sobre a existência de pessoas que apresentavam problemas de sono em suas residências, 58,0% dos entrevistados responderam conviver como pessoas com problemas de sono em suas casas.

A alta incidência de insônia mostra que existe um grande mercado para produtos que melhorem o sono, e a identificação das características deste mercado pode ser essencial para o desenvolvimento de um produto que atenda as necessidades dos consumidores.

O estresse também foi avaliado no questionário, e constatou-se que 72,3% da população afirma ter algum problema relacionado ao estresse. Entre os sintomas de estresse citados pelos entrevistados, destacam-se a ansiedade (68,0%), a irritabilidade (43,0%), a emocionalidade acentuada (23,2%), a hipertensão (18,3%) e as gastrites (16,5%). Apesar de os problemas de estresse não serem considerados distúrbios do sono, eles estão relacionados diretamente com o sistema circadiano, podendo este grupo de entrevistados ser incluído no mercado de produtos que melhorem o sono.

### **3.1- Grupo de portadores de insônia.**

Do total de entrevistados, 38,6% relataram ter insônia sempre ou eventualmente. A Figura 2.3 mostra as características deste grupo.

Foi observado que este grupo é representando por um alto percentual (44%) de pessoas com idade superior a 64 anos. Foi constatada, também, correlação positiva ao nível de 5% de probabilidade ( $r=0,63$ ) entre idade e frequência de insônia, reforçando a prevalência da insônia em pessoas com idade mais avançada.

Outros autores também encontraram resultados semelhantes. Orwoll et al. (2005) relataram que 48,0% de homens com idade superior a 64 anos apresentavam problemas de sono; os resultados de Foley et al. (1995) foram ainda superiores, 50,0% dos voluntários maiores de 64 anos apresentavam um sono pobre. Uma possível explicação para este resultado é a diminuição da produção de melatonina em pessoas mais velhas, pois, segundo Kennaway et al. (2008), a partir dos 40 anos de idade, inicia-se o declínio da síntese deste hormônio pelo organismo, o que pode prejudicar substancialmente a qualidade do sono. Este resultado caracteriza o mercado para produtos que melhorem o sono, voltado para pessoas mais velhas, que, por disfunções do organismo, têm sua qualidade do sono prejudicada e precisam utilizar alternativas saudáveis para conseguir dormir melhor.

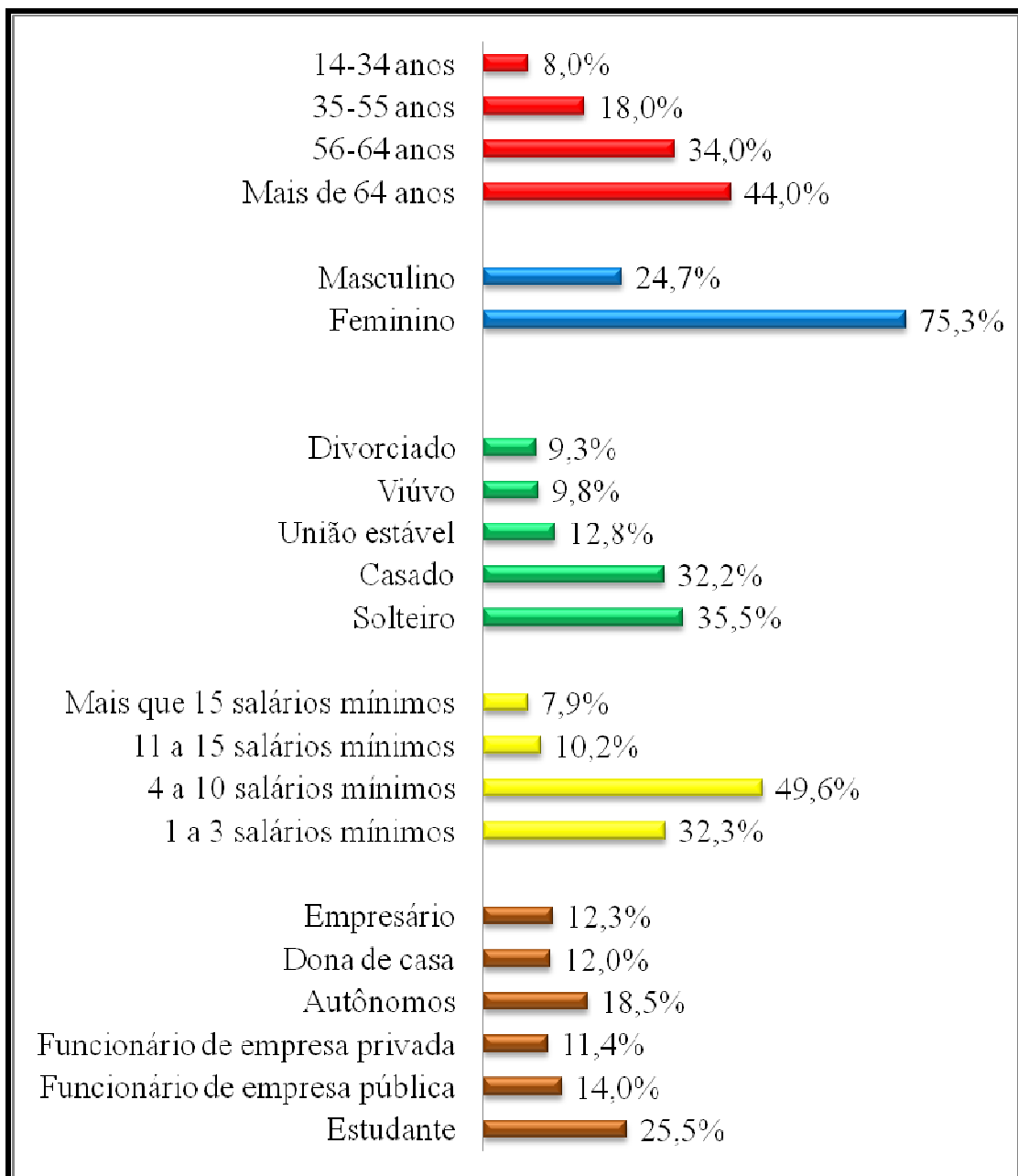


Figura 2.3- Perfil dos portadores de insônia.

Notou-se também que as mulheres sofrem mais com insônias que os homens, e entre os entrevistados deste grupo, 75,3% eram mulheres. Este resultado condiz com o encontrado por Chevalier et al. (1999) em pesquisa realizada no norte europeu, por Pallesen et al. (2001) em levantamento na Noruega e por Marchi et al. (2004) em estudo realizado em São José do Rio Preto, Brasil. Uma explicação para estes resultados pode ser os distúrbios hormonais femininos, pois, de acordo com Moline et al. (2002), o sono

das mulheres pode ser significativamente afetado por eventos como gravidez, período pós-parto, ciclo menstrual e menopausa. Com isto, o mercado feminino deve ser mais bem estudado e caracterizado para que possa ser desenvolvido um produto que atenda a este público.

Não foi observada relação entre os fatores atividade profissional, salário, grau de instrução e dificuldade para dormir, mostrando que os problemas de sono podem surgir em qualquer classe social ou em qualquer atividade profissional.

Os principais problemas relatados foram longo tempo de latência do sono, mexer muito na cama e acordar no meio da noite (Figura 2.4).

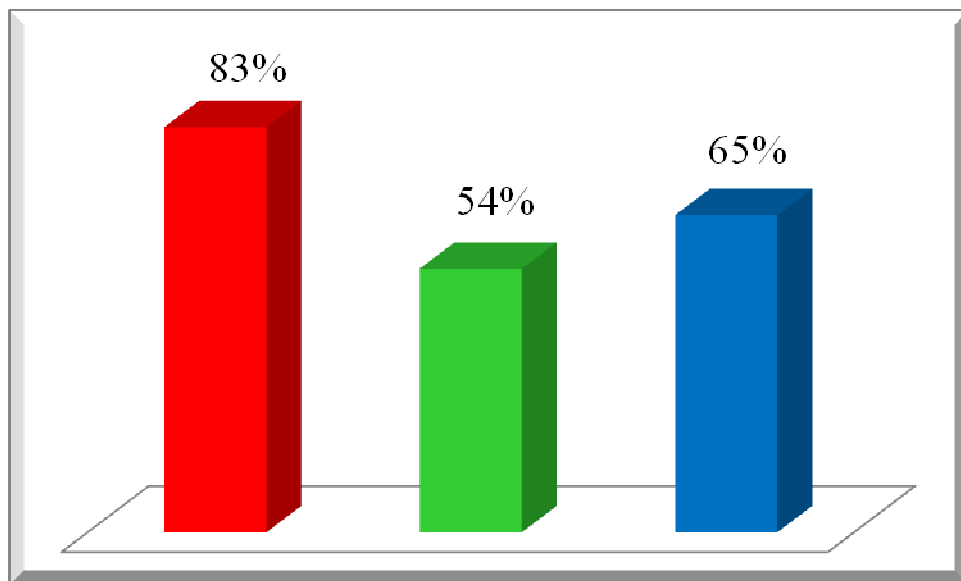


Figura 2.4- Principais problemas de sono relatado pelos portadores de insônia: ■ longo tempo de latência do sono, ■ mexer muito na cama, ■ acordar no meio da noite.

Estes resultados são similares aos de autores como Ohayon et al. (1997), que relataram que os principais sintomas da insônia são dificuldades para começar a dormir, despertar precoce e mexer muito na cama. De acordo com Ancoli-Israel e Roth (1999), os problema mais frequentemente relatados pelos portadores de insônia eram acordar no meio da noite e dificuldade iniciar o sono. Robert et al. (2002), em estudos com voluntários de 11-17 anos, observaram que a dificuldade para iniciar o sono e mexer muito na cama eram os sintomas de insônia que mais atingiam os adolescentes nos Estados Unidos.

Foram constatados baixos índices de distúrbios como apneia, roncos, síndrome das pernas inquietas e pesadelos (Figura 2.5).

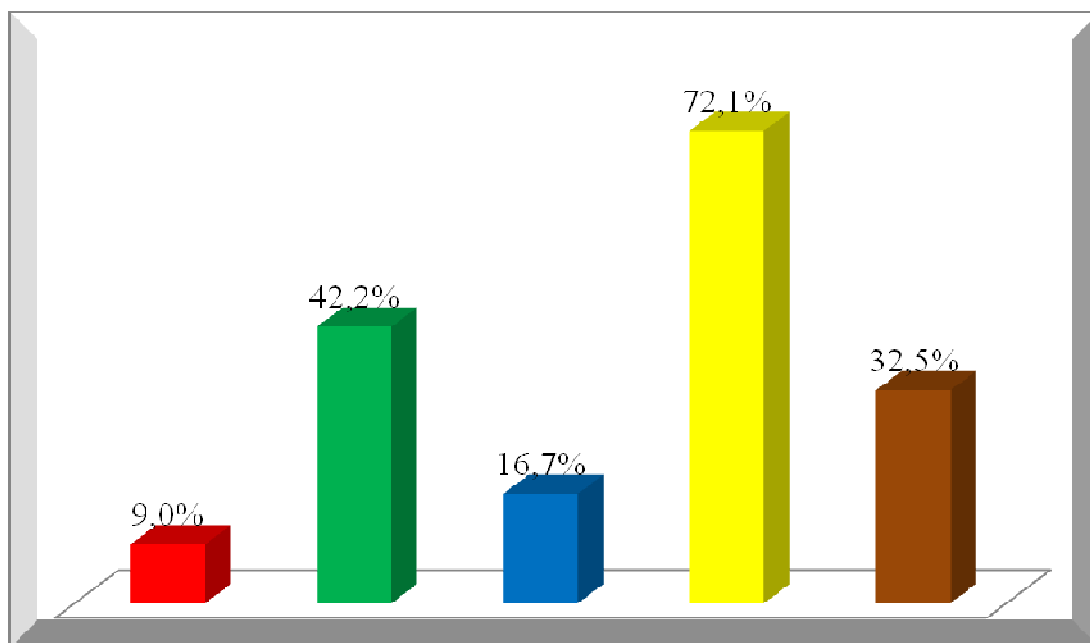


Figura 2.5- Distúrbios do sono relatados pelos portadores de insônia: ■ apneias, ■ roncoss, ■ síndrome das pernas inquietas, ■ sonhos, ■ pesadelos.

Outros autores encontraram prevalência da síndrome da perna inquietas semelhante à obtida neste trabalho. Allen e Earley (2000) relataram frequência da síndrome em 7,0% da população entrevistada nos Estados Unidos e Europa. Tison et al. (2005) estimaram que 8,5% da população francesa apresenta este distúrbio. Phillips et al. (2006) apresentaram prevalência de 9,7% na população americana.

Foi observado, usando a Escala de Sonolência de *Epworth* no questionário, que há alta incidência de sonolências diurnas (Figura 2.6).

A alta incidência de sonolência diurna pode ser explicada pelas noites mal dormidas causadas pela insônia. A sonolência diurna tem consequências importantes para o indivíduo, como prejuízo no desempenho das suas atividades profissionais, nas relações familiares e sociais, além de alteração no seu desempenho cognitivo, que constitui um risco aumentado para acidentes, tanto de trabalho quanto de trânsito (BERTOLAZI et al., 2008).

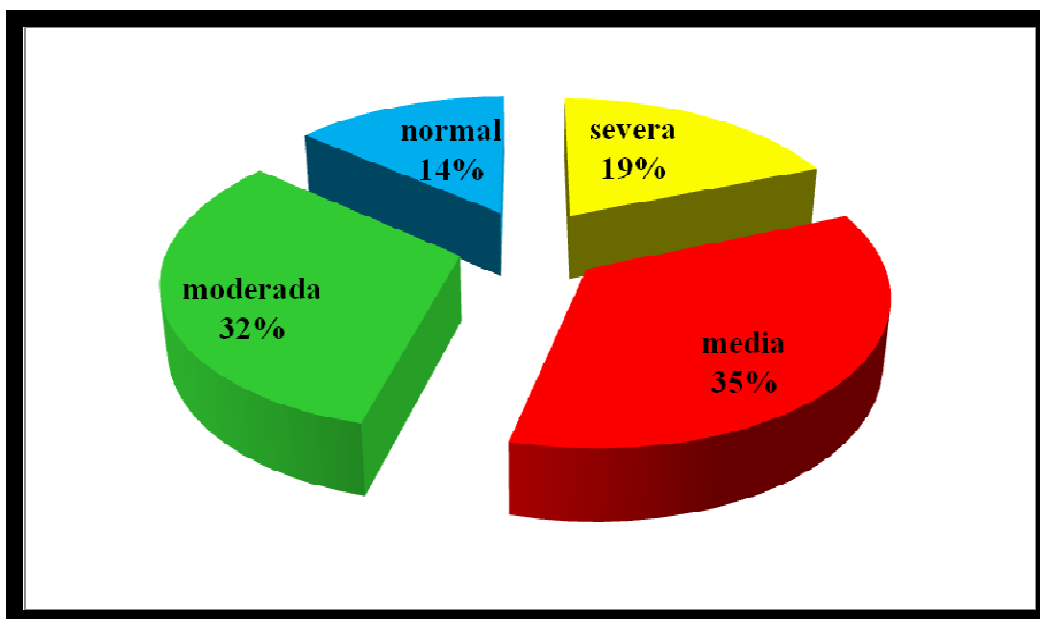


Figura 2.6- Sonolência diurna apresentada pelos entrevistados na escala de Sonolência de *Epworth*.

Existem evidências que relacionam diretamente a sonolência diurna com acidentes automobilísticos. Mello et al. (2000) realizaram um levantamento epidemiológico com 400 motoristas profissionais de mais de 20 empresas comerciais que operam em vários estados brasileiros. Neste estudo, 16% dos motoristas entrevistados relataram que já haviam cochilado enquanto dirigiam.

### 3.2- Grupo dos não portadores de insônia.

As características dos portadores de insônia são pessoas com idade média de 36 anos (faixa 14 a 64 anos), composto por 55,3% de homens e 44,7% de mulheres. Em relação ao estado civil, 32,5% declararam ser solteiros e 34,3%, ser casados. Quanto à renda familiar mensal, a maioria dos entrevistados (83,9%) afirmou ter renda mensal inferior a 10 salários mínimos, dos quais 52,3% afirmaram receber de 3 a 10 salários mínimos.

A amostra é caracterizada por pessoas com atividades profissionais variadas: 28,3% dos entrevistados são estudantes, 18,2% são funcionários públicos (federal, estadual ou municipal), 16,4% são autônomos, 10,1% são donas de casa, 17,4% dos entrevistados são empresários e 9,6% são funcionários de empresas privadas (Figura 2.7).

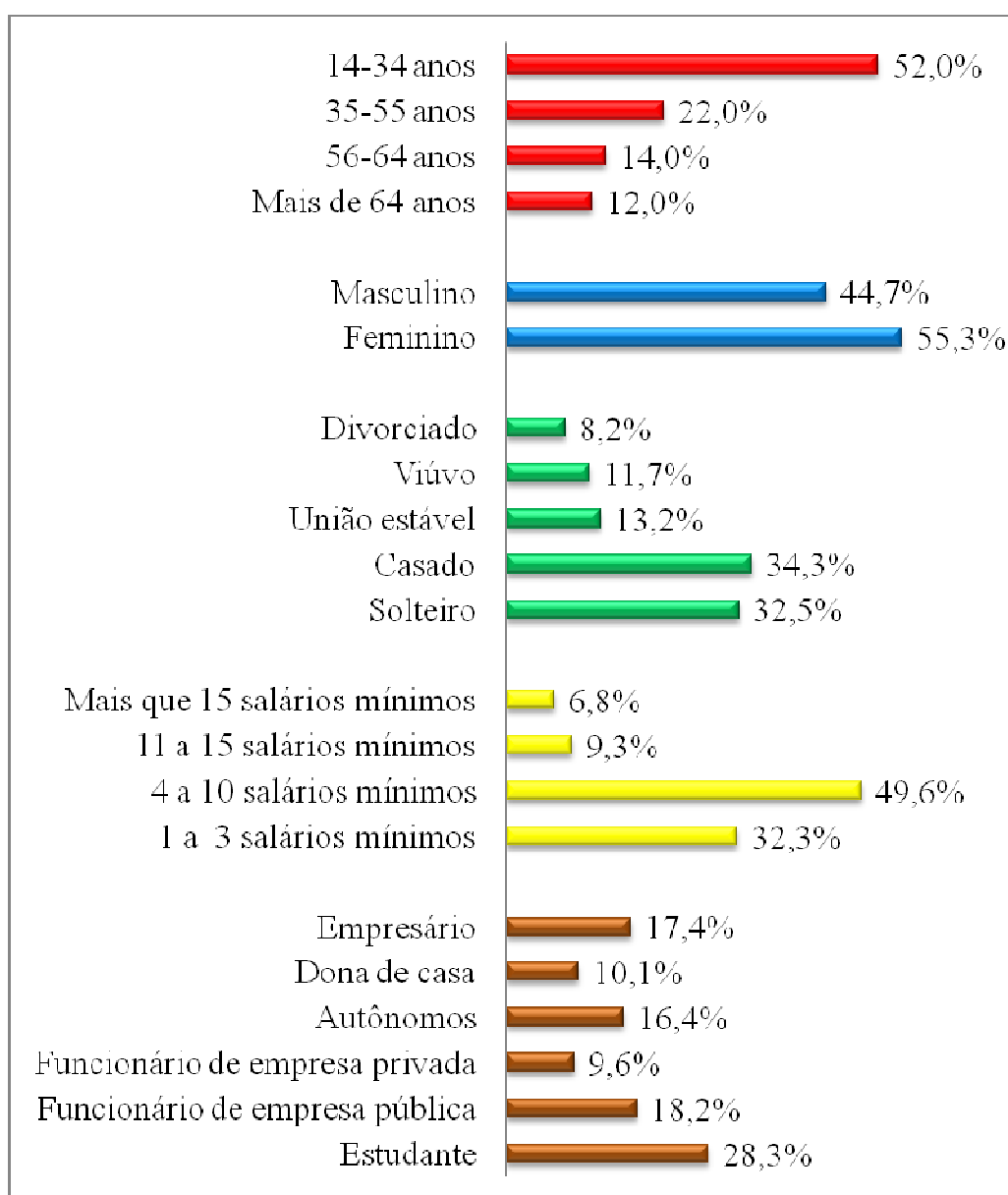


Figura 2.7- Perfil dos não portadores de insônia.

Dos entrevistados, 61,4% disseram não apresentar dificuldades para dormir ou apresentar raramente, porém foram relatadas durante o questionário alta frequência de problemas como ronco, apneia, síndrome da perna inquietada, sonolência diurna (Figura 2.8).

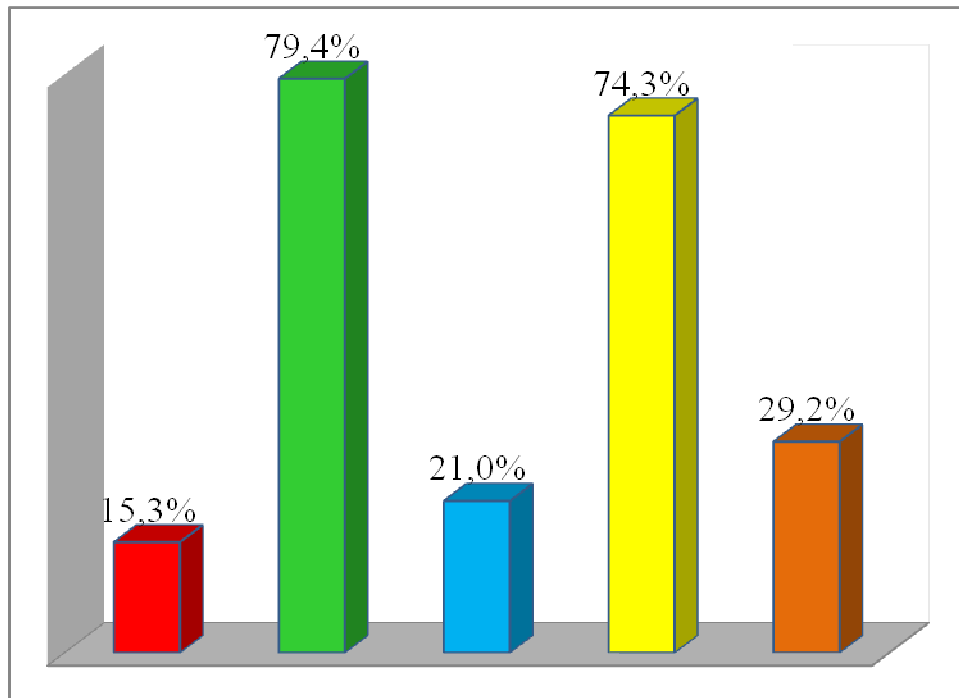


Figura 2.8- Distúrbios do sono relatados pelos não portadores de insônia: ■ paradas respiratórias, ■ roncos, ■ dormência/ câimbras nas pernas, ■ sonhos, ■ pesadelos.

Entrevistados que relataram não apresentar insônia disseram roncar, apresentar dificuldades respiratórias, ter dormência ou câimbras nas pernas, porém estes entrevistados não consideram estes problemas como insônias. Entretanto, de acordo com o *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (DSM IV), a insônia é definida como um distúrbio que se caracteriza pela dificuldade em adormecer ou manter o sono, além disso, a insônia também está relacionada à insatisfação com a qualidade do sono, resultando assim em um dia a dia com sintomas físicos e emocionais que têm um impacto sobre o desempenho social e cognitivo. Isto mostra que o número de casos de distúrbios do sono pode ser maior do que o diagnosticado.

Foi observado, usando a Escala de Sonolência de *Epworth* quando aplicado o questionário, que há alta incidência de sonolências diurnas (Figura 2.9). Somente 10,0% dos entrevistados apresentaram sonolência normal como resultado do teste, e a maioria (40,0%) apresentou sonolência moderada.

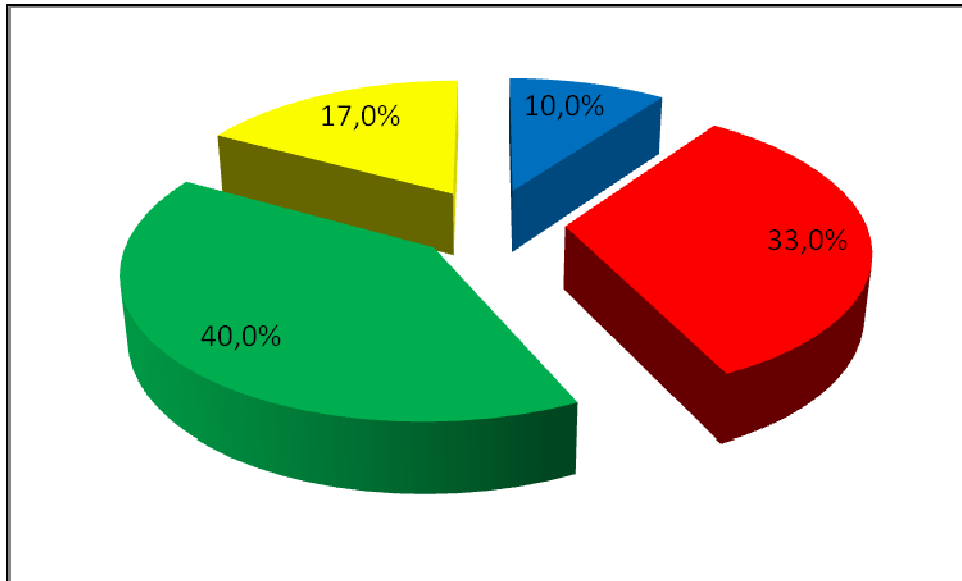


Figura 2.9- Sonolência diurna apresentada pelos entrevistados na escala de Sonolência de *Epworth*, ■ severa, ■ média, ■ moderada, ■ normal.

Quando os entrevistados foram questionados sobre dormir à tarde, 52,0% deles disseram dormir à tarde pelo menos 1 vez na semana, o que confirma a sonolência diurna diagnosticada na Escala de Sonolência de *Epworth*.

Foi observado alta sonolência diurna neste grupo de entrevistados. Este fato pode ser explicado pela insatisfação da noite de sono, ou seja, as pessoas acreditam que tiveram boa noite de sono, porém distúrbios como ronco, apneia, câimbras e dormências nas pernas podem ter piorado a qualidade do sono, provocando um sono não reparador.

#### 4-CONCLUSÃO

O questionário desenvolvido para este trabalho é uma ferramenta útil no levantamento de distúrbios do sono e na caracterização dos pacientes, podendo ser usado no estudo de mercado para produtos desenvolvidos para melhorar o sono.

Pelos resultados obtidos com o uso do questionário, foi possível concluir que problemas de sono atingem grande parte da população e se manifestam sob formas distintas como dificuldades em pegar no sono, mexer muito na cama, problemas respiratórios, roncos, pesadelos, podendo causar diversos problemas de saúde e estar relacionados com a presença de várias doenças.

Conclui-se pela existência de um nicho de mercado para produtos que melhorem a qualidade do sono, sendo necessário explorá-lo em seus vários segmentos. Produtos que melhorem o sono podem ser usados por portadores de insônia e também por pessoas que não declaram ter problemas de sono, mas que apresentam sintomas como apneia, ronco e sonolência diurna devida a noites de sono não reparadoras.

Constatou-se que o mercado para produtos que melhorem a qualidade do sono é caracterizado por mulheres e pessoas com idade superior a 50 anos, sendo esta informação útil para o desenvolvimento de estratégias de *marketing* para o produto.

## **5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALLEN, R.; EARLEY, C. Defining the phenotype of the restless legs syndrome (RLS) using age-of-symptom-onset. **Sleep Medicine**, v.1, p.11-19, 2000.

ANCOLI-ISRAEL, S. ; ROTH, T.Characteristics of insomnia in the United States: results of the 1991 National Sleep Foundation Survey. I. **National Sleep Foundation**, v.2, p.347:353, 1999.

BERTOLAZI, A. N.; FAGONDES, S. C.; HOFF, L. S.; PEDRO, V. D.; BARRETO, S. S. M.; JOHNS, M. W.; Validação da escala de sonolência de Epworth em português para uso no Brasil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.35, p. 877-883, 2009.

CHEVALIER, H.; LOS, F.; BOICHUT, D.; BIANCHI, M.; NUTT, D.J.; HAJAK, G.; HETTA, J.; HOFFMAN, G.; CROWE, C. Evaluation of severe insomnia in the general population: results of a European multinational survey. **Journal of Psychopharmacology**, v.13, p.21-24, 1999.

CHO, Y. W.; SHIN, W.C.; YUN, C. H.; HONG, S.B.; KIM, J.; EARLEY C.J. Epidemiology of Insomnia in Korean Adults: Prevalence and Associated Factors. **Journal of Clinical Neurology**, v.5, p.20-23, 2009.

FOLEY, D.J.; MONJAN, A.A.; BROWN, S.L.; SIMONSICK, E.M.; WALLACE, R.B.; BLAZER, D.G. Sleep complaints among elderly persons: an epidemiologic study of three communities. **Sleep**, v.18, p.425-432, 1995.

KENNAWAY, D. J.; WRIGHT, H. Melatonin and Circadian Rhythms. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.2, p.199-209, 2002.

KESSLER, R. C.; BERGLUND, P. A.; COULOUVRAT, C.; HAJAK, G.; ROTH, T.; SHAHLY, V.; SHILLINGTON, A. C.; STEPHENSON, J. J.; WALSH, J. K. . Insomnia and the Performance of US Workers: Results from the America Insomnia Survey, **Sleep**, v.34, p.1161-1171, 2011.

MARCHI, S. A.; REIMÃO, R.; TOGNOLA, W. A.; CORDEIRO, J. A. Analysis of the Prevalence of Insomnia in the Adult Population of São José do Rio Preto, Brazil. **Arquivos Neuropsiquiatria**, v.62, p.764-768, 2004.

MELLO, M. T.; SANTANA, M.G.; SOUZA, L.M.; OLIVEIRA, P.C.; VENTURA, M.L.; STAMPI, C.; Sleep patterns and sleep-related complains of Brazilian interstate bus drivers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v33, n.1, p. 71-7, 2000.

MINIM, V. P. R. **Análise Sensorial - Estudo com Consumidores**. 2ed. Viçosa, M.G. Editora da Universidade Federal de Viçosa, 308p, 2010.

MOLINE, M.L.; BROCH, L.; ZAK, R. Sleep in women from adulthood through menopause. **Sleep medicine**, v.2, p.105-114, 2004.

OHAYON, M.M.; CAULET, M.; PRIEST, R.G.; GUILLEMINAULT, C. *DSM-IV* and *ICSD-90* insomnia symptoms and sleep dissatisfaction. **Brazilian Journal Psychiatry**, v.171, p.382-388, 1997.

ORWOLL, M. M. Epidemiology of insomnia: what we know and what we still need to learn. **Sleep Medicine Reviews**, v.6, p.97–111, 2005.

PALLESEN, S.; NORDHUS, I. H.; NIELSEN, G.H. Prevalence of insomnia in the adult Norwegian population. **Sleep**, v.1, p.771-779, 2001.

PHILLIPS, B.; HENING, W.; BRITZ, P.; MANNINO, D. Prevalence and correlates of Restless Legs Syndrome results from the 2005 National Sleep Foundation Poll. **Sleep Medicine**, v.129, p.76-80, 2006.

RAM, S.; SEIRAWAN, H.; KUMAR, S.K.S.; CLARK, G.T Prevalence and impact of sleep disorders and sleep habits in the United States. **Sleep Breath**, v.14, p.63–70, 2010.

ROBERTS, R.E.; ROBERTS, C.R.; CHEN, I.G. Impact of insomnia on future functioning of adolescents. **Journal of Psychosomatic Research**, v.53, p.561-569, 2002.

SAMARA, B. S; BARROS, J.C . **Pesquisa de Marketing: conceitos e metodologia**. 3 ed. São Paulo. Pearson-Prentice Hall, 2002.

SIVERTSEN, B.; KROKSTAD, S.OVERLAN, S.; MYKLETUN, A. The epidemiology of insomnia: Associations with physical and mental health. The HUNT-2 study. **Journal of Psychosomatic Research**, v.67, p. 109–116, 2009.

SOUZA, J. C.; SOUZA, N. Insomnia and the use of hypnotic drugs in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Sleep science**, v.2, p.147-150, 2009.

SWEEREY, Y.; KERKHOF, G. A.; WEERD, A. W.; KAMPHUISEN, H. A. C.; KEMP, B.; SCHIMSHEIMER, R. J. The validity of the Dutch Sleep Disorders Questionnaire (SDQ). **Journal of psychosomatic research**, v.45, p.549-555, 1998.

TISON, F.; CROCHARD, A.; LEGER, D.; BOUÉE, S.; LAINEY, E. ; HASNAOUNI, A. Epidemiology of restless legs syndrome in French adults a nationwide survey: The Instant Study. **Neurology**, v.65, p.239-246.

TOGEIRO, S. M. G. P.; SMITH, A. K. Métodos diagnósticos nos distúrbios do sono. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.27, p. 8-15, 2005.

TRIOLA, M. F. **Introdução à estatística**. 9<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, LCT, 665p, 2005.

## Influência do horário de ordenha na concentração de melatonina no leite de vaca.

---

### 1-INTRODUÇÃO

A melatonina é responsável pela regulação circadiana e pelo controle do sono, sendo encontrada em maior concentração no organismo durante a noite (TAMURA et al., 2009). Com o envelhecimento, ocorre uma redução substancial na produção de melatonina, podendo prejudicar a qualidade do sono de idosos (KENNAWAY et al., 2008).

A melatonina está presente naturalmente em vários alimentos, como, por exemplo, cereja, banana, hortelã, vinho tinto e no leite (DAWSON e ENCEL, 1993). A melatonina não é considerada aditivo alimentar pela Lista Geral Harmonizada de Aditivos Alimentares e suas Classes Funcionais do Mercosul (MERCOSUL/GMC/RES Nº 11/2006), não sendo permitida sua adição aos alimentos.

O leite de vaca contém em torno de 5 pg/mL de melatonina, e estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de aumentar naturalmente a concentração do composto por técnicas de ordenha. Valtonen et al. (2001) mostraram ser possível aumentar a concentração de melatonina para 56,4 pg/mL com mudanças nos fotoperíodos das vacas, aumentando o período dos animais no escuro para 17 horas. Enquanto Haigh (2003) aumentou a concentração de melatonina no leite em até 35 pg/mL, com ordenhas noturnas com iluminação máxima de 50 lux, Gnann (2009) desenvolveu um método para aumentar naturalmente a melatonina no leite, baseado na exposição do animal à luz em diferentes comprimentos de onda, durante o dia e à noite e posteriores ordenhas noturnas.

O triptofano é um aminoácido essencial, precursor da síntese de melatonina pela glândula pineal, atuando na melhoria do sono, além da redução do estresse e efeitos antioxidantes. Tormo et al. (2004) e Sanches et al. (2008) demonstraram ser possível o aumento da concentração de melatonina plasmática por meio da administração de triptofano.

Até o momento, não existem informações relacionadas à adição de triptofano ao leite e também não se conhece a concentração de melatonina no leite produzido por vacas no Brasil. Sabe-se que a concentração de melatonina do leite pode variar com a raça, alimentação, nível de estresse do animal e temperatura do ambiente (HARAGUCHI et al., 2006). Diante deste contexto, o presente trabalho objetivou a obtenção e avaliação biológica do leite coletado da ordenha noturna e acrescido de triptofano.

## 2-MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1- Ordenha dos animais.

Para a ordenha, foram selecionados 10 vacas com idade entre 3 a 7 anos, raça holandesa, com peso médio de 580 kg, produção média de 25 L/dia, e período de lactação de 100 a 150 dias pós-parto, do estábulo leiteiro da Universidade Federal de Viçosa. O experimento foi conduzido em Blocos Inteiramente Casualizados e cada vaca representou um bloco.

Não houve intervenção nas dietas dos animais, sendo alimentados de acordo com rotina do estábulo leiteiro, de forma *ad libitum*, com silagem de milho e ração, conforme Tabela 3.1.

Tabela 3.1- Composição das dietas das vacas.

Composição	g/100g
Silagem de milho	71,42
Fubá de Milho	13,00
Farelo de Soja	13,69
Mistura mineral e vitaminica	1,87

A ordenha ocorreu em dois horários, às 02h00min. e às 15h00min., durante 15 dias, no período de 2 a 16 de junho de 2011, sendo fixada a estação do outono.

Os animais foram submetidos a um período de 5 dias de adaptação ao novo horário de ordenha, antes do início do experimento, para que o estresse do animal não prejudicasse a produção de melatonina. Neste período, os animais foram ordenhados nos horários de 02h00min. e 15h00min., porém o leite obtido não constituiu amostra experimental.

Após o período de adaptação dos animais, seguiu-se o período experimental de coleta de amostra. As 10 vacas foram ordenhadas primeiramente às 02h00min. e depois às 15h00min..

Após as ordenhas, as amostras (leite de cada vaca e de cada horário) coletadas foram imediatamente congeladas a -16 °C e, posteriormente, analisadas quanto à concentração de melatonina.

## **2.2- Determinação da concentração de melatonina nos leites.**

A determinação de melatonina no leite foi feita de acordo metodologia de Kollmann et al. (2008). Inicialmente procede-se à extração de gordura das amostras de leite de cada vaca e de cada ordenha, cujo processo de extração consistiu em centrifugação a uma rotação de 3300 g por 15 minutos a 4 °C. Em seguida, a fase desengordurada do leite que se formou depois da centrifugação foi diluída 1:10 com Padrão A, contido no kit analítico referenciado como 0 µg/mL, procedendo-se ao ensaio imunoenzimático para determinação direta e quantitativa de melatonina (IBL-international, RE54041).

## **2.3- Desenvolvimento das formulações e análise físico-química e microbiológicas.**

Para a produção das formulações L<sub>15h</sub> e L<sub>2h</sub>, o leite coletado nas ordenhas das 15h00min. e das 2h00min. respectivamente, foram desnatado até 0,3% de gordura e tratado termicamente a 75 °C por 5 segundos. Em seguida, procedeu-se à liofilização das formulações. As amostras de leite desnatadas e pasteurizadas foram pesadas, colocadas em bandejas de aço inoxidável e submetidas à temperatura de - 35°C por três dias, para garantir o congelamento total. Posteriormente, foram transferidas para o liofilizador semi-industrial, marca Terroni, modelo LH 0500, cuja temperatura do condensador variou entre - 50 °C e - 55 °C, por um período de 24 horas.

Para a produção da formulação L<sub>2h</sub>T, o leite coletado por meio de ordenhas às 2h00min. foi desnatado até 0,3% de gordura. Em seguida, o leite foi aquecido a 40°C e adicionado de 2,5 g/L de triptofano, sendo posteriormente realizado o tratamento térmico de 75 °C por 5 segundos. A formulação L<sub>2h</sub>T foi então liofilizada, com a mesma metodologia descrita para as formulações L<sub>15h</sub> e L<sub>2</sub>.

A quantidade de triptofano usada na formulação L<sub>2h</sub>T foi baseada no trabalho de Sanches et al. (2008), que mostraram ser possível o aumento da concentração de melatonina plasmática de ratos wistar com a administração 125 mg/dia de triptofano.

O desnate dos leites de todas as formulações foi necessário para não superar o teor de gordura da dieta experimental dos ratos wistar, estabelecido pela AIN-93M (REEVES et al., 1993). Em seguida, o leite foi tratado termicamente a 75 °C por 5 segundos.

As formulações foram submetidas às análises físico-químicas e microbiológicas, com o objetivo de definir a composição centesimal e verificar a segurança alimentar.

Foram determinados teor de gordura (método butirométero- Instituto Adolfo Lutz, 1985), acidez titulável (APHA, 2001), densidade (Instituto Adolfo Lutz, 1985), proteína (método Kjeldahl- Instituto Adolfo Lutz, 1985), crioscopia (APHA, 2001), contagem padrão em placas (APHA, 2001), contagem de coliforme a 35 °C NMP/mL (APHA, 2001) e contagem de coliforme a 45 °C NMP/mL (APHA, 2001).

#### **2.4- Ensaio biológico.**

O experimento foi realizado após a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA-UFMG), de acordo com protocolo 026/2010.

O ensaio biológico foi realizado com ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, classe *Rodentia*), linhagem Wistar, com 65 dias de vida, peso variando de 300 a 350 g, fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, MG.

Foram utilizados 4 grupos experimentais (n=8): um grupo controle com dieta padrão de caseína e três grupos teste, com dietas contendo leite ordenhado às 15h00min. (L<sub>15h</sub>), leite com concentração aumentada de melatonina obtido de ordenhas às 2h00min. (L<sub>2h</sub>) e leite com concentração aumentada de melatonina obtido de ordenhas às 2h00min. adicionado de triptofano (L<sub>2h</sub>T). Os animais foram distribuídos em gaiolas

individuais, submetidos às condições de temperatura e luminosidade controlada a  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas, tendo recebido água e dieta *ad libitum*, durante 30 dias.

A composição das dietas foi baseada na AIN-93M (REEVES et al., 1993) (Tabela 3.2), porém, 50% da necessidade proteica dos animais foi substituída, nas dietas testes, pelas proteínas das formulações liofilizadas.

Tabela 3.2- Composição da dieta dos ratos em g/100g.

Composição AIN-93M	Controle	L <sub>15h</sub>	L <sub>2h</sub>	L <sub>2h</sub> T
Caseína (85%)	14,00	7,00	7,00	7,00
Leite em pó	0,00	27,45	27,45	27,45
Amido dextrinizado (90- 94% tetrassacarídeos)	15,50	15,50	15,50	15,50
Sacarose	10,00	10,00	10,00	10,00
Óleo de soja	4,00	3,00	3,00	3,00
Fibra (celulose)	5,00	5,00	5,00	5,00
Mistura salínica	3,50	3,50	3,50	3,50
Mistura vitamínica	1,00	1,00	1,00	1,00
L-Cistina	0,18	0,18	0,18	0,18
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25
Amido q.s.p.	46,57	27,12	27,12	27,12

L<sub>15h</sub>- Leite coletado de ordenhas realizadas às 15h:00min.; L<sub>2h</sub>- Leite coletado de ordenhas realizadas às 2h:00min.; L<sub>2h</sub>T- Leite coletado de ordenhas realizadas às 2h:00min., adicionado de triptofano.

Aos 28 dias de experimentação, os animais foram transferidos para gaiolas metabólicas individuais de aço inoxidável, com o intuito de se coletar a urina de 48 horas de cada animal para análise de 6-sulfatoximetatonina. A análise de 6-sulfatoximetatonina foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (IBL-international, RE54031).

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados sob atmosfera de dióxido de carbono, segundo Resolução 714 do Conselho Federal de Medicina

Veterinária, procedendo-se à incisão das cavidades abdominal e torácica para coleta de sangue por punção cardíaca.

A análise de melatonina foi realizada no sangue de todos os animais dos quatro grupos - dieta L<sub>15h</sub>, dieta L<sub>2h</sub>, dieta L<sub>2h</sub>T, controle CAS - utilizando ensaio imunoenzimático para a determinação quantitativa, em diagnóstico *in vitro*, de melatonina em soro e plasma humano (IBL-international, RE54021).

Os tratamentos experimentais foram dispostos em um delineamento inteiramente casualizado com 8 repetições. Os resultados da concentração de melatonina e de sulfatoximelatonina foram avaliados pelo teste t para amostras pareadas. Também foram comparados os pesos iniciais e finais dos animais, ganho de peso e consumo de dieta, leite e melatonina por análise de variância, seguida de teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Statistical Analysis Systems (SAS), versão 9.1, licenciado para a Universidade Federal de Viçosa.

### **3-RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A Tabela 3.3 apresenta o resumo da análise de variância da concentração de melatonina no leite.

Observa-se que as interações entre vaca<sub>x</sub>dia e vaca<sub>x</sub>hora não foram significativas ( $p>0,05$ ). Também não foi observada diferença significativa na concentração de melatonina no leite quando os fatores de variação avaliados foram vaca e dia. Entretanto, foi observada diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre os horários de ordenha.

Apesar de a produção de melatonina ser influenciada por fatores como genética e estado psicológico, os animais apresentaram produção de melatonina em concentrações similares.

Houve diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre os horários de ordenha, sendo que o leite das 2h00min. apresentou maior teor de melatonina (39,43 pg/mL) que o leite das 15h00min. (4,03 pg/mL). Estes resultados estão coerentes com aqueles encontrados por Eriksson et al. (1998), que observaram aumento da concentração de melatonina em leites de vacas ordenhadas à noite.

Tabela 3.3- Análise de variância do experimento de ordenha dos animais (Delineamento em Blocos Casualizados).

FV	GL	QM	Pr > F
Vaca	9	10,7146	0,5617
Dia	9	17,7306	0,1885
Hora	1	64029,0269	<0,0001
Vaca*Dia	81	15,9031	0,1270
Vaca*Hora	9	8,9629	0,6882

A técnica desenvolvida é uma metodologia que permite aumento significativo da concentração de melatonina no leite, sem grandes investimentos financeiros, mudando somente o horário de ordenha, diferentemente das metodologias de Valtonen et al. (2001), Haigh (2003) e Gnann (2009), que envolvem o uso de iluminação artificial e a criação de gado em confinamento. Como a grande parte da produção de leite no Brasil ocorre em condições de manejo semiextensivo, a metodologia de produção de leite com alta concentração de melatonina proposta por Valtonen et al. (2001), Haigh (2003) e Gnann (2009) torna-se inviável para o produtor rural brasileiro, sendo necessários grandes investimentos para utilização da metodologia. Sendo assim, o uso da técnica de ordenha noturna pode ser uma alternativa para o produtor de leite brasileiro aumentar a concentração de melatonina no leite de forma viável com as condições econômicas e produtivas deste setor no Brasil.

### 3.1 -Ensaio Biológico

A composição físico-química dos leites usados no experimento encontra-se na Tabela 3.4, estando de acordo com o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite do Ministério da Agricultura (Instrução Normativa n° 62/2011).

Tabela 3.4- Composição físico-química das amostras.

<b>Componentes</b>	<b>L<sub>15h</sub><sup>*</sup></b>	<b>L<sub>2h</sub><sup>*</sup></b>	<b>L<sub>2h</sub>T<sup>*</sup></b>
Gordura (g/100g)	0,30	0,32	0,32
Densidade relativa 15 °C (g/mL)	1,03	1,03	1,03
Acidez titulável (g/100g)	0,16	0,15	0,15
Proteína (g/100g)	3,10	3,20	3,20
Melatonina (pg/mL)	4,20	36,72	36,23

L<sub>15h</sub>- Leite coletado de ordenhas realizadas às 15h00min.; L<sub>2h</sub>- Leite coletado de ordenhas realizadas às 2h00min.; L<sub>2h</sub>T- Leite coletado de ordenhas realizadas às 2h00min., adicionado de triptofano.

A caracterização microbiológica das amostras também está de acordo com a referida Instrução Normativa (Tabela 3.5)

Tabela 3.5- Caracterização microbiológica dos leites.

<b>Componentes</b>	<b>L<sub>15h</sub><sup>*</sup></b>	<b>L<sub>2h</sub><sup>*</sup></b>	<b>L<sub>2h</sub>T<sup>*</sup></b>
Contagem Padrão em Placa (UFC/mL)	4,7x10 <sup>3</sup>	2,0 x10 <sup>3</sup>	8,7x10 <sup>3</sup>
Contagem de coliforme a 35 °C NMP/mL	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Contagem de coliforme a 45 °C NMP/mL	< 0,3	< 0,3	< 0,3

L<sub>15h</sub>- Leite coletado de ordenhas realizadas às 15h00min.; L<sub>2h</sub>- Leite coletado de ordenhas realizadas às 2h00min.; L<sub>2h</sub>T- Leite coletado de ordenhas realizadas às 2h00min., adicionado de triptofano.

Os dados relacionados ao ganho de peso e consumo alimentar dos ratos estão apresentados na Tabela 3.6.

Os animais do grupo controle, que receberam dieta de caseína, apresentaram maior peso corpóreo final que os animais dos grupos teste ( $p < 0,05$ ), apesar de não ter sido verificada diferença significativa entre o consumo alimentar. A capacidade de a melatonina reduzir o ganho de peso corpóreo também foi verificada por Rasmussen et al. (1999) em experimento com ratos de meia-idade.

Tabela 3.6- Peso inicial e final dos animais, ganho de peso e consumo de dieta, leite e melatonina dos animais.

	PESO			CONSUMO		
	Inicial (g)*	Final (g)*	Ganho (g)*	Dieta (g)*	Leite (g)*	Melatonina (ng)*
Caseína	330,14 <sup>a</sup>	421,43 <sup>a</sup>	91,29 <sup>a</sup>	947,48 <sup>a</sup>	260,08 <sup>a</sup>	< 0,50 <sup>a</sup>
L <sub>15h</sub>	337,66 <sup>a</sup>	397,76 <sup>b</sup>	60,10 <sup>b</sup>	932,27 <sup>a</sup>	255,91 <sup>a</sup>	6,82 <sup>b</sup>
L <sub>2h</sub>	332,16 <sup>a</sup>	404,32 <sup>b</sup>	72,16 <sup>b</sup>	903,89 <sup>a</sup>	248,12 <sup>a</sup>	58,73 <sup>c</sup>
L <sub>2h</sub> T	339,28 <sup>a</sup>	406,83 <sup>b</sup>	67,55 <sup>b</sup>	915,95 <sup>a</sup>	251,43 <sup>a</sup>	56,93 <sup>c</sup>

Resultados expressos após 30 dias de experimentação com ratos adultos alimentados com dietas contendo L<sub>15h</sub>- Leite coletado de ordenhas realizadas às 15h00min.; L<sub>2h</sub>- Leite coletado de ordenhas realizadas às 2h00min.; L<sub>2h</sub>T- Leite coletado de ordenhas realizadas às 2h00min., adicionado de triptofano. \*Letras diferentes na mesma coluna indicam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

O grupo controle não diferiu ( $p > 0,05$ ) do L<sub>15h</sub> em relação aos teores de melatonina sanguínea e de sulfatoximelatonina urinária, indicando que o leite ordenhado às 15h00min. não tem capacidade de aumentar a melatonina sanguínea (Tabela 3.7). Segundo Wulff et al. (2006), a coleta de urina para análise de 6-sulfatoximelatonina é uma alternativa ao uso da actigrafia para o controle do ciclo circadiano. Já de acordo com Benloucif et al. (2005), a determinação da melatonina plasmática é a forma mais estável e mais altamente correlacionada com o tempo de sono.

Tabela 3.7- Comparação entre a concentração de melatonina e sulfatoximelatonina nos grupo controle e L<sub>15h</sub>.

	ESCORES MÉDIOS		p- valor*
	Grupo controle	Grupo L <sub>15h</sub>	
Melatonina pg/mL	30,83	35,04	0,2631
Sulfatoximelatonina ng/mL	50,22	60,13	0,9528

\*p-valor obtido usando teste t para amostras pareadas. Controle - Grupo que se alimentou de dieta padrão de caseína. L<sub>15h</sub>- Grupo que se alimentou de dieta contendo leite coletado de ordenhas realizadas às 15h00min.

Já o grupo L<sub>2h</sub> diferiu significativamente do grupo L<sub>15h</sub> (p<0,05), tendo apresentado maiores níveis de melatonina e sulfatoximelatonina (Tabela 3.8).

Tabela 3.8- Comparação entre a concentração de melatonina e sulfatoximelatonina no grupo L<sub>15h</sub> e L<sub>2h</sub>.

	ESCORES MÉDIOS		p- valor*
	Grupo L <sub>15h</sub>	Grupo L <sub>2h</sub>	
Melatonina pg/mL	35,04	44,36	< 0,0001
Sulfatoximelatonina ng/mL	60,13	78,20	< 0,0001

\*p-valor obtido usando teste t para amostras pareadas. L<sub>15h</sub>- Grupo que se alimentou de dieta contendo o leite coletado de ordenhas realizadas às 15h00min.; L<sub>2h</sub>- Grupo que se alimentou de dieta contendo leite coletado de ordenhas realizadas às 2h00min.

Quando comparadas as formulações L<sub>2h</sub> e L<sub>2h</sub>T, Tabela 3.9, observou-se diferença significativa (p<0,05) entre os grupos em relação aos níveis de melatonina sanguínea e de sulfatoximelatonina urinária, tendo o grupo L<sub>2h</sub>T sido responsável pelos maiores níveis de melatonina e sulfatoximelatonina.

Tabela 3.9- Comparação entre a concentração de melatonina e sulfatoximelatonina no grupo L<sub>2h</sub> e L<sub>2h</sub>T.

	ESCORES MÉDIOS		p- valor*
	Grupo L <sub>2h</sub>	Grupo L <sub>2h</sub> T	
Melatonina pg/mL	44,36	60,12	< 0,0001
Sulfatoximelatonina ng/mL	78,20	95,76	< 0,0001

\*p-valor obtido usando teste t para amostras pareadas. L<sub>2h</sub>- Grupo que se alimentou de dieta contendo leite coletado de ordenhas realizadas às 2h:00min.; L<sub>2h</sub>T - Grupo que se alimentou de dieta contendo leite coletado de ordenhas realizadas às 2h:00min., adicionado de triptofano.

O aumento da ingestão de triptofano aumentou a concentração de melatonina plasmática. Outros autores também observaram maiores níveis de melatonina no sangue

de ratos após aumento de ingestão de triptofano. Tormo et al. (2004) observaram elevação plasmática de melatonina após administração oral de 125 mg/dia de triptofano em ratos. Sanches et al. (2008) analisaram os níveis de melatonina ao longo de um período de 24 horas em ratos Wistar após a administração oral de 125 mg/dia de triptofano e verificaram aumento da concentração de melatonina no sangue dos animais.

As formulações L<sub>2h</sub> e L<sub>2h</sub>T aumentaram significativamente a melatonina plasmática e a sulfatoximetatonina urinária, sendo estes marcadores bons indicadores do tempo de sono.

#### **4-CONCLUSÃO**

A técnica de ordenha noturna aumenta a concentração de melatonina no leite e permite o desenvolvimento de um produto natural que melhora a qualidade do sono.

As formulações utilizando leite de ordenhas noturnas aumentaram a melatonina plasmática e a sulfatoximetatonina urinária de ratos. O leite obtido da ordenha noturna e acrescido de triptofano foi mais eficiente no aumento de melatonina sanguínea e sulfatoximetatonina urinária em ratos wistar.

#### **5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

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

BRASIL, 2011. Instrução Normativa Nº 62, de 29 de Dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2006.

BENLOUCIF, S.; GUICO, M. J.; REID, K. J.; WOLFE L. F.; HERMITE-BALÉRIAUX, M. L.; ZEE, P. C. Stability of Melatonin and Temperature as circadian Phase Markers and Their Relation to Sleep Times in Humans. **Journal of Biological Rhythms**, v.20, p.178-188, 2005.

DAWSON D.; ENCEL N. Melatonin and sleep in humans. **Journal of Pineal Research**, v.15, p.1-12, 1993.

ERIKSSON, L.; VALTONEN, M. ; LAITINEN, J. T.; PAANANEN, M.; KAIKKONEN, M. Diurnal rhythm of melatonin in bovine milk: pharmacokinetics of exogenous melatonin in lactating cows and goats. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.39, p. 301-310, 2008.

GNANN, T. **Method for the production of milk or milk products with a high proportion of melatonin**. United States Patent 8003130, 2009.

HAIGH, B. S. **Method for producing milk with an enhanced content of naturally expressed melatonin**, UK PATENT APPLICATION; 2 387 009 A, 2003.

HARAGUCHI, F. K. , ABREU, W. C., PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista da Nutrição**, v.19, p.479-488, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985.

KENNAWAY, D. J.; WRIGHT, H. Melatonin and Circadian Rhythms, **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.2, p.199-209, 2002.

KOLLMANN. M. T.; LOCHER. M.; HIRCHE. F.; EDER. K.; MEYER. H. H. D.; BRUCKMAIER. R. M. Effects of tryptophan supplementation on plasma tryptophan and related hormone levels in heifers and dairy cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v.34, p.14-24, 2008.

MERCOSUL, 2006 Lista Geral Harmonizada de Aditivos Alimentares e Suas Classes Funcionais do Mercosul (MERCOSUL/GMC/RES N° 11/2006)

RASMUSSE, D. D.; BOLDT, B. M.; WILKINSON, C.W.; YELLON, S.M.; MATSUMOTO, A.M. (1999) Daily melatonin administration at middle age suppresses

male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels, **Endocrinology**, v.140, p.1009–1012, 1999.

REEVES, P. G. ; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **Journal of Nutrition**, v.123, p.1939-1951, 1993.

SÁNCHEZ, S.; SÁNCHEZ, C. L.; PAREDES, S. D.; RODRIGUES, A. B.; BARRIGA, C. The effect of tryptophan administration on the circadian rhythms of melatonin in plasma and the pineal gland of rats. **Journal of Applied Biomedicine**, v.6, p.177–186, 2008.

TAMURA, H. ; NAKAMURA, Y.; KORKMAZ, A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D.; SUGINO, N.; REITER, R. J. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**, v.92, p.328-343, 2009.

TORMO, M.A.; TEJADA A. R.; MORALES, I.; PAREDES, S.; SANCHEZ, S.; BARRIGA, C.; HERNANDEZ, R. Orally administered tryptophan and experimental type 2 diabetes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.261, p.57-61, 2004.

VALTONEN, M.; KANGAS, A. P.; VOUTILAINEN, M. **Method for producing melatonin rich milk**, Patent Cooperation Treaty ; WO 01/01784 A1, 2001.

WULFF, K.; MIDDLETON, J. B.; DIJK, D. FOSTER, R. (2006) The Suitability of Actigraphy, Diary Data, and Urinary Melatonin Profiles for Quantitative Assessment of Sleep Disturbances in Schizophrenia: A Case Report. **Chronobiology International**, v.23, p. 485–495, 2006.

**1. INTRODUCTION**

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is a biogenic indole amine, which plays an important role in regulation of the circadian rhythm (sleep–wake cycle) and the alleviation of sleep disorders, such as reduced alertness, day time fatigue, loss of appetite, reduced cognitive skills (Srinivasan et al., 2010). In adolescence and young adults high concentrations of melatonin are encountered, however after 40 years of age a decline in the synthesis of this hormone begins in the body which significantly affects the quality of sleep (Kennaway & Wright 2002). Some benefits have been attributed to the consumption of melatonin as a potential anti-stress, antioxidant, antimutagenic and anti-inflammatory agent, as well as improved sleep quality (Rezzani et al., 2006; Kennaway & Wright 2002; Reiter, 1995).

Melatonin is naturally present in various foods, including tomatoes (Stürtz et al., 2011) and mulberry leaves (Pothinuch & Tongchitpakdee 2011). Milk naturally contains about 5  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  of melatonin, which can be increased in concentration by controlled lighting conditions during milking (Valtonen et al., 2001) or night milking (Haigh, 2003). According to Valtonen et al., (2001) values of melatonin concentration varying from 10 to 60  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  with an average value of 25  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  were found in milk obtained from night milking.

Recently, high-melatonin milk production has created a profitable new segment of the dairy market. According to Özer & Kirmaci (2010) a Finland company produces

high-melatonin milk based on the standardized milking system at night. Similar products has been found in Japan and in the UK.

Since milk is a vector of several microorganisms, heat treatment is necessary to prepare it for human consumption. However, these thermal processes can significantly affect the nutrients originally present in raw milk. The action of heat treatment degrades components in foods and the extent of degradation depends on the kinetic parameters of each component. Knowledge of reaction kinetics, including reaction order, rate constant and activation energy, is fundamental to predict food quality loss during thermal treatments.

Several works have been performed to investigate the kinetic behavior of many components in milk including immunoglobulin A, lactoferrin and folic acid (Morgan, et al., 1986),  $\beta$ -lactoglobulin (Claeys et al., 2001), thiamin, riboflavin, ascorbic acid, cholecalciferol and tocoferol (Bendicho et al., 2002), and alkaline phosphatase (Claeys et al., 2003). The kinetics of thermal destruction of microorganisms such as *Coxiella burnetii*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium paratuberculosis* have been studied by several authors (Enright et al., 1957; Sung & Collins 1997; Cerf & Condron 2006). To our knowledge, there is no report of kinetic data describing the effect of thermal treatments on melatonin destruction.

Since accurate knowledge of kinetic parameters is essential to predict the quality changes that occur during thermal processing, the aim of this study was to determine the degradation kinetic parameters of melatonin in milk during heat treatment. Knowledge on the kinetic models and associated parameters of melatonin degradation would provide a useful tool for process *design* and optimization.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Chemicals and reagents.**

The reagents used were melatonin powder 98% purity (Sigma-Aldrich, USA) and an enzyme immunoassay kit for direct and quantitative determination of melatonin in human saliva purchased from IBL-international (Non-Extraction ELISA Melatonin Saliva - RE54041). Sodium hydroxide, phenolphthalein, sulfuric acid, amyl alcohol, copper sulfate, potassium sulfate, boric acid, hydrochloric acid (analytical reagent grade) were obtained from Vetec (Brazil).

## **2.2. Sample preparation.**

Pasteurized whole milk obtained from the local dairy industry was spiked with  $50 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  of melatonin and its composition was determined in relation to fat, protein, acidity and density, according to the analytical methodology APHA (2001).

## **2.3. Thermal Treatment of samples.**

Heat treatments were carried out at different temperatures (75, 80, 85, 90 and 95 °C). To determine the kinetic parameters of melatonin thermal destruction, a stationary procedure with closed tubes (18 cm length, 7 mm i.d.) was used according to the methodology described by Stumbo, (1973) with modifications. To each tube 8 mL of the milk sample were added, and the tubes were then subjected to different times and temperatures of heat treatment according to the experimental *design*. These heat treatments were performed in a temperature-controlled bath with accuracy of  $\pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$  (Quimis-Brazil). A flexible type K thermocouple (500 mm length, 1.5 mm i.d.) was inserted into the center of the tubes. The tubes were immersed in the bath so that the entire sample was covered by the water. Temperature was recorded every 5 s using a data logger interface (Testo 05541764, USA) connected to a personal computer running the Comsoft software (Testo, USA). The thermal lag phase was determined as 2.2 min and the cooling time was about 0.5 min. Then, the thermal transient could be negligible and the treatment could be considered isothermal. Heating time was recorded after the thermal lag phase reached the bath temperature. At different time intervals, 2 samples were removed from the water bath and rapidly cooled in an ice bath and stored in a freezer until the time of the analysis. Melatonin degradation was conducted up to the level of 10% retention.

## **2.4. Assay procedure.**

The concentration of melatonin was measured prior to heat treatment at the end of thermal lag phase and at each heating time using a commercial ELISA-Kit (IBL Hamburg, Germany, Kat.-Nr. RE 540 21). According to Kollmann et al., (2008), the method presents detection limit of 3.0 pg/ml. Also, repeatable results and highest recovery levels was achieved using skimmed milk. Thus, milk was skimmed by centrifugation at  $3300\times g$  for 15 min ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) and the aqueous phase was separated and diluted 1:10 with Standard A (free of melatonin) before proceeding with the assay.

## 2.5. Mathematical Modeling.

The first-order kinetic model was applied for analysis of the thermal degradation of melatonin, according to Equation 1.

$$C = C_0 e^{-kt} \quad (1)$$

where  $C$  is the concentration of melatonin in  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  after heat treatment,  $C_0$  is the concentration of melatonin in  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  after the thermal lag phase,  $k$  is the rate constant of thermal degradation in  $\text{min}^{-1}$ , and  $t$  is the heating time in min.

The  $D$  values (decimal reduction time, in min) for each temperature and the half-life times ( $t_{1/2}$ , in min) were determined according to Equations 2 and 3, respectively.

$$D = \ln(10) / k \quad (2)$$

$$t_{1/2} = \ln(2) / k \quad (3)$$

The value of  $Z$  (temperature coefficient) was determined by linear regression of the logarithm of  $D$  versus temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ), where the value of  $Z$  is given by the inverse of the slope.

Dependence of the rate constant of melatonin thermal destruction ( $k$ ) with temperature was calculated by Arrhenius Equation 4.

$$k = k_{\infty} e^{-\frac{E_A}{RT}} \quad (4)$$

where  $R$  is the universal gas constant ( $8.315 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ),  $E_A$  is the activation energy ( $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$ ),  $T$  is the absolute temperature (K), and  $k_{\infty}$  is the pre-exponential factor ( $\text{min}^{-1}$ ).

## 2.6. Experimental design and statistical analysis.

The experiment was arranged in a completely randomized *design*, using the heating time at each temperature as the source of variation and two repetitions. A linear regression analysis was performed using the logarithmic form of Equations.1 and 4. The accuracy of the model was evaluated using analysis of variance (ANOVA) with the Fisher's statistical test (F-test) and the coefficient of determination ( $R^2$ ). All statistical analyses were performed using the SAS v.9 software.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

In this work, the kinetics of thermal degradation of melatonin present in milk were evaluated. The physicochemical properties of pasteurized whole milk spiked with  $50 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  of melatonin are shown in Table 4.1, where it is indicated that about  $3.21 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  of melatonin were initially present in the milk.

Table 4.1- Physicochemical composition of milk samples.

Components	Concentration*
Fat ( $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ )	$3.20 \pm 0.10$
Relative density 15 °C ( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	$1.03 \pm 0.02$
Titrateable acidity ( $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ )	$0.16 \pm 0.05$
Protein ( $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ )	$3.10 \pm 0.10$
Melatonin ( $\text{pg}\cdot \text{mL}^{-1}$ )	$53.21 \pm 1.03$

Melatonin was thermally treated at different times for temperatures ranging from  $75 \text{ }^{\circ}\text{C}$  to  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  and its residual concentration was determined as a function of time. As expected, melatonin concentration decreased as the heating time increased and thermal degradation was found to follow a first order kinetic as shown in Figure 4.1. Overall linear curves fit to the data presenting  $R^2$ -values greater than 0.92, indicating the suitability of the first order model. First order kinetics have been found when studying the behavior of other milk components during heat treatments, including alkaline phosphatase (Claeys et al., 2003), immunoglobulins (Mainer et al., 1997),  $\alpha$ -lactalbumin (Anema & McKenna 1996), and niacin (Nisha et al., 2004; Nisha et al., 2009).

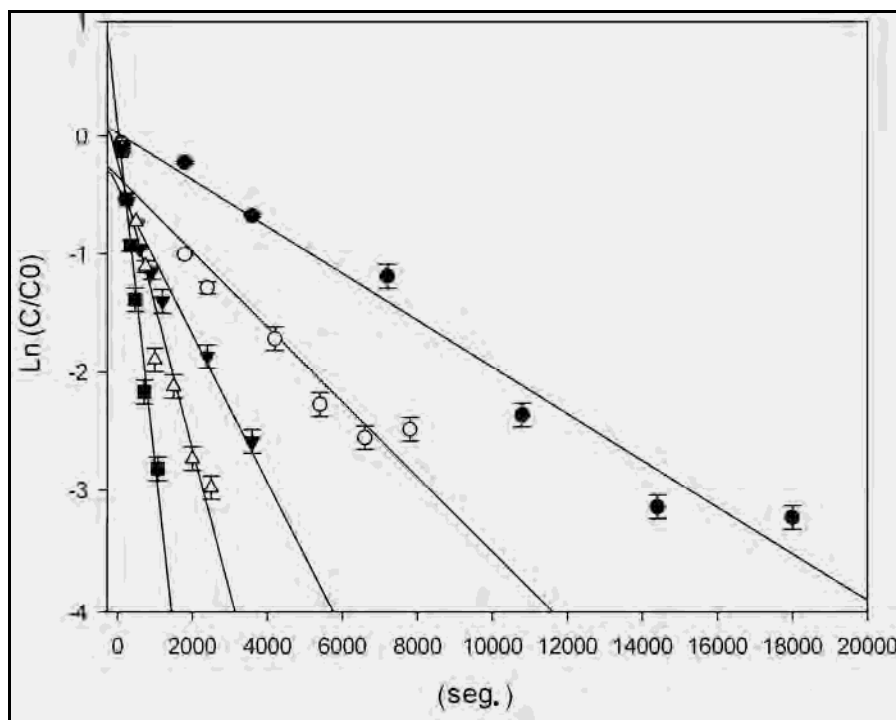


Figure 4.1 - Kinetics of thermal destruction of melatonin during heating. (●) 75 °C; (○) 80 °C; (▲) 85 °C. (Δ) 90 °C; (◆) 95 °C.

The kinetic parameters of melatonin degradation during heating are shown in Table 4.2, where the values of the first-order kinetic constants  $k$  and  $t_{1/2}$  are shown for each temperature used in this study. The constant  $k$  increases as the temperature increases, corroborating the idea that for greater temperatures, melatonin degradation increases. The half-life time ( $t_{1/2}$ ) of melatonin varied from 4 to 52 min, which is indicative of its high stability considering common heat treatment of milk.

Also observed in 4.2 are the values of  $D$  which are between 13.34 and 173.13 min for the temperature range studied. The  $D$  value of melatonin is greater than that of other milk components, indicating that melatonin is less sensitive to increased heating times at a fixed temperature. Morgan et al., (1986) studied the value of  $D$  for various milk components and reported a value of 0.99 min at 76 °C for immunoglobulin A, 0.3 min at 70 °C for lactoferrin and 4.42 min at 72 °C for folic acid. Claeys et al., (2003) determined a  $D$  value of 20 min at 60 °C for alkaline phosphatase.

Table 4.2- The kinetic parameters of melatonin degradation (Mean  $\pm$  standard deviation).

T	k	D	t <sub>1/2</sub>	Z	E <sub>A</sub>
(°C)	(min <sup>-1</sup> )	(min)	(min)	(°C)	(kJ/mol)
75.0	0.013 $\pm$ 0.001	173.1 $\pm$ 8.2	52.1 $\pm$ 2.4		
80.0	0.022 $\pm$ 0.002	104.2 $\pm$ 8.8	31.4 $\pm$ 2.6		
85.0	0.038 $\pm$ 0.009	61.2 $\pm$ 1.4	18.4 $\pm$ 0.4	18.2 $\pm$ 0.6	134.4 $\pm$ 10.2
90.0	0.073 $\pm$ 0.010	31.6 $\pm$ 2.0	9.5 $\pm$ 0.6		
95.0	0.173 $\pm$ 0.017	13.3 $\pm$ 1.3	4.0 $\pm$ 0.4		

Values of Z for the thermal destruction of nutrients are generally higher than those of microbial inactivation (Awuah et al., 2007). The differences between D and Z values of microorganisms and nutrients are used to optimize thermal processes. Figure 4.2 shows the temperature dependence of D, which was used to graphically determine the Z value. The Z value of 18.2 °C obtained for melatonin is higher than that of other nutrients in milk, indicating that melatonin is less sensitive to temperature variations when compared with other milk components such as lactoferrin (4.6 °C), immunoglobulins A (5.5 °C), folic acid (6.4 °C) (Morgan et al., 1986), and  $\beta$ -lactoglobulin (7.9 °C) (Claeys et al., 2001). The component of greatest thermal resistance reported in the study of Morgan et al., (1986) was thiamine, with a Z value of 28.4 °C.

The presence of alkaline phosphatase in milk is an indicator of insufficient heat treatment. Claeys et al., (2001) characterized thermal inactivation of alkaline phosphatase by the Z value of 5.3 °C (D at 60 °C = 24.6 min). The Z value of melatonin was higher than that of alkaline phosphatase (about 3 times greater), thus, heat treatment based on the destruction of alkaline phosphatase will slightly change the concentration of melatonin. Furthermore, melatonin is more temperature resistance when compared to mesophilic bacteria, capable of surviving UHT treatments, including *B. stearothermophilus* C953 (Z = 9.1 °C), *B. sporothermodurans* J16B (Z = 13.1 °C) and *B. sporothermodurans* B93-20-12 (Z = 14.2 °C) (Huemer et al., 1998). Melatonin is also

more resistant to pasteurization temperatures than the target microorganism *Coxiella burnetii*. According to Cerf & Condron (2006), the Z value of *Coxiella burnetii* is 4.34 °C. Thus, the pasteurization process can reduce the target pathogens without causing major damages to melatonin concentrations.

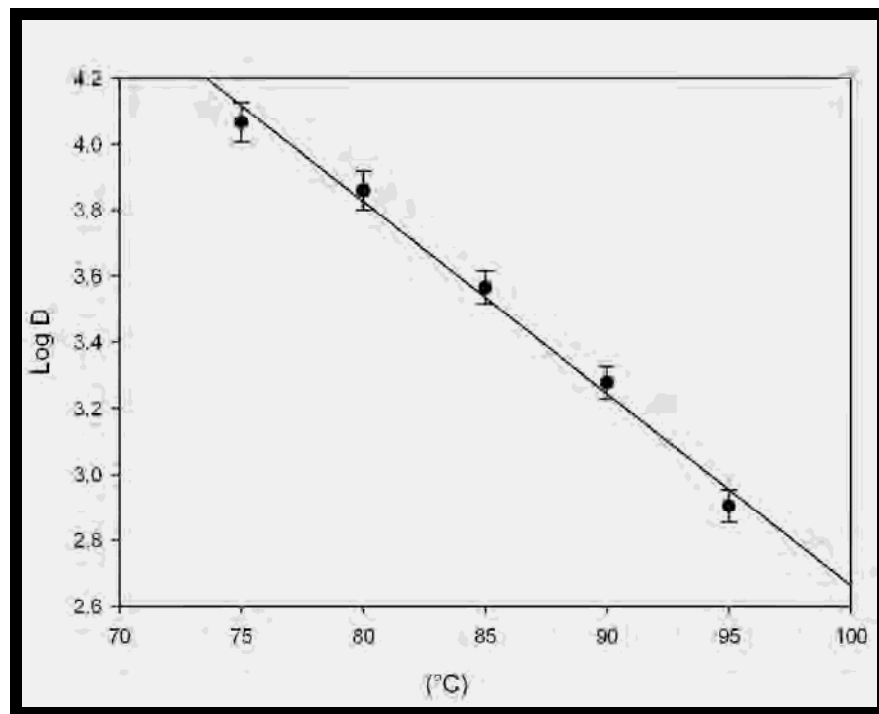


Figure 4.2 -Variation of the decimal reduction time (D) with temperature for melatonin.

The temperature dependence of the rate constant was expressed by the Arrhenius equation (Figure 4.3). Activation energy determined according to Equation 4 was  $134.44 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  and this value was lower than that of other constituents in milk, indicating that the rate constant of thermal destruction is less sensitive to temperature variation than alkaline phosphatase ( $E_a = 421.1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) (Wilinska et al., 2007),  $\beta$ -lactoglobulin B ( $E_a = 296.7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ),  $\alpha$ -lactalbumin ( $E_a = 203.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) and immunoglobulin G ( $E_a = 269.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) for temperatures between 70 and 90 °C (Oldfield et al., 1998).

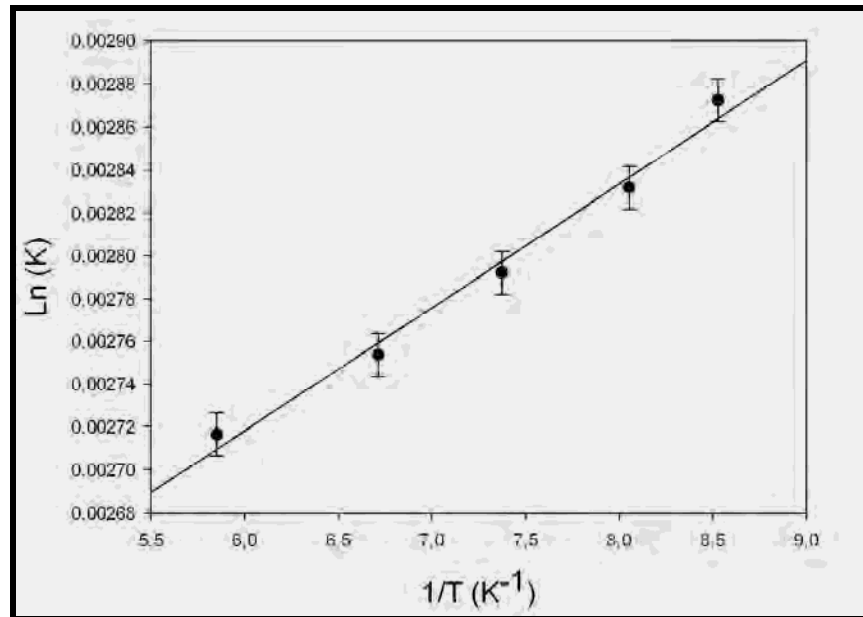


Figure 4.3- The Arrhenius plots for degradation of melatonin in milk.

#### 4. CONCLUSION

The present work evaluated the thermal degradation of melatonin present in whole milk. Results show that the degradation kinetics of melatonin is accurately described as a first-order reaction and that the variation in the rate constant with temperature complies with the Arrhenius relationship. The higher degree of stability of melatonin was observed and common milk thermal processes will not reduce its content.

#### 5- REFERENCES

ANEMA, S.G.; MCKENNA, A.B. Reaction Kinetics of Thermal Denaturation of Whey Proteins in Heated Reconstituted Whole Milk. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.44,p.422-428, 1996.

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

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

BENDICHO, S.; ESPACHS, A.; ARÁNTEGUI, J.; MARTÍN, O. Effect of high intensity pulsed electric fields and heat treatments on vitamins of milk. **Journal of Dairy Research**, v.69, n.1, p.113-123, 2002.

CERF, O.; CONDRON, R. *Coxiella burnetii* and milk pasteurization: an early application of the precautionary principle? **Epidemiology and Infection**, v.134, p.946-951, 2006.

CLAEYS, W.L.; LUDI KHUYZE, L.R.; VANLOEY, A.M.; HENDRICKX, M.E. Inactivation kinetics of alkaline phosphatase and lactoperoxidase and denaturation kinetics of  $\beta$ -lactoglobulin in raw milk under isothermal and dynamic temperature conditions. **Journal of Dairy Research**, v.68, p.95-107, 2001.

CLAEYS, W.L.; LOEY, A.M.V.; HENDRICKX, M.E. Influence of seasonal variation on kinetics of time temperature integrators for thermally processed milk. **Journal of Dairy Research**, v.70, p.217–225, 2003.

ENRIGHT, J.B.; WALTER, W.; SADLER, D.V.M.; THOMAS, R.C. Pasteurization of Milk Containing the Organism of Q Fever. **American Journal of Public Health**, v.47, p.695-701, 1957.

HAIGH, B.S. **Method for producing milk with an enhanced content of naturally expressed melatonin**. Uk Patent Application No 2 387 009 A , 2003.

HUEMER, I.A.; KLIJN, N.; VOGELSANG, H.W.J.; LANGEVELD, L.P.M. Thermal Death Kinetics of Spores of *Bacillus sporothermodurans* Isolated from UHT Milk. **International Dairy Journal**, v.8, p.851-855, 1998.

KENNAWAY, D. J.; WRIGHT, H. Melatonin and Circadian Rhythms. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.2, p.199-209, 2002.

KOLLMANN, M.T.; LOCHER, M.; HIRCHE, F.; EDER, K.; MEYER, H .H.; BRUCKMAIER, R. M . Effects of tryptophan supplementation on plasma tryptophan and related hormone levels in heifers and dairy cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v.34, n.1,p.14-24, 2006.

MAINER, G.; SANCHES, L.; ENA, J.M.; CALVO, M. Kinetic and Thermodynamic Parameters for Heat Denaturation of Bovine Milk IgG, IgA and IgM. **Journal of Food Science**, v. 62, p.1134-1139, 1997.

MORGAN, J.N.; TOLEDO, R.T.; EITENMILLER, R.R.; BARNHART, H.M.; MADDOX, F. Thermal Destruction of Immunoglobulin A. Lactoferrin. Thiamin and Folic Acid in Human Milk. **Journal of Food Science**, v.51, p.348-351, 1986.

NISHA, P.; SINGHAL, R.S.; PANDIT, A.B. A study on degradation kinetics of thiamine in red gram splits (*Cajanus cajan* L.). **Food Chemistry**, v.85,p.591–598, 2004.

NISHA, P.; SINGHAL, R.S.; PANDIT, A. B. A study on degradation kinetics of niacin in potato (*Solanum tuberosum* L.). **Journal of Food Composition and Analysis**, v.22, p. 620–624, 2009.

OLDFIELD, D.J.; SINGH, H.; TAYLOR, M.W.; PEARCE, K.N. Kinetics of Desnaturation and Aggregation of Whey Proteins in Skim Milk Heated in an Ultra-High Temperature (UHT) Pilot Plant. **International Dairy Journal**, v.8, p.311-318, 1998.

ÖZER, B.H.; KIRMACI, H. Functional milks and dairy beverages. **International Journal of Dairy Technology**, v.63, n.1, p.1-15, 2010.

POTHINUCH, P.; TONGCHITPAKDEE, S. Melatonin contents in mulberry (*Morus* spp.) leaves: Effects of sample preparation, cultivar, leaf age and tea processing. **Food Chemistry**, v.128, p.415–419, 2011.

REITER, R.J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.9, p.526-533, 1995.

REZZANI, R.; RODELLA, L.F.; BONOMINI, F.; TENGATTINI, S.; BIANCHI, R.; REITER, R.J. Beneficial effects of melatonin in protecting against cyclosporine A-induced cardiotoxicity are receptor mediated. **Journal of Pineal Research**, v.41, p.288–295, 2006.

SRINIVASAN, V.; SINGH, J.; PANDI-PERUMAL, S.R.; BROWN, G.M.; SPENCE, D.W.; CARDINALI, D.P. Jet Lag, Circadian Rhythm Sleep Disturbances, and Depression: the Role of Melatonin and its Analogs. **Advances in therapy**, v.27, p.796–813, 2010.

STÜRTZ, M.; CEREZO, A.B.; CANTOS-VILLAR, E.; GARCIA-PARRILLA, M.C. Determination of the melatonin content of different varieties of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and strawberries (*Fragaria ananassa*). **Food Chemistry**, v.127, p.1329–1334, 2011.

STUMBO, C. R **Thermobacteriology in Food Processing**. Academic Press, New York, USA, 1913.

SUNG, N.; COLLINS, M.T. Thermal Tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Applied and Environmental Microbiology**, 64, 999-1005, 1997.

VALTONEN, M.; KANGAS, A.P.; VOUTILAINEN, M.; **Method for producing melatonin rich mil**; Patent Cooperation Treat; WO 01/01784 A1, 2001.

WILINSKA, A.; BRYJAK, J.; ILLEOVA, V.; POLAKOVIC, M. Kinetics of thermal inactivation of alkaline phosphatase in bovine and caprine milk and buffer. **International Dairy Journal**, v.17, p. 579-586, 2007.

### 1-INTRODUÇÃO

A análise sensorial tradicional, que enfoca os atributos intrínsecos ao produto, é uma ferramenta utilizada para estudar as características sensoriais provenientes do equilíbrio de compostos presentes nos alimentos a fim de garantir seu padrão de qualidade. Um alimento, para atingir essa qualidade exigida pelo consumidor, deve possuir respaldo no que diz respeito à sua aparência, aroma, sabor e textura. Entretanto, as ferramentas tradicionais da análise sensorial atualmente não são suficientes para atender aos requerimentos do dinâmico mercado de produtos alimentícios. Uma formulação otimizada do produto é sim necessária para uma inovação de sucesso e para sua aceitação. Os consumidores, porém, são também influenciados por outros fatores durante o processo de escolha, compra ou aceitação do alimento, como conceitos individuais (aprendidos, vivenciados ou instintivos), além de sofrerem influência das informações relacionadas ao produto, como marca, preço ou rótulo. Estes são os denominados fatores ou características não sensoriais, veiculados na própria embalagem do alimento e também relacionados aos conceitos do próprio consumidor em relação ao produto (MINIM, 2010).

Trabalhos anteriores (VIDIGAL et al., 2011; DELLA LUCIA et al., 2010; JAEGER, 2006; ALLISON et al.,2004; PRESCOTT et al., 2002) divulgaram a influência de características extrínsecas ao alimento na percepção do seu sabor,

revelando como outras informações, além das características físicas e sensoriais do produto, podem modificar a escolha e a aceitação do consumidor.

Entre os fatores não-sensoriais estudados que afetam o comportamento dos consumidores, destacam-se aqueles relacionados à saúde e ao bem-estar físico e mental (ALLISON et al., 2004). Informações relevantes sobre o conteúdo nutricional e benefícios à saúde estão sendo amplamente utilizadas como uma estratégia de *marketing* e diferenciação do produto, com o potencial de influenciar as atitudes dos consumidores (SABBE et al., 2009; HAILU et al., 2009; SIEGRIS et al., 2008). Essas reivindicações potenciais dependem de vários fatores, incluindo os benefícios e familiaridade com os ingredientes (VAN TRIJP e VAN DER LANS, 2007; VAN KLEEF et al., 2005), bem como características individuais dos consumidores, tais como atitudes, motivação e condições de saúde (URALA e LÄHTEENMÄKI, 2004; VAN KLEEF et al., 2005).

Sabbe et al. (2009) estudaram a influência da informação de benefícios à saúde do suco de açaí nas concentrações de 4% a 20% de polpa sobre aceitação dos consumidores. Esses autores observaram a existência de correlação negativa entre a aceitabilidade global do suco e a concentração de açaí, porém, ao fornecer aos julgadores informações sobre os benefícios à saúde, eles verificaram melhora na aceitação dos sucos, reduzindo a insatisfação com o sabor, mostrando assim como a informação de benefício à saúde pode melhorar a aceitação do suco.

O estudo com consumidores é muito importante para definir o sucesso de um produto funcional. Atualmente, a opinião dos consumidores é referida como o principal fator de sucesso para os alimentos funcionais e uma prioridade para futuras pesquisas. Em consequência, várias pesquisas têm focado especificamente as atitudes dos consumidores em relação aos alimentos funcionais, abordando determinantes cognitivos, motivacionais e atitudes de aceitação do consumidor de alimentos funcionais (BECH-LARSEN e GRUNERT, 2003; URALA e LÄHTEENMÄKI, 2004; VERBEKE, 2005).

Com base no exposto, o presente trabalho tem o objetivo de avaliar a influência da informação e do conhecimento sobre a presença de melatonina na aceitação de leite.

## 2-MATERIAIS E MÉTODOS

Para avaliação da influência da informação e do conhecimento, foi utilizado leite de vaca integral pasteurizado com concentração aumentada de melatonina, obtido em ordenhas noturnas.

Foram recrutados 200 voluntários residentes na cidade de Viçosa-MG. A amostra de voluntários foi dividida em dois grupos: um grupo constituído por 100 pessoas com idade inferior a 50 anos e outro, por 100 pessoas com idade superior a 50 anos.

Os testes de aceitação foram conduzidos em cabines individuais, sob luz branca, em três sessões. Inicialmente, o teste cego, em seguida, o teste da informação e, posteriormente, o teste do conhecimento (Figura 5.1).

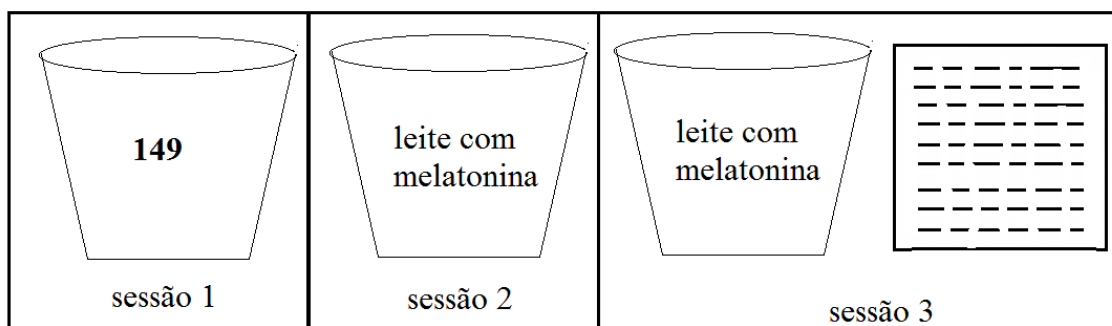


Figura 5.1- Procedimento do experimento de influência de fatores não sensoriais.

Na primeira sessão (teste cego), os consumidores degustaram a amostra do produto servida em copo de acrílico (capacidade de 40 mL), codificada com 3 dígitos, sem obter qualquer informação prévia sobre o leite testado.

Na segunda sessão (teste da informação), foi avaliada a aceitação da informação de presença de melatonina no produto. Neste procedimento, a mesma amostra de leite servida na sessão 1 foi servida novamente aos voluntários, porém, desta vez, foi informado que o produto era leite com melatonina.

Em uma terceira sessão (teste do conhecimento), foi avaliada a importância do conhecimento sobre a melatonina na aceitação do produto. A mesma amostra servida na sessão 2 foi servida novamente aos voluntários, porém desta vez foi fornecido também ao voluntário, antes da sessão, um texto informativo ( Figura 5.2).

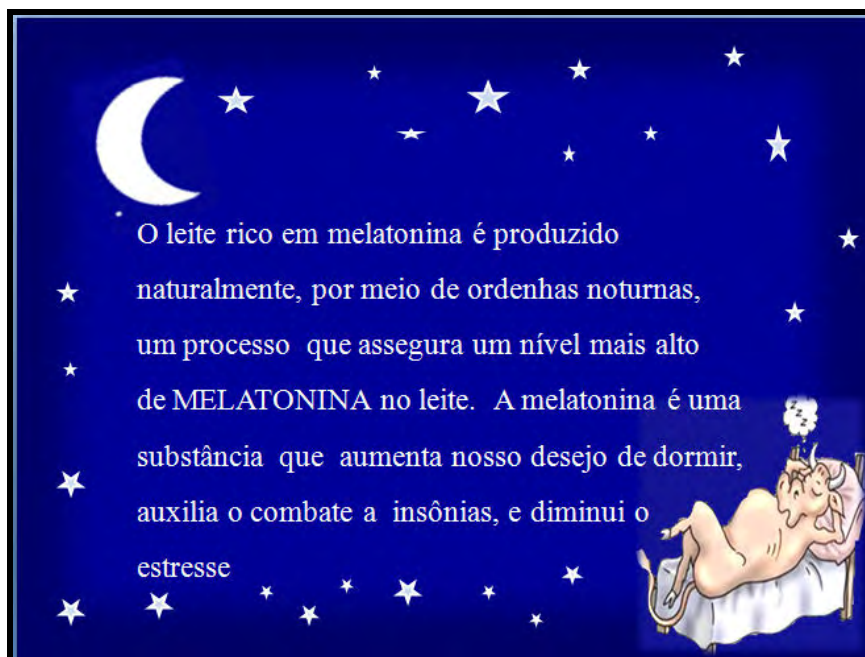


Figura 5.2- Informação sobre a melatonina fornecida na sessão 3 do teste.

As amostras de leite, das três sessões, foram servidas de forma monádica. Em todas as sessões, o julgador recebeu uma ficha para cada amostra, Figura 5.3, em que foi solicitado indicar em escala hedônica de 7 pontos sua aceitação do produto.

Para facilitar o entendimento dos resultados, foi feita análise de frequência dos escores hedônicos para cada amostra e sessão, de acordo com as seguintes faixas:

Faixa 1: escores de 5 a 7 - situados entre os termos hedônicos gostei extremamente e gostei, indicando que os consumidores gostaram da amostra.

Faixa 2: escores de 1 a 4 - situados entre os termos hedônicos não gostei/nem desgostei e desgostei extremamente, indicando que os consumidores desgostaram da amostra.

Foi feita análise de variância ( $p < 0,05$ ) para comparação entre as três sessões e também entre os dois grupos. O teste t para amostras pareadas ( $p < 0,05$ ) foi usado para comparação entre as sessões 1 e 2, 2 e 3.

As análises estatísticas foram feitas usando o programa SAS (Statistical Analysis System – SAS, versão 9.1, licenciado para Universidade Federal de Viçosa.

Nome \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_ anos  
Sexo ( ) Feminino ( ) masculino

Por favor, avalie a amostra de leite servida, e indique o quanto você gostou ou desgostou do produto. Marque a resposta que melhor reflita seu julgamento.

AMOSTRA: LEITE

( ) Gostei extremamente  
( ) Gostei muito  
( ) Gostei  
( ) Não gostei/nem desgostei  
( ) Desgostei  
( ) Desgostei muito  
( ) Desgostei extremamente

Comentários-----

(a)

Nome \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_ anos  
Sexo ( ) Feminino ( ) masculino

Você conhece um composto denominado melatonina?  
( ) Sim ( ) Não

Por favor, avalie a amostra de leite servida, e indique o quanto você gostou ou desgostou do produto. Marque a resposta que melhor reflita seu julgamento.

AMOSTRA: LEITE COM MELATONINA

( ) Gostei extremamente  
( ) Gostei muito  
( ) Gostei  
( ) Não gostei/nem desgostei  
( ) Desgostei  
( ) Desgostei muito  
( ) Desgostei extremamente

Comentários-----

(b)

Nome \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_ anos  
Sexo ( ) Feminino ( ) masculino

Por favor, avalie a amostra de leite servida, e indique o quanto você gostou ou desgostou do produto. Marque a resposta que melhor reflita seu julgamento.

AMOSTRA: LEITE COM MELATONINA

( ) Gostei extremamente  
( ) Gostei muito  
( ) Gostei  
( ) Não gostei/nem desgostei  
( ) Desgostei  
( ) Desgostei muito  
( ) Desgostei extremamente

Comentários-----

(c)

Figura 5.3- Fichas de avaliação sensorial usadas: a- Sessão 1; b- Sessão 2; c- Sessão 3.

### 3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelo resultado da análise de frequência, é possível observar aumento do percentual de escores positivos quando foi fornecida a informação da presença de melatonina e também quando foram apresentados os benefícios do consumo (Figura 5.4).

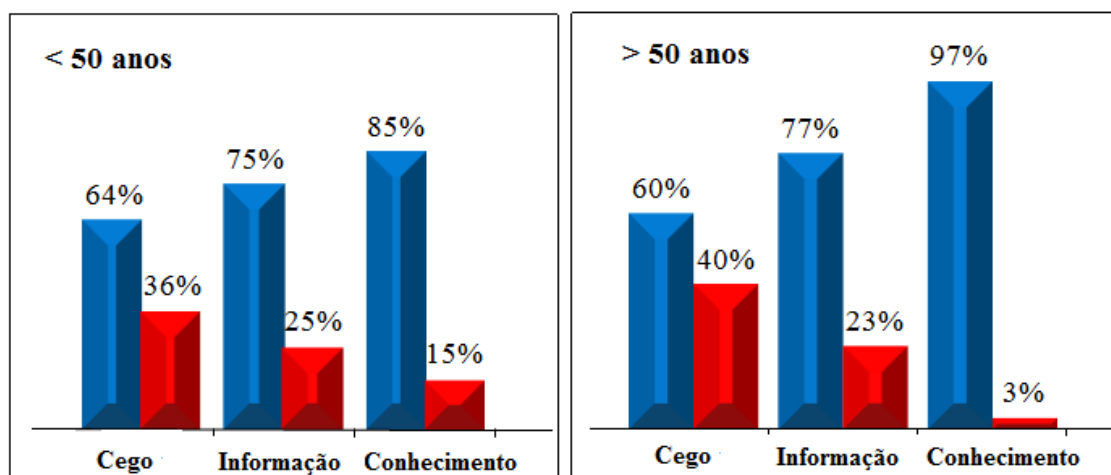


Figura 5.4- Frequência de notas hedônicas ■ positivas (escores de 5-7) e ■ negativas (escores de 1-4) nas três sessões.

Observou-se diferença significativa entre as médias de aceitação dos leites pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) quando avaliados no teste cego, teste com informação e teste do conhecimento, mostrando assim influência positiva da informação de presença de melatonina e do conhecimento sobre os benefícios do consumo do leite com concentração aumentada de melatonina. Esta diferença de escores de aceitação foi observada em ambos os grupos: de idade superior a 50 anos e de idade inferior a 50 anos (Figura 5.5).

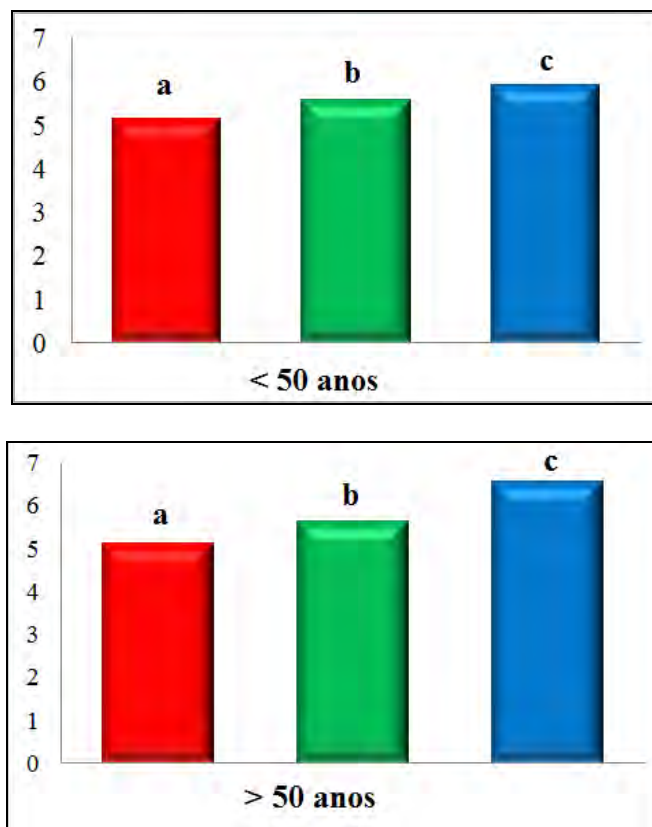


Figura 5.5- Médias dos escores de aceitação do leite com concentração aumentada de melatonina, avaliados em ■ teste cego, ■ teste com informação de presença de melatonina e ■ teste com conhecimento sobre os benefícios do consumo de melatonina. Médias com mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.1- Comparação entre as sessões.

O teste t para amostras pareadas detectou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os escores obtidos para a aceitação do leite quando comparadas às sessões 1 e 2 (Tabela 5.1). O leite teve escore maior no teste com informação de presença de melatonina quando comparado com o teste cego em ambos os grupos: de idade superior a 50 anos e de idade inferior a 50 anos. Pode-se observar que a neofobia alimentar não influenciou a aceitação dos consumidores, pois a maioria (82%) deles relatou, na ficha de análise sensorial, Figura 5.3b, não conhecer o composto denominado melatonina, mas, mesmo assim, quando foi fornecida a informação de presença de melatonina, os escores de aceitação aumentaram.

Tabela 5.1- Comparação entre sessões 1 e 2 usando teste t para amostras pareadas.

	Sessão 1	Sessão 2	$\rho$ -valor*
	Escores médios	Escores médios	
Menores de 50 anos	5,1	5,6	< 0,0001
Maiores de 50 anos	5,1	5,6	< 0,0001

\* $\rho$ -valor obtido usando teste t para amostras pareadas.

A neofobia alimentar é definida como a resistência ao consumo de alimentos desconhecidos, podendo ser responsável pelo insucesso no mercado de alguns funcionais (COOKE et al., 2006).

Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os escores obtidos para a aceitação do leite quando comparadas às sessões 2 e 3 (Tabela 5.2). O leite teve escore maior no teste com conhecimento sobre os benefícios do consumo da melatonina quando comparado com o teste sem conhecimento, em ambos os grupos. Estes resultados mostram que os consumidores estão preocupados com a saúde e dispostos a aceitar produtos com características funcionais.

Tabela 5.2- Comparação entre sessões 2 e 3, usando teste t para amostras pareadas.

	Sessão 2	Sessão 3	$\rho$ -valor*
	Escores médios	Escores médios	
Menores de 50 anos	5,6	5,9	< 0,0001
Maiores de 50 anos	5,6	6,5	< 0,0001

\* $\rho$ -valor obtido usando teste t para amostras pareadas.

Vidigal et al. (2011) também observaram atitudes positivas dos consumidores em relação à funcionalidade dos produtos. Quando foram apresentadas a eles informações de benefícios à saúde, houve aumento de escores de aceitação dos sucos de frutas exóticas. Segundo Siro et al. (2008), os produtos funcionais são uma nova classe de alimentos com mercado em constante crescimento, porém seu desenvolvimento tem um grande desafio - produzir alimentos saudáveis que agradem os consumidores quanto às características sensoriais e não sensoriais.

Como observado, a informação de benefício à saúde aumenta os escores de aceitação do leite com concentração aumentada de melatonina, mostrando assim ser importante a divulgação dos benefícios do consumo de melatonina ao consumidor. Estratégias de *marketing* usando a divulgação de informações sobre a melatonina são importantes para o sucesso do produto no mercado.

### **3.2- Comparação entre os grupos de consumidores (idade inferior a 50 anos, e idade superior a 50 anos).**

O resultado da análise de variância ( $p < 0,05$ ) indica que foi possível observar diferenças estatísticas significativas entre os grupos somente na sessão 3 (Figura 5.6).

Na sessão 1, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os escores médios de aceitação do grupo com idade superior a 50 anos e do grupo com idade inferior a 50 anos. Para ambos os grupos, foi observado escore médio de aceitação de aproximadamente 5,1, variando entre os termos hedônicos “gostei” e “nem gostei/nem desgostei”.

Na sessão 2, também não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os dois grupos, ou seja, a influência da informação de presença de melatonina causou impacto semelhante nos escores de aceitação dos dois grupos. Para o grupo com idade inferior a 50 anos, a média dos escores de aceitação aumentou para 5,6, já para o grupo de pessoas com superior a 50 anos, o escore médio da segunda sessão foi de 5,6. Em ambos os grupos, houve influência positiva da informação de presença de melatonina, apesar de os participantes não conhecerem o composto.

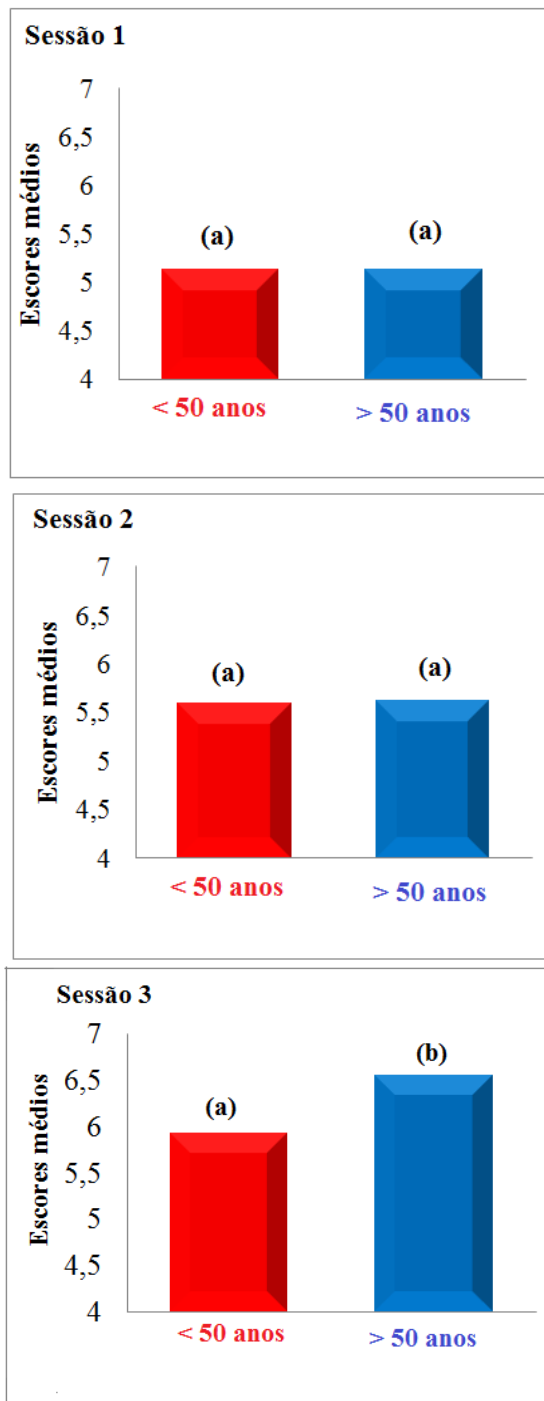


Figura 5.6- Médias dos escores de aceitação do leite com concentração aumentada de melatonina, avaliados nas sessões 1, 2 e 3. Médias com a mesma letra não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) na mesma sessão.

Na sessão 3, houve diferença significativa entre os grupos, tendo sido o grupo com idade superior a 50 anos mais influenciado pelo conhecimento dos benefícios do consumo da melatonina que o grupo com idade inferior a 50 anos. O escore médio de aceitação do grupo mais jovem foi de 5,9, já para o grupo mais velho, o escore médio

foi de 6,5. A explicação pela maior importância dada ao conhecimento sobre os benefícios da melatonina pelas pessoas com idade superior a 50 anos é a grande incidência de insônia neste grupo, causada pelo declínio de produção de melatonina. Trabalho desenvolvido por Orwoll et al. (2005) mostrou que 44% das pessoas com idade superior a 64 anos apresentavam problemas de sono. Por apresentarem mais problemas de sono, as pessoas com idade superior a 50 anos foram mais influenciadas pelo conhecimento do benefício do consumo do leite que ajuda a melhorar a qualidade do sono.

#### 4-CONCLUSÃO

A informação da presença de melatonina e o conhecimento sobre os benefícios à saúde aumentam os escores de aceitação do leite com concentração aumentada de melatonina, mostrando assim ser importante a divulgação dos benefícios do consumo de melatonina ao consumidor. Estratégias de *marketing* usando a divulgação de informações sobre a melatonina são importantes para o sucesso do produto no mercado.

As pessoas com idade superior a 50 anos apresentam mais interesse pelo leite com concentração aumentada de melatonina, pois elas foram mais influenciadas pela informação de benefícios da melatonina. Pode-se observar também que a neofobia alimentar não influenciou a aceitação dos consumidores, pois a maioria deles relatou não conhecer o composto denominado melatonina, mas, mesmo assim, quando foi fornecida a informação de que o leite continha melatonina, os escores de aceitação aumentaram. Assim, a palavra melatonina pode ser usada nas embalagens e propagandas, pois não foi detectada neofobia em relação ao termo.

#### 5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLISON, A. M. A.; GUALTIERI, T.; CRAIG-PETSINGER, D. Are young teens influenced by increased product description detail and branding consumer testing? **Food Quality and Preference**, v.15, p.819–829, 2004.

BECH-LARSEN, T.; GRUNERT, K.G. The perceived healthiness of functional foods—A conjoint study of Danish, Finnish and American consumers' perception of functional foods. **Appetite**, v.40: p.9-14, 2003.

COOKE, L.; CARNELL, S.; WARDLE, J. Food neophobia and meal time food consumption in 4–5 year old children. **International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity**, v.3, p.1-6, 2006.

DELLA LUCIA, S. M.; MINIM, V. P. R.; SILVA, C. H. O.; MINIM, L. A.; CERESINO, E. B. Expectativas Geradas pela Marca sobre a Aceitabilidade de Cerveja: Estudo da Interação entre Características Não Sensoriais e o Comportamento do Consumidor. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.28, n.1, p.11-24, 2010.

HAILU, G.; BOECKER, A.; HENSON, S.; CRANFIELD, J. Consumer valuation of functional foods and nutraceuticals in Canada. A conjoint study using probiotics. **Appetite**, v.52, p.257–265, 2009.

JAEGER, S. R. Non-sensory factors in sensory science research. **Food Quality and Preference**, v.17, p.132-144, 2006.

MINIM, V. P. R. **Análise Sensorial – Estudo com Consumidores**. 2 ed. Viçosa, M.G. Editora da Universidade Federal de Viçosa, 308p, 2010.

ORWOLL, M. M. Epidemiology of insomnia: what we know and what we still need to learn. **Sleep Medicine Reviews**, v.6, p.97–111, 2005.

PRESCOTT, J.; YOUNG, O.; O'NEILL, L.; YAU, N. J. N.; STEVENS, R. Motives for food choice: A comparison of consumers from Japan, Taiwan, Malaysia and New Zealand. **Food Quality and Preference**, v.13, p. 489–495, 2002.

SABBE, S.; VERBEKE, W.; DELIZA, R.; VAN DAMME, P. Effect of a health claim and personal characteristics on consumer acceptance of fruit juices with different concentrations of açai (*Euterpe oleracea Mart.*). **Appetite**, v.53, p.84–92, 2009.

SIEGRIST, M.; STAMPFLI, N.; KASTENKOLZ, H. Consumers' willingness to buy functional foods. The influence of carrier, benefit and trust. **Appetite**, v.51, p.526–529, 2008.

SIRO, I.; KAPOLNA, E.; KAPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. **Appetite**, v.51, p.456–467, 2008.

URALA, N. ; LÄHTEENMÄKI, L. Attitudes behind consumers' willingness to use functional foods. **Food Quality and Preference**, v.15, p.793–803, 2004.

VAN TRIJP, H. C. M.; VAN DER LANS, I. A. Consumer perceptions of nutrition and health claims. **Appetite**, v.48, p.305–324, 2007.

VAN KLEEF, E.; VAN TRIJP, H. C. M.; LUNING, P. Functional foods: Health claim food product compatibility and the impact of health claim framing on consumer evaluation. **Appetite**, v.44, p.299–308, 2005.

VERBEKE, W. Consumer acceptance of functional foods: socio-demographic, cognitive and attitudinal determinants. **Food Quality and Preference**, v.16, p.45–57, 2005.

VERBEKE, W. Functional foods: Consumer willingness to compromise on taste for health? **Food Quality and Preference**, v.17, p. 126–131, 2006.

VIDIGAL C.T.R.,; MINIM, V. P.R.; CARVALHO, B. N.; MILAGRES, M.P.; GONÇALVES, A. C. A. Effect of a health claim on consumer acceptance of exotic Brazilian fruit juices – Açaí (*Euterpe oleracea Mart.*), Camu-camu (*Myrciaria dubia*), Caja (*Spondias Lutea L.*) and Umbu (*Spondias tuberosa Arruda*). **Food Research International**, v. 44, p. 1988-1996, 2011.

## Análise Conjunta de Fatores na Definição da Embalagem para Leite com Concentração Aumentada de Melatonina.

---

### 1- INTRODUÇÃO

A embalagem tem importância fundamental na escolha do produto durante a compra, uma vez que ela representa o primeiro contato entre o consumidor e o produto. Fatores relacionados à embalagem como cor, textura e informações influenciam na intenção de compra dos consumidores. Assim, para otimizar o processo de escolha e aceitação do produto, é interessante identificar os fatores da embalagem valorizados pelo consumidor (DELLA LUCIA et al., 2007).

Estudos de Costa (1999), Carneiro et al. (2005), Della Lucia et al. (2007), Souza et al. (2007), Ferrarezi (2008), Frata et al. (2009) e Gonçalves (2009) mostram que grande parte dos fatores considerados importantes para o consumidor podem ser observados na embalagem do produto. Assim, um rótulo bem elaborado é uma poderosa influência na formação das expectativas sensoriais dos consumidores e, conseqüentemente, na sua escolha e compra do produto (GONÇALVES, 2009).

Uma característica interessante nos estudos com embalagem de produtos alimentícios é a quantificação do efeito que cada característica presente nela tem sobre a intenção de compra do consumidor. A análise conjunta de fatores vem a ser uma técnica utilizada, com êxito, para este fim. Esta técnica, quando empregada juntamente com métodos multivariados, permite entender como os indivíduos desenvolvem preferência por produtos ou serviços, baseando-se em suas diferentes características. Seu emprego gera a base para se descrever a relação do consumidor com o produto e possibilita, com

isso, o aprimoramento das estratégias de *marketing* da indústria (DELLA LUCIA, et al., 2007).

Neste capítulo, objetivou-se desenvolver uma embalagem para o leite com concentração aumentada de melatonina, por meio da Análise Conjunta de Fatores.

## **2-MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1- Escolha dos fatores da embalagem.**

O *Sleep Disorders Questionnaire* (SWEERE et al., 1998) adaptado para a forma estruturada com questões socioeconômicas e demográficas foi usado como questionário de recrutamento (Anexo 1). Foram selecionadas pessoas que apresentavam problemas de sono e tinham interesse em participar do trabalho.

Cinco sessões de grupo de focos foram conduzidas com um total de 37 participantes. As sessões foram realizadas na sala de reuniões no Departamento de Tecnologia de Alimentos (UFV): a primeira sessão contou com a participação de 7 voluntários (5 mulheres e 2 homens); a segunda, com 8 (4 mulheres e 4 homens); a terceira, com 6 pessoas (5 mulheres e 1 homem); a quarta, com 7 (4 mulheres e 3 homens); e a quinta, com 9 participantes (7 mulheres e 2 homens).

As sessões ocorreram em mesa redonda contando com um moderador e um assistente, que foi encarregado de gravar, filmar e anotar as informações de cada sessão. O moderador explicou o propósito da sessão e esclareceu a importância da opinião de cada participante no estudo, prosseguindo com a utilização de um roteiro, Tabela 6.1, de perguntas sobre os hábitos dos consumidores durante as suas compras e a apresentação de quatro embalagens de leite de marcas comerciais e uma de produto desenvolvido (protótipo) (Figura 6.1). Estas embalagens foram apresentadas separadamente e em ordem aleatória. As sessões tiveram duração média de 90 minutos. Também foi ressaltado que não existe resposta certa para as questões abordadas, sendo importante a opinião de cada um.

Tabela 6.1 - Roteiro para as sessões de grupo de focos.

- 1) Você observa os rótulos de produtos que consome?
- 2) O que você observa?
- 3) Você conhece um composto denominado melatonina?
- 4) O que você acha que seja?
- 5) Apresentação sobre a melatonina abordando o que é o composto, seus benefícios, os alimentos que têm este produto, a ordenha noturna e o aumento da concentração de melatonina naturalmente no leite.
- 6) O que você acha do leite com concentração de melatonina aumentada naturalmente por ordenhas noturnas?
- 7) Você consumiria este produto?
- 8) O que você achou desta embalagem? Comentar sobre cor, nome e informações.



Figura 6.1- Embalagens apresentadas nas sessões de grupo de focos.

Os dados obtidos nas gravações e anotações foram usados para a identificação de fatores do rótulo que mais influenciam no processo de escolha do produto pelos consumidores durante as compras em supermercados. A partir daí, foram enumerados os fatores julgados importantes pelos grupos. E para cada um dos fatores escolhidos, foram definidos os seus níveis.

Os fatores nome do produto, texto informativo sobre o leite com concentração aumentada de melatonina, e o *design* da embalagem foram escolhidos para compor os tratamentos avaliados (Tabela 6.2). Esses fatores foram selecionados de acordo com as ideias expostas nas sessões de grupo de focos.

Tabela 6.2– Fatores das embalagens e respectivos níveis.

<b>Fatores</b>	<b>Níveis/descrição</b>
<b><i>Design da embalagem</i></b>	1-Azul com estrelas e desenho de leite derramando 2-Branca sem desenho 3-Azul com estrelas e sem desenho
<b>Nome</b>	1- Leite noturno 2-Melatonina
<b>Texto informativo</b> Leite rico em melatonina obtido naturalmente por ordenhas noturnas. A melatonina é uma substância que auxilia no combate à insônia e diminui o estresse	1-Com 2-Sem

## **2.2 - Coleta de dados e arranjo experimental.**

O método de coleta de dados utilizado neste estudo foi o de perfil completo (GREEN e SRINIVASAN, 1988). Cada tratamento (embalagem) avaliado foi composto pela combinação dos três fatores predefinidos - *design* da embalagem, nome do produto e texto informativo - sendo, assim, constituído de um nível desses fatores.

O arranjo de tratamentos utilizado foi do tipo fatorial completo, ou seja, o número de tratamentos avaliados correspondeu a todas as possíveis combinações entre

os três fatores e cada um de seus níveis; desse modo, foram obtidos 12 tratamentos ( $n^f = 2^2 \cdot 3^1 = 12$ ), que estão apresentados na Tabela 6.3.

Tabela 6.3 - Tratamentos avaliados no estudo.

<b>Tratamentos</b>	<b><i>Design</i></b>	<b>Nome</b>	<b>Texto informativo</b>
1	Azul com estrelas e desenho de leite derramando	Leite noturno	Com
2	Azul com estrelas e desenho de leite derramando	Leite noturno	Sem
3	Azul com estrelas e desenho de leite derramando	Melatonina	Com
4	Azul com estrelas e desenho de leite derramando	Melatonina	Sem
5	Branca sem desenho	Leite noturno	Com
6	Branca sem desenho	Leite noturno	Sem
7	Branca sem desenho	Melatonina	Com
8	Branca sem desenho	Melatonina	Sem
9	Azul com estrelas	Leite noturno	Com
10	Azul com estrelas	Leite noturno	Sem
11	Azul com estrelas	Melatonina	Com
12	Azul com estrelas	Melatonina	Sem

### **2.3- Confeção das embalagens.**

As embalagens foram confeccionadas por uma empresa especializada. O *design* da embalagem foi padronizado para caixa retangular, nas medidas 25,5cm x 7cm x 6cm, com tampas rosqueáveis, baseada na opinião dos consumidores que participaram do grupo de focos (Figura 6.2).



Figura 6.2- Exemplos de embalagens avaliadas.

As embalagens foram apresentadas aos voluntários de forma monádica sob luz branca no Laboratório de Análise Sensorial da Universidade Federal de Viçosa. Não foi definido um tempo de julgamento para as embalagens. A cada vez que se iniciou a

avaliação de uma nova embalagem, o consumidor recebeu a ficha de avaliação identificada com um número de três dígitos correspondente ao tratamento em questão.

Foi utilizada para a avaliação da intenção de compra a escala linear horizontal não-estruturada de 9 cm. Esta escala é composta de duas âncoras nas extremidades: na extremidade esquerda está escrita a expressão “definitivamente não compraria” e na direita, “definitivamente compraria” (Figura 6.3).

Nome _____	Data ____/____/____
Código da amostra _____	
Considere que você está comprando leite. Você poderia, por favor, marcar na escala abaixo a sua intenção de compra para o produto.	
Intenção de compra	
-----	
Definitivamente não compraria	Definitivamente compraria

Figura 6.3- Ficha usada na avaliação da intenção de compra.

A primeira embalagem apresentada foi igual para todos os consumidores, possuindo um painel frontal sem nenhuma informação acerca dos fatores em estudo (Figura 6.4). A apresentação dessa embalagem tem como objetivo retirar o efeito da primeira amostra ou o impacto que o primeiro tratamento apresentado poderia causar sobre a avaliação das demais amostras.



Figura 6.4- Primeira embalagem de leite apresentada aos consumidores para a retirada do impacto da primeira amostra.

A apresentação das amostras seguiu o delineamento proposto por MacFie et al. (1989) (Anexo 2), em que cada embalagem aparece em certa posição o mesmo número de vezes. Este delineamento garante a eliminação do efeito da ordem de apresentação e o efeito residual caracterizado pela influência de uma amostra na avaliação subsequente.

As 48 sequências de apresentação dos tratamentos de acordo com o delineamento selecionado são suficientes para estimar os quatro efeitos principais de modo não-viesado. Três repetições do delineamento foram empregadas na avaliação das embalagens, de maneira que 144 consumidores participaram do estudo.

#### **2.4- Análise dos resultados.**

Os resultados foram avaliados conforme proposto por Minim (2010).

As respostas das fichas de avaliação da intenção de compra dos consumidores foram transformadas em escores, medindo-se a distância que vai desde a extremidade

esquerda até a marca feita pelo consumidor, tendo estes escores variado entre 0 e 9. Os resultados foram tabulados em forma de escores para cada embalagem avaliada, em um quadro de dupla entrada de consumidores versus embalagens.

Como regra de composição, foi utilizado o modelo aditivo. Este modelo assume que as avaliações globais de preferência são formadas pela soma das contribuições dos níveis dos fatores (STEENKAMP, 1987).

Os resultados foram analisados de acordo com o modelo “clustering segmentation” (MOORE, 1980). Inicialmente, os dados foram analisados individualmente, ou seja, foram calculados os coeficientes de preferências (CPs) para cada um dos consumidores. A partir dos CPs dos consumidores, estes mesmos consumidores foram agrupados utilizando o método *average distance* e a distância Euclidiana como medida de dissimilaridade (KHATTREE e NALK, 2000). Nesse método, grupos inicialmente constituídos (n grupos) foram reunidos de acordo com a proximidade dos elementos, e então os indivíduos mais próximos foram fundidos. Um indivíduo candidato a um agrupamento apresenta uma distância a este grupo igual à média da distância com relação aos membros do agrupamento, ou seja, o coeficiente de distância entre dois agrupamentos J e K é dado por:

$$d_{j,k} = \text{média}_{j \in J; k \in K} d_{jk}$$

Os grupos foram formados por consumidores que apresentaram CPs semelhantes, ou seja, comportamento de compra semelhante. Foram realizadas análises agregadas para cada grupo formado, estimando-se os CPs para cada um.

Os CPs foram estimados por meio de análise de regressão linear múltipla com dummies variáveis, utilizando o método de mínimos quadrados.

Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o programa SAS (Statistical Analysis System – SAS Institute Inc., North Carolina, USA 1999).

### **3- RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1- Opiniões e atitudes dos consumidores em relação ao rótulo de leite.**

A Figura 6.5 mostra o perfil dos participantes do grupo de focus. Do total de participantes, 67,5% eram do sexo feminino e tinham idade entre 22 e 80 anos, sendo

que 68% apresentavam idade superior a 52 anos. Em relação ao grau de instrução, somente 11,2% tinham apenas o curso superior completo e 45%, segundo grau completo. Quanto à renda familiar, a maioria (45,6%) tinha renda de 1 a 5 salários mínimos e somente 9% deles tinham renda superior a 10 salários mínimos.

Em relação à frequência de consumo, 85% dos entrevistados consumiam leite todos os dias e somente 7% consumiam somente 1 vez por semana.

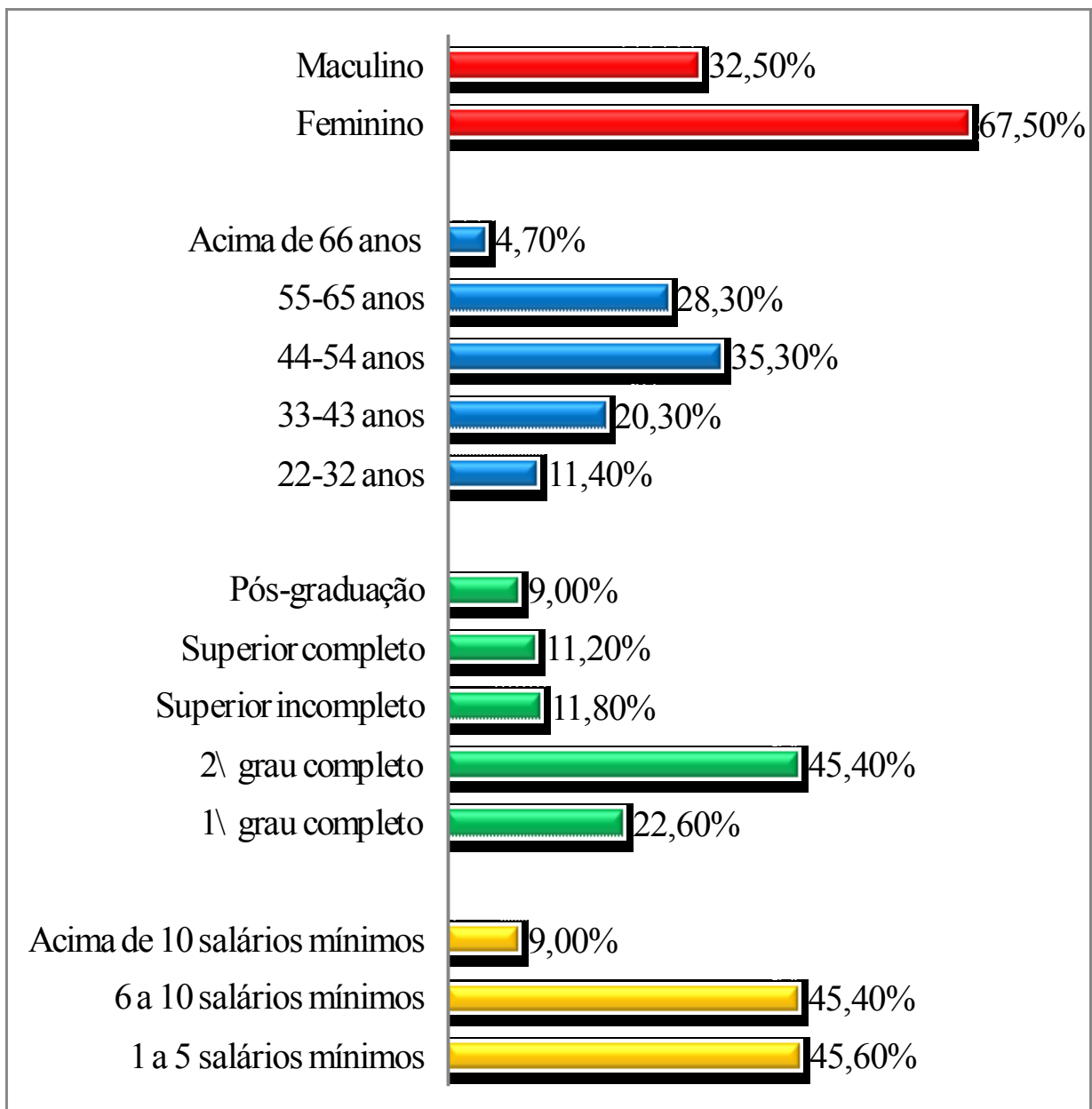


Figura 6.5- Perfil dos consumidores que participaram do grupo de foco.

Entre os entrevistados, 49% disseram ler o rótulo sempre, 46% disseram ler o rótulo eventualmente e 5% responderam nunca ler o rótulo (Figura 6.6).

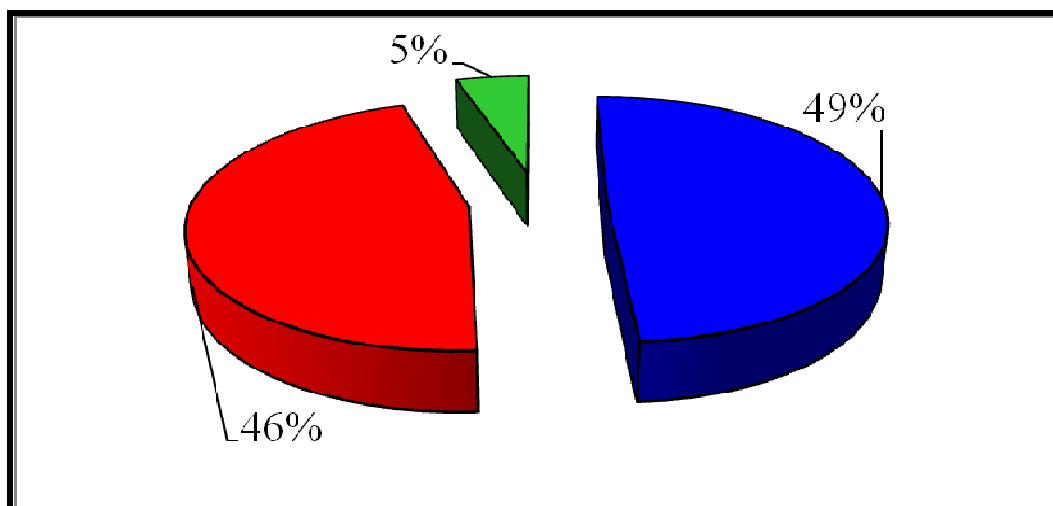


Figura 6.6 – Frequência de leitura dos rótulos de produtos alimentícios pelos participantes do grupo de focos (■ participantes que leem o rótulo eventualmente, ■ participantes que leem o rótulo sempre, ■ participantes que nunca leem os rótulos).

Observou-se que 32% dos entrevistados tinham conhecimentos básicos sobre a melatonina obtidos por meio de reportagens de televisão. Porém, a maioria dos entrevistados, 68%, não tinha nenhuma informação sobre a melatonina.

A aparência, a data de validade visível, o preço, a marca, a praticidade e a facilidade de achar a informação que procuram são alguns dos fatores das embalagens de leite que os participantes observam no momento da compra.

Observou-se entre os participantes que a aparência da embalagem é um fator importante na decisão de compra de leite, e 83% dos entrevistados disseram escolher a embalagem pela aparência. Outro fator considerado importante para os participantes foram informações sobre os ingredientes, e 56% disseram que observam as informações sobre ingredientes presentes no produto. Os participantes disseram também observar a presença de ingredientes adicionais que melhorem a qualidade nutricional do produto, ou tragam algum benefício a saúde, sendo que 78% dos participantes disseram escolher estes produtos.

Entre os fatores de aparência dos produtos, os participantes destacaram o tamanho e as cores das letras, formato da caixa e tipo de tampas, as cores das embalagens, desenhos, cores e quantidade de informação contidas nas embalagens e nome do produto.

Todos os entrevistados disseram preferir informações em letras grandes, cores fortes e fáceis de ler. Dos participantes, 92% disseram escolher embalagens com tampas rosqueáveis e formato não tradicional de caixa de leite UHT, preferindo o formato mais quadrado e longo pela praticidade de servir e armazenar em geladeira. Sendo assim, foram padronizadas para estudos posteriores as embalagens com letras grandes e fáceis de ler que atendam à IN nº 22/2005. A tampa rosqueável e o formato não tradicional da caixa UHT também foram padronizados, uma vez que atendem aos desejos da quase totalidade dos participantes.

Quanto ao fator cor das embalagens, 42% disseram preferir embalagens brancas pois remetem melhor ao produto leite. Porém, 58% responderam escolher embalagens coloridas, que chamam mais atenção na prateleira.

Dos entrevistados, 32% preferem embalagens sem desenhos, com um visual mais limpo, pois permitem visualizar melhor as informações; já 28% deles têm preferência por embalagens com desenhos de leite derramando, que estimulam a vontade beber leite (“dar vontade de beber leite”); e 40% gostam de embalagens com desenho de fazenda e vacas, pois remetem a um produto natural.

Porém, segundo a IN nº 22/2005, os produtos de origem animal embalados não devem ser descritos ou apresentar no rótulo vocábulos, sinais, denominações, símbolos, emblemas, ilustrações ou outras representações gráficas que possam tornar as informações falsas, incorretas, insuficientes, ou que possam induzir o consumidor a equívoco, erro, confusão ou engano em relação à verdadeira natureza, composição, procedência, tipo, qualidade, quantidade, validade, rendimento ou forma de uso do produto de origem animal. É vedado o uso de fazendas, vacas e imagens que provoquem enganos de um produto natural ao consumidor.

Quando questionados a respeito do nome do produto, 62% aprovaram o nome leite noturno, porém 48% disseram preferir um nome contendo melatonina.

Pelos dados levantados no grupo de focos, foi possível definir os níveis e fatores para o estudo da avaliação de intenção de compras das embalagens de leite com alta concentração de melatonina e também alguns atributos considerados importantes para a maioria dos participantes.

### 3.2- Avaliação da intenção de compra das embalagens por meio de Análise Conjunta de Fatores.

Por meio do modelo de análise individual, os Coeficientes de Preferências (CPs) foram estimados para cada consumidor e, posteriormente, foi feita a análise de agrupamento. A relação entre o número de grupos formados durante essa análise e o número de julgadores presentes em cada um dos grupos está apresentado na Tabela 6.4.

Tabela 6.4- Resumo dos resultados da análise de agrupamento.

		Número de consumidores por grupo							
		Grupos							
Número de grupos		1	2	3	4	5	6	7	8
1		144							
2		141	3						
3		141	2	1					
4		106	35	2	1				
5		105	35	2	1	1			
<b>6</b>		<b>95</b>	<b>35</b>	<b>11</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>		
7		94	34	11	2	1	1	1	
8		85	34	11	9	2	1	1	1

Para análise agregada, considerou-se o agrupamento com 6 grupos. Destes 6 grupos, 3 eram constituídos de 1 ou 2 julgadores, não sendo, portanto, discutidos. As análises dos resultados foram então feitas para 3 grupos. A Tabela 6.5 mostra os resultados da análise agregada para cada grupo formando.

O primeiro grupo, representado por 66% dos consumidores, teve sua intenção de compra baseada em todos os fatores, tendo o *design* da embalagem obtido maior importância relativa (IR = 58,56%), seguido do nome (22,23%) e do texto informativo (19,29%). A embalagem ideal para este grupo seria a azul com estrelas e desenho de leite derramando, com o nome leite noturno e com a presença de texto informativo.

Tabela 6.5- Resumo da análise agregada conjunta de fatores, considerando 3 grupos formados.

Fatores e Níveis/ Importância Relativa	Grupo 1 (n=95)	Grupo 2 (n=35)	Grupo 3 (n=11)
<b>Design da embalagem.</b>			
1. Azul com estrelas e desenho de leite derramando.	0,8579	-0,6090	2,1470
2. Branca sem desenho.	-1,0142	1,3517	-3,1712
3. Azul com estrelas e sem desenho.	0,1563	-0,7426	1,0242
Importância Relativa	58,56%	66,09%	91,69%
<b>Nome</b>			
1. Leite Noturno	0,3538	0,3986	-0,1159
2. Melatonina	-0,3538	-0,3986	0,1159
Importância Relativa.	22,13%	25,15%	3,99%
<b>Texto Informativo</b>			
1. Com texto	0,3084	0,1386	0,1250
2. Sem Texto	-0,3084	-0,1386	-0,1250
Importância Relativa.	19,29%	8,74%	4,31%

Os sinais negativos para os níveis de cada fator indicam impacto negativo na intenção de compra. Considerados importantes para o grupo, apenas fatores com importância relativa acima de 10% (MINIM, 2010).

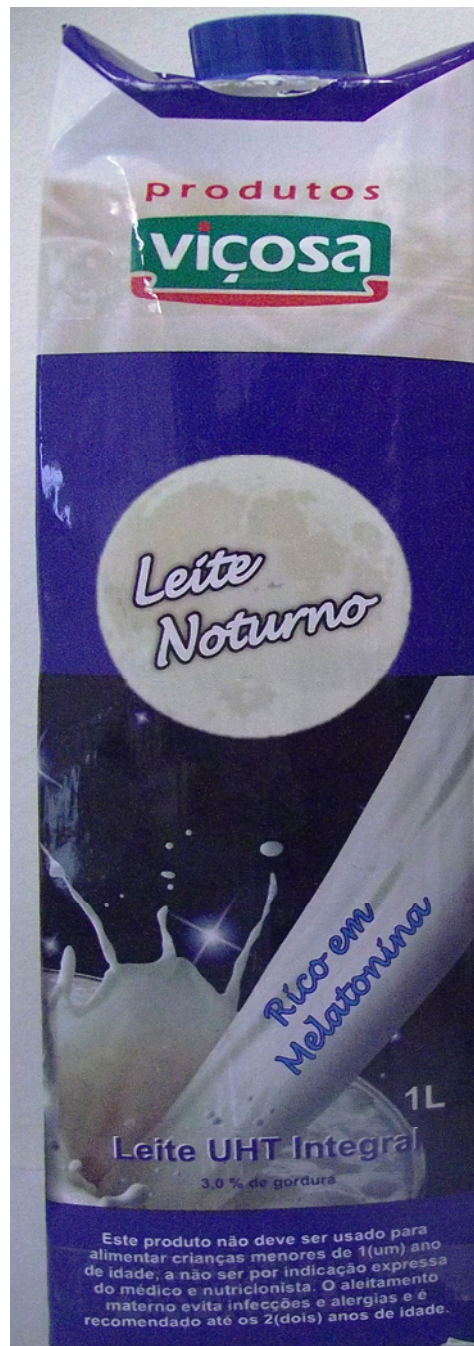
O segundo grupo, compreendendo 24,3% dos consumidores, teve sua intenção de compra baseada no *design* da embalagem (IR =66,09%). Neste grupo, diferentemente dos demais, a embalagem branca sem desenhos foi a que obteve maior intenção de compra. O texto informativo apresentou importância relativa menor que 10%, não sendo considerado fator importante. Para este grupo, a embalagem ideal seria branca sem desenhos, com o nome leite noturno.

O terceiro grupo, formado por 9,7% dos consumidores, teve sua intenção de compra baseada no *design* da embalagem (IR =91,69%), sendo que os demais fatores tiveram importância relativa menor que 10%, não sendo considerados fatores de importância. A embalagem ideal para este grupo seria a azul com estrelas e desenho de leite derramando.

Desta forma, a embalagem a azul com estrelas e desenho de leite derramando, com o nome leite noturno e com a presença de texto informativo (Figura 6.7), apresentou alta intenção de compra para a maioria dos consumidores.



(a)



(b)

Figura 6.7- Embalagem com maior intenção de compra: a- verso e b- frente.

#### 4 -CONCLUSÃO

A embalagem é um dos fatores fundamentais na escolha de um produto e pode contribuir de forma positiva ou negativa para a aceitação do alimento.

A embalagem com maior intenção de compra para o produto desenvolvido é a de cor azul, com estrelas e leite derramando, com o nome leite noturno e presença de texto informativo.

#### 5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL -Instrução Normativa nº 22, de 24 de novembro de 2005 – **Regulamento Técnico para Rotulagem de Produto de Origem Animal Embalado**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2005.

CARNEIRO, J. D. S.; MINIM, V. P. R.; DELIZA, R.; SILVA, C. H.O.; CARNEIRO, J. C. S.; LEÃO, F. Labelling effects on consumer intention to purchase for soybean oil. **Food Quality and Preference**, v. 16, n.3, p. 275-282, 2005.

COSTA, M. C. **Tecnologias não convencionais e o impacto no comportamento do consumidor**. Tese de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro 1999.

DELLA LUCIA, S. M.; MINIM, V. P. R.; SILVA, C. H. O.; MINIM, L. A.; Fatores da embalagem de café orgânico torrado e moído na intenção de compra do consumidor. **Ciências Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n.3, p. 485-491, 2007.

FERRAREZI, A. C. **Interpretação do consumidor, avaliação da intenção de compra e das características físico-químicas do néctar e do suco de laranja pronto para beber**. Dissertação de Mestrado em Ciência dos Alimentos - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2008.

FRANCA, M. T.; BENASSI, M. T.; MINIM, V. P. R.; PRUDENCIO, S. H. Atributos da embalagem e intenção de compra de suco e néctar de laranja. **Semina**, v.30, n.4, p. 847-858, 2009.

GREEN, P. E.; SRINIVASAN, V. Conjoint Analysis in consumer research: Issues and outlook. **Journal of Consumer Research**, v.5, p.103-123, 1978.

GONÇALVES, A. C. A. **Desenvolvimento de Bebida à Base de Café Adicionada de Concentrado Proteico de Soro: Da Pesquisa Mercadológica à Avaliação Sensorial**. Dissertação de Doutorado em Ciência dos Alimentos- Universidade Federal de Viçosa, 2009.

KHATTREE, R.; NAIK, D.N. Cluster Analysis. In: KHATTREE, R.; NAIK, D.N. **Multivariate data reduction and discrimination with SAS Software**. Cary NC: SAS Institute Inc, 2000, Cap.6, p. 347-442.

MacFIE, H.J.; BRATCHELL, N.; GREENHOFF, K.; VALLIS, L. V. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in halls tests. **Journal of Sensory Studies**, v.4, p.129-148, 1989.

MINIM, V. P. R. **Análise Sensorial – Estudo com Consumidores**. 2 ed. Viçosa, M.G. Editora da Universidade Federal de Viçosa, 308p, 2010.

MOORE, W. L. Levels of aggregation in conjoint analysis: an empirical comparison, **Journal of Marketing Research** v.17, p.516–523, 1980.

SOUZA, E.A.M; MINIM, V.P.R.; MINIM, L.A.; COIMBRA, J.S.R.; ROCHA, R.A. Modeling consumer intention to purchase fresh produce. **Journal of Sensory Studies**, v.22, p.115-125, 2007.

STEENKAMP, J-B. E. M. Conjoint measurement in ham quality evaluation. **Journal Agricultural Economies.**, v.38, n.3, p.473-480, 1987.

SWEERE, Y., KERKHOF, G. A., WEERD, A. W., KAMPHUISEN, H. A. C., KEMP, B., SCHIMSHEIMER, R. J. The validity of the Dutch Sleep Disorders Questionnaire (SDQ); **Journal of psychosomatic research**, v.45, p.549-555, 1998.

## Conclusão Geral

---

Há um nicho de mercado, composto principalmente por idosos e mulheres, para o desenvolvimento de produtos naturais que tenham como propriedade melhorar a qualidade do sono da população. A identificação deste mercado sugere que o desenvolvimento de um alimento enriquecido de melatonina pode ser uma alternativa de sucesso no mercado de produtos funcionais.

Foi desenvolvido um leite com concentração aumentada de melatonina, com objetivo de melhorar a qualidade do sono e diminuir o estresse. A técnica de aumento natural da concentração de melatonina por meio da ordenha noturna se mostrou uma alternativa eficiente, e o leite obtido às 2h00min. apresentou concentração de melatonina nove vezes superior à concentração encontrada no leite obtido às 15h00min..

Pelo ensaio biológico, constatou-se que a ingestão de leite com concentração aumentada de melatonina promoveu aumento de melatonina sanguínea e sulfatoximelatonina urinária em ratos wistar, indicando melhora na qualidade do sono. A adição de triptofano ao leite com concentração aumentada de melatonina melhorou a eficiência do produto no aumento de melatonina e sulfatoximelatonina nos ratos.

O estudo de cinética de degradação térmica da melatonina foi importante, pois permitiu definir a estabilidade da melatonina no leite. A melatonina é estável a tratamentos térmicos aplicados ao leite, sendo possível o uso de processos térmicos no desenvolvimento de produtos lácteos enriquecidos de melatonina.

A informação de presença de melatonina no leite influenciou positivamente pessoas de todas as faixas etárias, não existindo neofobia alimentar para o termo melatonina. O conhecimento sobre os benefícios do consumo de melatonina também causou impacto positivo na aceitabilidade de todas as faixas etárias, porém com maior impacto nas pessoas com idade superior a 50 anos.

A embalagem com maior intenção de compra para o produto desenvolvido é a de cor azul, com estrelas e leite derramando, com o nome leite noturno e presença de texto informativo

Desta forma, foi possível desenvolver um produto diferenciado e inovador a partir de ordenhas noturnas dos animais, nas condições climáticas do Brasil, e adicionado de triptofano, visando à melhoria da qualidade do sono dos idosos e à

agregação de valor ao leite, sem grandes investimentos dos produtores, de maneira sustentável e viável.

## ANEXOS

### ANEXO 1-QUESTIONÁRIO USADO NA AVALIAÇÃO.



#### UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

O Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa está promovendo uma pesquisa com consumidores da cidade de Viçosa sobre problemas relacionados ao sono. Sua participação é de extrema importância para efetivação do nosso trabalho, por isto, gostaríamos que respondesse a algumas perguntas.

Ressaltamos que sua identidade será preservada e que as informações coletadas neste estudo serão utilizadas estritamente para esta pesquisa.

1- **Sexo:**  Masculino  Feminino 3- **Nasc: (mês e ano) :** \_\_\_\_\_

2- **Estado civil:**

Solteiro  Casado  União estável  Viúvo  Outro

4. **Grau de instrução:**

[1] 1º grau incompleto [4] 2º grau incompleto [7] Superior incompleto

[2] 1º grau completo [5] 2º grau completo [8] Superior completo

[3] Pós-grad. comp. [6] Pós-grad. incomp [9] Outro: \_\_\_\_\_

5. **Atividade profissional**

[1] Estudante [2] Func. público municipal [3] Func. público federal

[4] Autônomo [5] Func. público estadual [6] Dona de casa

[7] Empresário (proprietário de empresa) [8] Func. Emp. Privada

[9] Outro: \_\_\_\_\_ [10] Aposentado (a)

**6. Em média, em qual categoria de renda familiar mensal você se enquadra?**

- [1] 1 a 3 SM (até R\$ 1.530,00) [2] 4 a 10 SM (R\$ 2.040,0 a 5.100,00)  
[3] 11-15 SM (R\$ 5.610,00 a 7.650,00) [4] 16-20 SM (R\$ 8160,00 a 10.200,00)  
[5] 21-30 SM (R\$ 10.710,00 a 15.300,00) [6] acima de 30 SM  
[7] Desempregado [8] Outros

**7. Você apresenta dificuldades para dormir?**

- [1] sempre [2] eventualmente [3] raramente [4] nunca

**8. Você demora muito para pegar no sono?**

- [1] sempre [2] eventualmente [3] raramente [4] nunca

**9. Você mexe muito na cama durante o sono?**

- [1] sempre [2] eventualmente [3] raramente [4] nunca

**10. Você acorda no meio da noite?**

- [1] sempre [2] eventualmente [3] raramente [4] nunca

**11. Você dorme durante a tarde?**

- [1] Todas as tardes [2] 6 a 4 vezes por semana [3] 3 a 1 vezes por semana  
[4] Não, nunca durmo à tarde

**12. Alguém já observou que você tem pequenas paradas respiratórias quando você dorme?**

- [1] Sim [2] Não

**13. Você utiliza algum medicamento de uso contínuo para dormir ?**

- [1] Sim [2] Não

**14. Você já utilizou algum fitoterápicos ou chá (erva –doce, camomila, suco de maracujá) com o intuito melhorar a qualidade do sono?**

- [1] sempre [2] eventualmente [3] raramente [4] nunca

**15. Você acorda ofegante ou sem ar durante a noite?**

[1] sempre      [2] eventualmente      [3] raramente    [4] nunca

**16. Você tem alguma dormência nas pernas, arrepios, câimbras, sensação que está caindo quando está dormindo?**

[1] sempre      [2] eventualmente      [3] raramente    [4] nunca

**17. Você anda durante o sono e se lembra no dia seguinte?**

[1] sempre      [2] eventualmente      [3] raramente    [4] nunca

**18. Escala de sonolência**

**Por favor, utilize esta escala para avaliar as seguintes perguntas:**

0 = nunca iria cochilar

1 = pequena chance de cochilar

2 = moderada chance de cochilar

3 = alta chance de cochilar

1. Sentado e lendo \_\_\_\_\_

2. Assistindo à T.V. \_\_\_\_\_

3. Sentado inativo em uma reunião pública \_\_\_\_\_

4. Como passageiro em um carro por uma hora sem interrupção \_\_\_\_\_

5. Deitado à tarde em um momento de folga \_\_\_\_\_

6. Sentado e conversando com alguém \_\_\_\_\_

7. Sentado calmamente após o almoço \_\_\_\_\_

8. Dirigir um carro que parou brevemente em uma sinal vermelho \_\_\_\_\_

**19. Você ronca?**

[1] sempre      [2] eventualmente      [3] raramente    [4] nunca

**20. Se sim, classifique o nível.**

- 4 - Dá para ouvir fora do seu quarto
- 3- Dá para acordar o companheiro de quarto
- 2- Fácil de ouvir
- 1- Pouco perceptível

**21. Você já sentiu que está gritando durante o sono e de repente acorda assustado?**

- [1] sempre      [2] eventualmente      [3] raramente    [4] nunca

**22. Você tem pesadelos?**

- [1] sempre      [2] eventualmente      [3] raramente    [4] nunca

**23. Você tem sonhos?**

- [1] sempre      [2] eventualmente      [3] raramente    [4] nunca

**24. Você tem algum problema relacionado a estresse?**

- [1] Sim                      [2] Não

**25. Se sim, quais os sintomas causados pelo estresse?**

[1]	Ansiedade	[7]	Desmotivação
[2]	Irritabilidade	[8]	Insônia
[3]	Emocionalidade acentuada	[9]	Pressão alta
[4]	Isolamento e introspecção	[10]	Gastrites
[5]	Problemas de memória	[11]	Queda de cabelo
[6]	Dores musculares	[12]	Outros

**26. Tem alguém com problema para dormir que mora com você?**

- [1] Sim                      [2] Não

**27. Se sim, qual a faixa etária desta pessoa?**

- |     |              |     |                  |
|-----|--------------|-----|------------------|
| [1] | 0 a 3 anos   | [6] | 40 a 59 anos     |
| [2] | 4 a 10 anos  | [7] | 60 a 69 anos     |
| [3] | 11 a 17 anos | [8] | 70- 79 anos      |
| [4] | 17 a 25 anos | [9] | Mais que 80 anos |
| [5] | 26 a 40 anos |     |                  |

27. Caso necessário, você teria interesse e disponibilidade de comparecer a uma reunião no Departamento de Tecnologia de Alimentos para uma discussão aberta e em grupo sobre sua opinião, dicas e sugestões para o desenvolvimento de um produto alimentício natural que melhore a qualidade do sono e diminua o estresse?

[1] Sim

[2] Não

Se sim:

Nome:

Telefone:

Melhor dia da semana:

Melhor horário:

**ANEXO 2 – DELINEAMENTO UTILIZADO NA APRESENTAÇÃO DAS  
EMBALAGENS AOS CONSUMIDORES.**

Consumidor	Ordem de Apresentação											
1	6	7	5	3	2	8	10	4	1	9	12	11
2	1	10	12	2	11	5	9	6	4	7	8	3
3	3	8	7	4	6	9	5	11	2	12	10	1
4	4	9	8	11	3	12	7	1	6	10	5	2
5	8	4	3	9	7	11	6	12	5	1	2	10
6	9	11	4	12	8	1	3	10	7	2	6	5
7	2	5	10	6	1	7	12	3	11	8	9	4
8	7	3	6	8	5	4	2	9	10	11	1	12
9	5	6	2	7	10	3	1	8	12	4	11	9
10	11	12	9	1	4	10	8	2	3	5	7	6
11	10	2	1	5	12	6	11	7	9	3	4	8
12	12	1	11	10	9	2	4	5	8	6	3	7
13	9	5	11	7	3	10	2	8	6	12	4	1
14	12	1	8	4	10	6	7	2	5	3	9	11
15	3	11	2	9	6	5	4	7	1	10	12	8
16	11	9	3	5	2	7	6	10	4	8	1	12
17	8	12	10	1	7	4	5	6	9	2	11	3
18	1	4	12	6	8	2	10	3	7	11	5	9
19	2	3	6	11	4	9	1	5	12	7	8	10
20	6	2	4	3	1	11	12	9	8	5	10	7
21	4	6	1	2	12	3	8	11	10	9	7	5
22	5	7	9	10	11	8	3	12	2	1	6	4
23	7	10	5	8	9	12	11	1	3	4	2	6
24	10	8	7	12	5	1	9	4	11	6	3	2
25	6	1	11	4	7	9	12	8	3	2	10	5
26	1	4	6	9	11	8	7	2	12	5	3	10
27	7	11	12	6	3	1	10	4	5	9	2	8
28	3	12	10	7	5	11	2	6	8	1	9	4
29	8	2	9	5	4	10	1	3	6	12	11	7
30	9	8	4	2	1	5	6	10	11	3	7	12
31	11	6	7	1	12	4	3	9	10	8	5	2
32	2	5	8	10	9	3	4	12	1	7	6	11
33	10	3	5	12	2	7	8	11	9	6	4	1
34	5	10	2	3	8	12	9	7	4	11	1	6
35	4	9	1	8	6	2	11	5	7	10	12	3
36	12	7	3	11	10	6	5	1	2	4	8	9
37	9	5	7	1	8	11	3	6	2	10	2	10
38	4	8	3	7	2	9	6	1	12	11	12	11
39	8	7	4	9	3	5	10	11	6	12	6	12
40	10	2	6	3	12	4	1	7	5	9	5	9
41	2	3	10	4	6	8	11	9	1	5	1	5
42	11	12	1	6	5	10	7	3	8	4	8	4
43	6	10	12	2	11	3	5	8	9	7	9	7

44	1	11	5	12	9	6	8	2	4	3	4	3
45	3	4	2	8	10	7	12	5	11	1	11	1
46	7	9	8	5	4	1	2	12	10	6	10	6
47	12	6	11	10	1	2	9	4	7	8	7	8
48	5	1	9	11	7	12	4	10	3	2	3	2