



INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CENTRO DE TECNOLOGIA DE EMBALAGEM

SYLVIA SALIONI CAMARGO NOVAES

**LEITE EM PÓ INTEGRAL ADICIONADO DE MICROCÁPSULAS DE ÔMEGA 3:
OBTENÇÃO DE MISTURA UNIFORME E EFEITO DAS CONDIÇÕES DE
ESTOCAGEM SOBRE A ESTABILIDADE DO PRODUTO EM DIFERENTES
EMBALAGENS**

Campinas – SP

2018

SYLVIA SALIONI CAMARGO NOVAES

**LEITE EM PÓ INTEGRAL ADICIONADO DE MICROCÁPSULAS DE ÔMEGA 3:
OBTENÇÃO DE MISTURA UNIFORME E EFEITO DAS CONDIÇÕES DE
ESTOCAGEM SOBRE A ESTABILIDADE DO PRODUTO EM DIFERENTES
EMBALAGENS**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia de Alimentos para obtenção do
título de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.*

Aluna: Sylvia Salioni Camargo Novaes

Orientadora: Prof^a Dr^a Rosa Maria Vercelino Alves

Coorientadora: Prof^a Dr^a Fiorella Balardin Hellmeister Dantas

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Sylvia Salioni Camargo Novaes e orientada pela Prof^a Dr^a Rosa Maria Vercelino Alves

CAMPINAS

2018

Agência(s): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Nº do processo: 2015/12955-0

Ficha Catalográfica

Elaborada pela bibliotecária Adriana Gomes do Nascimento crb/8 8853 –
Biblioteca Central do ITAL- Instituto de Tecnologia de Alimentos.

N935 Novaes, Sylvia Salioni Camargo. Leite em pó integral adicionado de microcápsulas de ômega 3: obtenção de mistura uniforme e efeito das condições de estocagem sobre a estabilidade do produto em diferentes embalagens. Sylvia Salioni Camargo Novaes/ Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP: ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2018. 147f.

Profª Drª Rosa Maria Vercelino Alves

1. Leite em pó integral. 2. Microcápsulas de ômega 3. 3. Mistura. 4. Embalagens flexíveis. 5. Latas. Instituto de Tecnologia de Alimentos, CETEA – Centro de Tecnologia de embalagem I. Instituto de Tecnologia de Alimentos. II. Sylvia Salioni Camargo Novaes. III. Título CETEA.

Título em inglês: Whole milk powder containing omega-3 microcapsules: obtaining uniform mixture and effect of storage conditions on product stability in different packaging

Key-words: Whole milk powder, omega-3 microcapsules, mixture, flexible packaging, metal can, composite can.

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora:

Drª Rosa Maria Vercelino Alves

Drª Marisa Padula

Drª Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá

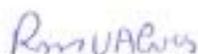
Drª Silvia Tondella Dantas

Data da Defesa: 22 de fevereiro de 2018.

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Sylvia Salioni Camargo Novaes aprovada pela Comissão Julgadora em 22 de fevereiro de 2018.



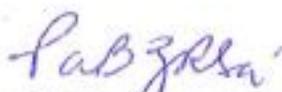
Profª Drª Rosa Maria Vercelino Alves
CETEA ITAL (Presidente)



Profª Drª Fiorella Balardin Hellmeister Dantas
CETEA ITAL (Coorientadora)



Profª Drª Marisa Padula (titular)



Drª Patricia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá (titular)

*“Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu”*

(Fernando Pessoa, Poema Mar Português)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Roberto e Maria Célia, que dedicaram suas vidas à minha formação pessoal e profissional e por não terem medido esforços para que eu chegasse até aqui. Obrigada minha mãe pelas horas dedicadas aos seus netos durante os meus estudos.

Ao meu marido, por compreender minha ausência, suportar meus anseios e me apoiar incondicionalmente. Aos meus filhos, pela inocente percepção da importância deste trabalho e por me lembrarem que as pausas para os risos e brincadeiras são tão relevantes quanto as horas dedicadas ao estudo.

À Prof^a Dr^a Rosa Maria Vercelino Alves, por me orientar e por acreditar que este projeto seria concluído mesmo diante dos meus desafios em conciliar rotinas de trabalho, família e estudo.

À Prof^a Dr^a Fiorella Balardin Hellmeister Dantas, mentora desse trabalho, obrigada por confiar em mim e permitir que eu explorasse este projeto. Seu apoio foi fundamental para a conclusão desta etapa.

À Dr^a Izabela Dutra Alvim, pelo companheirismo, amizade e conselhos durante todo o trabalho. Todas as dicas recebidas enriqueceram o projeto de uma forma inestimável.

À Dr^a Aline de Oliveira Garcia, por toda a ajuda na execução das análises sensoriais, interpretação e discussão dos resultados obtidos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do projeto.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, pela oportunidade de realização do Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Ao CETEA, por disponibilizar equipamentos e funcionários para desenvolver e auxiliar grande parte das análises.

Ao CCQA, por auxiliar nas análises químicas desse projeto, em especial à Mestre Ana Maria Rauen de Oliveira Miguel, por todo seu conhecimento na área de cromatografia e oxidação de lipídios.

Ao TECNOLAT, por auxiliar nas análises microbiológicas.

Às bolsistas de iniciação científica, Sophia Lamonica e à Karoline Urbano, por me auxiliarem em todo o projeto. Meninas, vocês foram a chave para o meu sucesso!

Ao meu colega, Mestre Luis Marangoni, por facilitar a minha jornada, seja pelo coleguismo, seja por permitir que eu seguisse alguns de seus passos.

À Christiane, Paula, e aos demais colegas do CETEA já mencionados por me auxiliarem no desenvolvimento, acondicionamento e acompanhamento das análises deste projeto.

À Daisy Moitinho, por me ensinar a encontrar respostas por meio da estatística.

Aos professores membros da banca examinadora pela disponibilidade, tempo dedicado e por suas valiosas contribuições à dissertação.

À Ana Candida pela padronização das referências.

A todos os provadores, que tiveram disponibilidade de tempo em participar da análise sensorial deste trabalho.

Às empresas, Itambé S.A e BASF por terem fornecido os principais materiais empregados neste projeto.

A todos os colegas de mestrado, por compartilharem desses anos de desafios.

À BRF S/A, pelas horas concedidas para que a conclusão deste projeto fosse possível.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho

RESUMO

O leite é considerado um alimento completo e faz parte da dieta base de crianças e muitos adultos. O consumo de alimentos fonte de ômega 3 vem sendo recomendado pela comprovação dos diversos benefícios à saúde de seus consumidores, tais como prevenção de doenças cardíacas e vasculares bem como desenvolvimento saudável do feto e recém-nascido. Neste trabalho, inicialmente foi desenvolvido um método experimental para obtenção de uma mistura uniforme entre leite em pó integral e microcápsulas de óleo de peixe rico em ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA). O método determinou o tempo de processamento para obtenção de uma mistura cujos desvios padrões da somatória dos componentes minoritários (EPA e DHA) em dois testes empregados para validação foram iguais a 0,011 µg/ 100 g e 0,014 µg/ 100 g e os coeficientes de variação, iguais a 3,38% e 3,71%. O produto obtido da mistura, foi acondicionado em 4 tipos de embalagens comercialmente disponíveis, em ar atmosférico: embalagens flexíveis de polietileno tereftalato metalizado com alumínio e laminado com polietileno de baixa densidade (PETmet/PEBD) e de polipropileno biorientado laminado com polipropileno (BOPP/PP) e embalagens rígidas, latas metálica e multifoliada. Os produtos embalados foram armazenados em duas condições aceleradas de temperatura e umidade: 34 °C/ 83% de umidade relativa (UR) e 43 °C/ sem controle de UR, embora a mesma tenha sido monitorada. Durante 15 semanas, o produto foi avaliado quanto ao teor de oxigênio no espaço livre das embalagens, atividade de água (A_w), conteúdo de umidade, cor (b^*), teor de ácidos graxos EPA, DHA e ácido graxo alfa-linolênico (ALA). Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas no decorrer do estudo. Análises sensoriais foram conduzidas desde a escolha do fornecedor e dosagem das microcápsulas de ômega 3 para a formulação do produto, até o final do estudo de estabilidade do produto nas 4 embalagens e em ambas condições de estocagem. Os resultados demonstraram que o consumo de oxigênio no espaço livre da embalagem está diretamente relacionado à condição de estocagem. A formação de cristais de lactose ocorreu no produto em BOPP/PP armazenado a 34 °C/ 83% de UR e nos produtos em latas metálica e multifoliada armazenados a 43 °C, sendo este fenômeno correlacionado às demais causas de degradação do alimento. A microencapsulação foi efetiva para manter os teores de EPA e DHA do

produto ao longo do tempo, independentemente do tipo de embalagem e condição de armazenagem.

Palavras-chave: leite em pó integral; microcápsulas de ômega 3; mistura; embalagens flexíveis; lata

ABSTRACT

Milk is considered a complete food and is part of the diet of children and many adults. The consumption of omega-3 food source has been recommended by the evidence of the various health benefits of its consumers, such as prevention of heart and vascular diseases as well as healthy development of the fetus and newborn. In this work, an experimental method was developed to obtain a uniform mixture of whole milk powder and fish oil microcapsules rich in eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). The method determined the processing time to obtain a mixture whose standard deviations of the summation of the minor components (EPA and DHA) in two tests used for validation were 0.011 µg / 100 g and 0.014 µg/ 100 g and the coefficients of variation were equal to 3.38% and 3.71%. The product obtained from the mixture was packed in 4 types of commercially packages in atmospheric air: metallized polyethylene terephthalate laminated to low density polyethylene (PETmet/LDPE) and polypropylene bioriented laminated to polypropylene (BOPP/PP) and rigid packaging, metal and composite cans. The packaged products were stored under two accelerated conditions of temperature and relative humidity (RH): 34 °C / 83% RH and 43 °C / without RH control, although it was monitored. For 15 weeks, the product was evaluated for the oxygen content in the packages headspace, water activity (Aw), moisture content, color (b-value), EPA, DHA and alpha-linolenic acid (ALA) contents Scanning electron microscopy (SEM) images were obtained during the study. Sensory analyzes were conducted from the supplier choice and dosage of the omega 3 microcapsules for the formulation of the product, until the end of the stability study of the product in the 4 packages and in both conditions of storage. The results showed that the oxygen consumption in the headspace of the packaging is directly

related to the storage condition. The formation of lactose crystals occurred in the product in BOPP/PP stored at 34 °C/ 83% RH and in metallic and composite cans stored at 43 °C, and this phenomenon was correlated with the other causes of food degradation. Microencapsulation was effective to maintain the product's EPA and DHA levels over time, regardless of the type of packaging and storage condition.

Key words: milk powder; omega-3 microcapsules; mixture; flexible packaging; metal can; composite can

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
SUMÁRIO	x
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
INTRODUÇÃO	1
Referências	3
Objetivo principal	5
Objetivos específicos	5
1. CAPÍTULO 1	6
1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
1.1.1. Alimentos funcionais	6
1.1.2. Leite	7
1.1.3. Leite em pó	9
1.1.4. Ômega 3	16
1.1.5. Mistura de alimentos em pó	19
1.1.6. Embalagens para alimentos em pó	20
1.1.7. Vida útil de alimentos embalados	29
1.2. Referências	30
2. CAPÍTULO 2	38
Experimental method to obtain a uniform food powder mixture of omega-3 microcapsules and whole milk powder	38
Abstract	39
2.1. Introduction	39
2.2. Material and Methods	42

2.2.1.	Material	42
2.2.2.	Characterization of the powders.....	42
2.2.3.	Preparing the omega-3 microcapsule for the mixing test	45
2.2.4.	Mixture Processing.....	45
2.2.5.	Definition of the mathematical function to determine the mixing time 50	
2.2.6.	Validation of mixing time	50
2.2.7.	Statistical analysis.....	52
2.3.	Results and Discussion.....	52
2.3.1.	Characterization of the powders.....	52
2.3.2.	Determination of the mixing time	56
2.3.3.	Validation of mixing time	57
2.4.	Conclusion	59
2.5.	References.....	59
3.	CAPÍTULO 3	64
	Stability of omega-3 enriched milk powder in different commercial packages stored under accelerated conditions of temperature and relative humidity.....	64
	Abstract.....	65
3.1.	Introduction	65
3.2.	Materials and Methods.....	68
3.2.1.	Materials.....	68
3.2.2.	Preparation and packaging of samples	70
3.2.3.	Package headspace oxygen content	71
3.2.4.	Water activity.....	71
3.2.5.	Moisture content.....	71
3.2.6.	Colour (b* value)	72
3.2.7.	Concentration of n-3 fatty acids (PUFA).....	72
3.2.8.	Morphology and Microstructure.....	72

3.2.9. Statistical analysis.....	73
3.3. Results and Discussion.....	73
3.4. Conclusion	87
3.5. References.....	88
4. CAPÍTULO 4	93
Avaliação sensorial de leite em pó enriquecido com ômega 3 em diferentes embalagens comerciais: estabilidade em condições aceleradas de temperatura e umidade relativa	93
Resumo.....	94
4.1. Introdução	94
4.2. Material e Métodos	96
4.2.1. Material	96
4.2.2. Análise descritiva para a seleção de fornecedores de microcápsulas de ômega 3.....	97
4.2.3. Teste com consumidores para a definição da concentração de microcápsulas de ômega 3 adicionadas ao leite em pó integral.....	98
4.2.4. Preparo e acondicionamento das amostras	100
4.2.5. Análises microbiológicas	101
4.2.6. Avaliação sensorial do produto durante estudo de estabilidade 101	
4.3. Resultados e Discussão.....	103
4.3.1. Análise Descritiva para a seleção de fornecedores de microcápsulas de ômega 3.....	103
4.3.2. Teste com consumidor para a definição da concentração de microcápsulas de ômega 3 adicionadas ao leite em pó integral.....	104
4.3.3. Análises microbiológicas	107
4.4. Conclusões	117
4.5. Referências.....	117
CONCLUSÕES	121

ANEXOS	123
ANEXO 1. Aprovação do protocolo de pesquisa pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Jaguariúna (FAJ).	123
ANEXO 2. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	128

LISTA DE TABELAS

Table 2.1. Mixing composition	46
Table 2.2. Characterization of whole milk powder and omega-3 microcapsules according to the mean diameter and the expansion index	52
Table 2.3. Characterization of whole milk powder and omega-3 microcapsules according to density and flow properties	54
Table 2.4. Characterization of whole milk powder and omega-3 microcapsules according to moisture and water activity.....	55
Table 2.5. Total concentration of omega-3 microcapsules in the mixture ($\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$), sample standard deviation ($\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$) and Coefficient of Variation (%) at different mixing times	56
Table 2.6. Concentrations of eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) fatty acids and their concentrations at different sampling points	58
Table 3.1. Main characteristics of evaluated packages and their closure systems	69
Tabela 4.1. Descritores utilizados na avaliação descritiva CATA.....	99
Tabela 4.2. Notas de caracteres após consenso	103
Tabela 4.3. Resultados médios obtidos na avaliação da aceitabilidade do leite e porcentagens de aceitação, indiferença e rejeição.....	105
Tabela 4.4. Resultados das análises microbiológicas das amostras em tempo zero e na 15ª semana de armazenagem, nas diferentes condições de estocagem.....	107
Tabela 4.5. Atributos de maior correlação ($R^2 > 0,8$ ou $R^2 < -0,8$) nas condições de estocagem 34 °C/ 83% de UR e 43 °C.....	112

LISTA DE FIGURAS

Figura A. Volume dos produtos lácteos exportados pelo Brasil, 2013/2016. Fonte: ZOOICAL, 2016	1
Figura 1.1. Temperatura de transição vítrea de leite em pó em função de atividade de água. ○ Tg da lactose (LLOYD; CHEN; HARGREAVES, 1996). ● Tg da lactose; Δ Tg do leite em pó desnatado; ■ Tg do leite em pó integral (JOUPPILA; ROOS, 1994). Δ Tg do leite em pó desnatado; □ Tg do leite em pó integral (VUATAZ, 1999). Uma única curva descreve leite em pó contendo lactose (Fonte: THOMAS et al, 2004)	13
Figura 1.2. Reação de condensação descrita por Hodge (1953) (Fonte: MESQUITA; QUEIROZ, 2015)	15
Figura 1.3. Seção transversal da folha de flandres (Fonte: CSN, s.d.)... ..	22
Figura 1.4. Primeira (a) e segunda (b) operação de recravação da lata metálica (Fonte: DANTAS, 2014)	24
Figura 1.5. Estrutura lata multifoliada (Fonte: ROMAINE, 2005)	25
Figure 2.1. Stained omega-3 microcapsules (A) and mixing these particles into the whole milk powder (stereoscopy) bar = 200 μm	45
Figure 2.2. Pre-mixing flowchart	46
Figure 2.3. Intensive Horizontal Mixer Consolid. (a) external view, (b) internal view	47
Figure 2.4. Accessory for sample collection made by the authors	47
Figure 2.5. Diagram showing sample collection points	48
Figure 2.6. Images of the mixture samples (Mω3 + milk) (A) and of Mω3 (B) adhered to the circular orifices of the accessory obtained by the LEICA EC3 equipment coupled to the LEICA M165C stereomicroscope (LEICA, Germany) times 10x magnified	49
Figure 2.7. Illustrative scheme of the sample collection points of the validation tests of the mixing time.....	51
Figure 2.8. Surface morphology and microstructure (Scanning Electron Microscopy - SEM) of whole milk powder (A), Mω3 particles (B) and mixture between the two components (C), where A1, B1 and C1, bar = 500 μm; A2, B2 and C2, bar = 100 μm	53

Figure 2.9. Graphical representation of the fourth order polynomial obtained for expression of the standard deviation of the mixture (σ_m) over the mixing time (s)	57
Figure 3.1. Oxygen content (%v/v) in the package headspace over time in the storage conditions of 34 °C/ 83% RH (a) and 43 °C (b).....	74
Figure 3.2. Aw of the product in different packages over time in the storage conditions of 34 °C/ 83% RH (a) and 43 °C (b).....	76
Figure 3.3. Product moisture content (%) in different packages over time in the storage conditions of 34 °C/ 83% RH (a) and 43 °C (b).....	76
Figure 3.4. b* value (colour) of the product in different packages over time in the storage conditions of 34 °C/ 83% RH (a) and 43 °C (b)	78
Figure 3.5. Summation of the EPA and DHA concentrations (mg/13 g) of the product in different packages over time in the storage conditions of 34 °C/83 % RH (a) and 43 °C (b) and the ALA concentration (mg/ 13 g) of the product in different packages over time in the storage conditions of 34 °C/ 83% RH (c) and 43 °C (d)	80
Figure 3.6. Surface and microstructure morphology (SEM) of samples at the beginning of the study (zero time), where a = whole milk powder particles, increase of 1000 x, 10 kv, bar = 10 μ m and b = omega-3 microcapsules, increase of 250 x, 10 kv, bar = 100 μ m.....	83
Figure 3.7. Surface and microstructure morphology (SEM) of samples at the 12th week of storage at 34 °C/ 83 % RH, where a = sample in PETmet/LDPE, b = sample in BOPP/PP, c = sample in metal can and d = sample in composite can. Increase of 250 x, 10 kv, bar = 100 μ m. The arrows show the omega-3 microcapsules.	83
Figure 3.8. Surface and microstructure morphology (SEM) of samples at the 12th week of storage at 43 °C, where a = sample in PETmet/LDPE, b =sample in BOPP/PP, c = sample in metal can and d =sample in composite can. Increase of 250 x, 10 kv, bar = 100 μ m. The arrows show the omega-3 microcapsules.....	84
Figure 3.9. Surface and microstructure microscopy morphology (SEM) of samples in the 12th week of storage at 34 °C/ 83% RH, where a = sample in PETmet/LDPE, b = sample in BOPP/PP, c = sample in metal can and d = sample in composite can. Increase of 1000 x, 10 kv increase, bar = 10 μ m.....	85

Figure 3.10. Surface and microstructure morphology (SEM) of samples in the 12th week of storage at 43 °C, where a = sample in PETmet/LDPE, b = sample in BOPP/PP, c = sample in metal can and d = sample in composite can. Increase of 1000 x, 10 kv, bar = 10 μm..... 86

Figura 4.1. Faixa etária (a) e classe social (b) do grupo de consumidores recrutado para avaliação das amostras 104

Figura 4.2. Frequência de consumo de leite (a) e tipo de leite consumido (b)..... 104

Figura 4.3. Qualidade global avaliada sensorialmente ao longo do tempo nas condições de estocagem de 34 °C/ 83% de UR (a) e 43 °C (b) 108

Figura 4.4. Dendograma resultante da análise de agrupamentos hierárquicos aglomerativos (AHC) por dissimilaridade para a condição de estocagem a 34 °C/ 83% de UR..... 110

Figura 4.5. Dendograma resultante da análise de agrupamentos hierárquicos aglomerativos (AHC) por dissimilaridade para a condição de estocagem a 43 °C..... 110

Figura 4.6. Configuração em duas dimensões do consenso de análises sensoriais de Perfil Livre das amostras de leite e pó enriquecido com ômega 3. (a) a letra “t” seguida de número significa o tempo em que a análise foi realizada (zero, 3 semanas, 6 semanas...). O valor entre colchetes representa a nota de qualidade global (média) obtida pela amostra no respectivo tempo. (b) letras representam aspecto (A) e aroma (B) do pó; aspecto (C), aroma (D), sensação na boca (E) e sabor do leite reconstituído (F). Números diferentes sucedendo as letras representam descritivos diferentes. Descritivos destacados em amarelo apresentam $R^2 > 0,8$ ou $R^2 < -0,8$ na primeira dimensão. Condição de estocagem 34 °C/ 83% de UR. 113

Figura 4.7. Configuração em duas dimensões do consenso de análises sensoriais de Perfil Livre das amostras de leite e pó enriquecido com ômega 3. (a) a letra “t” seguida de número significa o tempo em que a análise foi realizada (zero, 3 semanas, 6 semanas...). O valor entre colchetes representa a nota de qualidade global (média) obtida pela amostra no respectivo tempo. (b) letras representam aspecto (A) e aroma (B) do pó; aspecto (C), aroma (D), sensação na boca (E) e sabor do leite reconstituído (F). Números diferentes sucedendo as letras representam descritivos diferentes. Descritivos destacados em amarelo

apresentam $R^2 > 0,8$ ou $R^2 < -0,8$ na primeira dimensão. Descritivos destacados em cinza apresentam $R^2 > 0,8$ ou $R^2 < -0,8$ na segunda dimensão. Condição de estocagem 43 °C..... 115

Figura 4.8. Amostras dos produtos reconstituídos após 15 semanas de armazenagem a 34 °C/ 83% de UR (A) e 43 °C (B), onde 1 = amostra em lata multifoliada, 2 = amostra em lata metálica, 3 = amostra em PETmet/PEBD e 4 = amostra em BOPP/PP..... 116

INTRODUÇÃO

A principal fonte natural de ômega 3 na dieta humana, ácidos graxos poli-insaturados essenciais eicosapentaenoico (EPA) e o docosahexaenoico (DHA), consiste em uma variedade de peixes marinhos (SHAHIDI, 2010).

Esses nutrientes têm sido associados a uma série de benefícios aos consumidores, contudo, dados disponíveis do consumo per capita desses peixes apontam que, na maioria das regiões do Brasil, o consumo é baixo e os principais peixes consumidos não contém teores elevados de ômega 3 (IBGE, 2011; SARTORI; AMANCIO, 2012). Além disso, nas últimas três décadas, as mudanças de condições socioeconômicas e, conseqüentemente, estilo de vida levaram a um decréscimo no consumo de alimentos naturalmente fontes de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 (n-3 PUFA, em inglês, *omega-3 polyunsaturated fatty acids*) em países ocidentais (SIMOPOULOS, 2016)

A predileção dos consumidores por alimentos que ofereçam benefícios extras à saúde tem aumentado a demanda por produtos fortificados em diversos países (ARBOLEYA, 2010) e a expressiva representatividade do leite em pó nas exportações de produtos lácteos (Figura A) justifica o uso do mesmo no presente estudo (ZOOICAL, 2016).

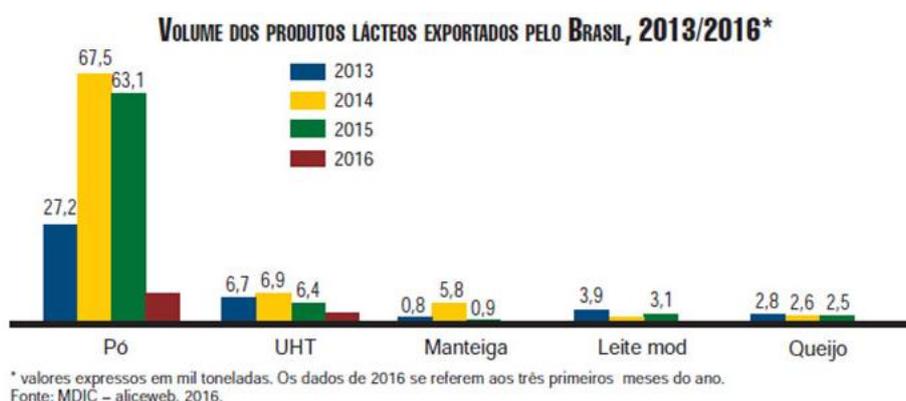


Figura A. Volume dos produtos lácteos exportados pelo Brasil, 2013/2016. Fonte: ZOOICAL, 2016

O Brasil e os principais países importadores de leite em pó e leite para crianças (Venezuela, Arábia Saudita, Angola, Emirados Árabes, Trinidad e Tobago, Bolívia, Paraguai e Colômbia) (ZOOCAL, 2016) são países caracterizados por clima tipicamente quente, tropical e/ou subtropical com médias pluviométricas variadas (CLIMATE, 2018). Neste âmbito, o estudo da estabilidade de leite em pó enriquecido com ômega 3 em condições aceleradas de temperatura e umidade relativa adequa-se às características climatológicas destes países.

Os n-3 PUFAs são altamente susceptíveis à oxidação lipídica, porém a incorporação de ômega 3 ao leite em pó pode ser viabilizada pelo uso destes ácidos graxos microencapsulados. A aplicação de diferentes sistemas de embalagem possibilita avaliar o efeito combinado da macroproteção (influência do material de embalagem) e microproteção (microencapsulação) na manutenção da qualidade global do produto fortificado e no conteúdo de ômega 3.

Diversos autores têm estudado o efeito da temperatura na ocorrência de reações de degradação do leite em pó e fórmulas lácteas contendo n-3 PUFA (CHENG et al., 2017; GARCÍA-MARTINEZ et al., 2010; GONZALES et al., 2010; ROMEU-NADAL et al., 2007; THOMSEN et al., 2005; YAZDANPANA; LANGRISH, 2013) e é de vasto conhecimento que a taxa das reações é acentuada quanto maior for a temperatura de armazenamento. Geralmente os estudos são conduzidos com amostras acondicionadas em embalagens não comerciais (vials de vidros, cápsulas ou pouches de materiais plásticos com propriedades de barreira à gases e vapor d'água não quantificadas).

O uso de embalagens comercialmente disponíveis neste estudo corrobora a influência do material de embalagem na ocorrência de fenômenos que podem favorecer a degradação do produto ao longo da vida útil, além disso, o emprego da lata multifoliada para acondicionamento de leite em pó (fortificado ou não) é inédito no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ARBOLEYA, J.-C.; LASA, D.; OLABARRIETA, A. I.; MARAÑÓN, I. M. de. New trends for food product design. In: SMITH, J.; CHARTER, E. **Functional food product development**. United Kingdom: Wiley-Blackwell, 2010. cap. 11, p. 229-241.
- CHENG, H.; RU-GANG, Z.; ERICHSEN, H.; SOERENSEN, J.; PETERSEN, M. A.; SKIBSTED, L. H. High temperature storage of infant formula milk powder for prediction of storage stability at ambient conditions. **International Dairy Journal**, n. 73, p. 166-174, 2017.
- CLIMATE. **Climogramas**. Disponível em: <<https://pt.climate-data.org/>>. Acesso em: 09 jan. 2018.
- GARCÍA-MARTÍNEZ, C.; RODRÍGUEZ-ALCALÁ, L. M.; MARMESAT, S.; ALONSO, L.; FONTECHA, J.; MÁRQUEZ-RUIZ, G. Lipid stability in powdered infant formula stored at ambient temperatures. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 11, n. 45, p. 2337-2344, 2010.
- GONZALES, A. P.; NARANJO, G. B.; LEIVA, G. E.; MALEC, L. S. Maillard reaction kinetics in milk powder: effect of water activity at mild temperatures. **International Dairy Journal**, v. 1, n. 20, p. 40-45, 2010.
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, 2011.
- ROMEU-NADAL, M.; CHAVEZ-SERVIN, J. L.; CASTELLOTE, A. I.; RIVERO, M.; LOPEZ-SABATER, M. C. Oxidation stability of the lipid fraction in milk powder formulas. **Food Chemistry**, v. 2, n. 100, p. 756-763, 2007.
- SARTORI, A. G. O.; AMANCIO, R. D. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 83-93, 2012.
- SHAHIDI, F. Functional and nutraceutical lipids. In: SMITH, J.; CHARTER, E. **Functional food product development**. UK: Wiley-Blackwell, 2010. cap. 5, p. 101-107.
- SIMOPOULOS, A. P. An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. **Nutrients**, v. 3, n. 8, p.128, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4808858/>> Acesso em: 11 dez. 2017.
- THOMSEN, M. K.; LAURIDSEN, L.; SKIBSTED, L. H.; RISBO, J. Temperature effect on lactose crystallization, maillard reactions, and lipid oxidation in whole milk

powder. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 53, p. 7082-7090, 2005.

YAZDANPANA, N.; LANGRISH, T. A. Comparative study of deteriorative changes in the ageing of milk powder. **Journal of Food Engineering**, v. 1, n. 114, p. 14-21, 2013.

ZOOCAL, R. **Brasil e o comércio internacional de lácteos**. Disponível em: <<http://www.baldebranco.com.br/brasil-e-o-comercio-internacional-de-lacteos/>> Acesso em: 09 jan. 2018.

OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar o efeito das condições aceleradas de temperatura e umidade relativa de armazenagem em leite em pó integral enriquecido com microcápsulas de óleo de peixe rico em EPA e DHA, acondicionado em 4 diferentes sistemas de embalagens.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter mistura homogênea das microcápsulas de ômega 3 e leite em pó integral;
- Avaliar o efeito combinado da macroproteção (influência do material de embalagem) e da microproteção (microencapsulação) na manutenção da qualidade global do produto fortificado e no conteúdo de ômega 3;
- Avaliar a estabilidade dos ácidos graxos EPA e DHA nas condições de estocagem do produto nos diferentes materiais de embalagem.

1. CAPÍTULO 1

1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1. Alimentos funcionais

A definição de alimentos funcionais foi proposta inicialmente no Japão, em meados da década de 80, como o resultado de esforços para desenvolver alimentos que possibilitassem a redução dos gastos com saúde pública, considerando a elevada expectativa de vida naquele país. Nos anos 90, recebeu a designação em inglês de FOSHU (*food for specified health use*, alimento para uso específico de saúde) que se refere aos alimentos usados como parte de uma dieta normal que, além de suas funções básicas nutricionais, propiciam benefícios fisiológicos e/ou reduzem o risco de doenças crônicas. Diversos países adotaram o princípio da funcionalidade dos alimentos, entretanto, as denominações das alegações, bem como os critérios para a sua aprovação variam de acordo com a regulamentação local ou regional (STRINGHETA et al., 2007).

Somente no Japão a expressão “alimento funcional” é definida por lei (JONES; VARADY, 2008). A legislação brasileira não define alimento funcional, entretanto, estabelece as diretrizes para utilização da alegação de propriedade funcional e da alegação de propriedades de saúde, bem como as condições de registro para os alimentos que fazem uso dessas alegações (BRASIL, 1999 a, b, c). Neste âmbito, alegação de propriedade funcional refere-se ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente desempenha no crescimento, no desenvolvimento, na manutenção e em outras funções normais do organismo humano, enquanto que alegação de propriedade de saúde afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente e a doença ou condição relacionadas à saúde (COSTA; ROSA, 2010).

Diversos ingredientes têm sido utilizados pela indústria de alimentos com reconhecidas propriedades funcionais, tais como lipídios nutracêuticos e funcionais (ácidos graxos ômega 3 e ômega 6, ácido linoleico conjugado), probióticos e prebióticos, isoflavonas, flavonoides, carotenoides, ingredientes fontes de fibras (inulina, frutooligossacarídeos, polidextrose, dextrina resistente, betaglucana, lactulose), entre outros (SHAHIDI, 2010).

Os produtos lácteos são bastante representativos dentro do mercado de alimentos funcionais. O sucesso destes alimentos se deve ao fato de o leite ser naturalmente parte de uma dieta diária altamente nutritiva e balanceada. A concepção e o desenvolvimento de funcionalidade em produtos lácteos simplesmente envolvem modificar ou enriquecer a natureza saudável deste alimento (MATTILA-SHANDHOLM; SAARELA, 2003).

Dentre os produtos lácteos com propriedades funcionais, a pioneira no lançamento de um leite enriquecido com ômega 3 foi a companhia italiana de laticínios, Parmalat. O leite fluido “Plus Ômega 3” foi lançado em 1998 e é um leite semidesnatado enriquecido com 80 mg de ômega-3, cuja recomendação de consumo é de meio litro por dia (MELLENTIN; HASMAN, 1999 apud MATTILA-SHANDHOLM; SAARELA, 2003). Outros produtores de todo o mundo seguiram com o desenvolvimento de leites enriquecidos com ômega 3, sendo estes acrescidos de antioxidantes, tais como vitaminas A, C e E (MATTILA-SHANDHOLM; SAARELA, 2003).

1.1.2. Leite

A preocupação com a importância de uma dieta balanceada e que ofereça todos os substratos necessários para manutenção do organismo humano faz com que alguns alimentos, assim como o leite, desenvolvam um papel importantíssimo na nutrição. O leite contém inúmeros nutrientes e é constituído basicamente por lactose, que funciona como facilitador na absorção de minerais; gorduras que contém ácidos graxos essenciais para absorção de vitaminas lipossolúveis; proteínas, que são de extrema necessidade para manutenção e crescimento do

organismo, sendo o seu mais nobre componente; sais minerais, principalmente nas formas de cálcio e fósforo, atuando como componentes de reações metabólicas e constituição de ossos e tecidos, bem como vitaminas, dentre as quais, a vitamina A, que fortalece a visão e auxilia no combate a infecções; algumas vitaminas do complexo B, que auxiliam no crescimento e são essenciais para a saúde da pele e a vitamina D, componente fundamental na absorção do cálcio (AGUIAR; CORÓ; PEDRÃO, 2005).

O leite é naturalmente um alimento fonte de ingredientes funcionais. O ácido linoleico conjugado (CLA) é produzido por bactérias fermentativas do estômago (rúmen) de animais ruminantes e está presente em maiores concentrações em carnes, leites e derivados. O CLA consiste em uma mistura de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoleico (C18:2) que apresentam uma ligação simples entre as insaturações e, entre os benefícios à saúde atribuídos ao CLA destacam-se: anticarcinogênese, antiaterosclerose, inibição de radicais livres, alteração na composição e no metabolismo do tecido adiposo, imunomodulação, atividade antibacteriana e antidiabética (RAINER; HEISS, 2004; MONICI; PACHECO, 2009).

Além do CLA, outros componentes como os peptídeos biologicamente ativos (bioativos) estão naturalmente presentes em produtos lácteos. Peptídeos bioativos ou bio-funcionais são fragmentos específicos de proteínas contendo de 3 a 20 resíduos de aminoácidos por moléculas, geralmente inativos dentro da sequência da molécula, contudo, com capacidade de modularem a função fisiológica da célula alvo, impactando positivamente nas funções ou condições corpóreas e podendo influenciar a saúde. Os peptídeos bioativos do soro de leite estão relacionados à saúde cardiovascular, pois atuam no controle da pressão arterial, possuem atividade antitrombótica e estão relacionados à redução do nível de colesterol. Já os peptídeos bioativos originados da proteólise das caseínas atuam na absorção de minerais; possuem ações imunoprotetora ou imunoestimulante, anti-hipertensiva, antitrombótica, antimicrobiana e apresentam tanto ação opióide (atuam no sistema nervoso central e em órgãos periféricos produzindo diversos efeitos fisiológicos tais como sedação, hipotensão, regulação

da temperatura corporal e regulação da ingestão de alimentos) quanto antiopióide (ação antagonista) (ALVES; SPADOTI; GAMA, 2017).

1.1.3. Leite em pó

A demanda por produtos lácteos tem apresentado incremento considerável na última década (taxa anual de 3% ao ano) ainda que em 2015 tenha sido observada uma redução de 2% no consumo interno de leite per capita (174 litros de leite/habitante.ano) quando comparado ao ano anterior (178 litros de leite/habitante.ano). A queda no consumo interno vem sendo atribuída à recessão que gerou desemprego, inflação e reduziu a renda real dos brasileiros (MILKINET, 2015). Neste cenário, a produção de leite em pó representa uma alternativa para escoamento do excedente de produção, uma vez que frequentemente a oferta dos produtores se mantém, mesmo diante da redução do consumo em natureza.

No comércio exterior, o leite em pó representou por muitos anos o principal produto lácteo exportado, o que vai de encontro à grande importância econômica deste alimento. As exportações de leite em pó, em 11 anos, tiveram acréscimo de 15%, subindo de 60% em 1997 para 75% em 2008 das vendas em dólares realizadas pelo país. No mercado interno, o grande consumo de leite em pó se dá no mercado varejista, mas seu emprego na merenda escolar também é significativo (SIQUEIRA et al., 2010). No primeiro semestre de 2017, o principal produto lácteo exportado foi o leite condensado, representando 43% das vendas totais, deixando o leite em pó em segundo lugar, com 16%. O setor tem buscado novos mercados para o leite em pó visto que as vendas no mercado internacional foram diretamente impactadas pelo cenário econômico da Venezuela, principal importador do produto brasileiro (SP:..., 2017).

O processo usual de fabricação de leite em pó integral consiste nas etapas de padronização e pré-aquecimento do leite fluido, seguido por evaporação térmica, homogeneização e secagem em *spray dryer* (CHANDAN; KILARA; SHAH, 2009).

A padronização do leite fluido é essencial para garantir que o leite em pó atenda aos requisitos de composição. Basicamente, o leite em pó integral é composto por 26% de proteína, 27% de gordura, 38% de lactose, 6% de cinzas e 3% de umidade (CHANDAN; KILARA; SHAH, 2009). Já a etapa de pré-aquecimento é fundamental para conferir boa qualidade microbiológica aos produtos lácteos e inativar enzimas. Se enzimas lipases não forem destruídas durante o pré-aquecimento, rancidez hidrolítica irá ocorrer durante estocagem de leite em pó integral (HALL; HEDRICK, 1971).

Na produção de leite em pó integral, o leite fluido é termicamente concentrado, geralmente até 45-50% de sólidos totais, em evaporadores de múltiplos estágios que operam a vácuo. O tempo de retenção em cada evaporador é de aproximadamente 60 segundos. O leite é exposto à temperatura de até 72 °C no primeiro estágio, sendo os demais estágios operados a temperaturas inferiores. A concentração do leite antes da secagem, reduz os custos do processamento, contudo, é fundamental que a viscosidade do leite concentrado que irá alimentar o *spray dryer* seja controlada. A alta viscosidade influencia as propriedades de solubilidade do leite em pó e afeta a eficiência do processo de secagem (CHANDAN; KILARA; SHAH, 2009).

A etapa seguinte à concentração é denominada homogeneização. Nesta etapa, o leite concentrado passa por orifício de calibre reduzido sendo submetido a altas pressões que irão reduzir o tamanho dos glóbulos de gordura. Conseqüentemente, a área superficial total de gordura aumenta e uma nova membrana é formada, composta pela membrana original dos glóbulos de gordura e por proteínas adsorvidas das proteínas do leite (HALL; HEDRICK, 1971; CHANDAN; KILARA; SHAH, 2009).

O processo mais comum de secagem para obtenção do leite em pó é a desidratação por nebulização que consiste em pulverizar pequenas gotículas do leite concentrado no interior de uma câmara que entra em contato com ar quente em temperatura de aproximadamente 150 a 160 °C promovendo a evaporação das gotículas de água quase instantaneamente (ORDÓÑEZ, 2005a; CHANDAN; KILARA; SHAH, 2009; FELLOWS, 2017a).

1.1.3.1. Principais causas de alteração do leite em pó durante armazenagem

As principais causas de alterações em alimentos em pó com altos teores de açúcares, lipídios e proteínas e de baixa atividade de água decorrem de mecanismos químicos, através das reações oxidativas e de escurecimento não enzimático, ou físicos, geralmente associados à alta higroscopicidade deste tipo de alimento, favorecendo a ocorrência de aglomeração pela incorporação de água e, conseqüentemente, cristalização da lactose.

1.1.3.1.1. Oxidação lipídica

Os triglicerídeos compreendem 95% do total de lipídios do leite (ORDÓÑEZ, 2005b) e são formados pela esterificação de glicerol com ácidos graxos, que são extremamente suscetíveis ao ataque pelo oxigênio. A rancidez em produtos gordurosos é bastante significativa como alteração, gerando produtos sensorialmente inaceitáveis, induzindo à produção de odores e sabores estranhos, além de outros efeitos degradativos, como alteração de cor, destruição de vitaminas, polimerização de compostos e perda de valor nutritivo (McCLEMENTS; DECKER, 2010; SCHAICH et al., 2015).

A oxidação lipídica normalmente envolve a reação do oxigênio molecular com ácidos graxos insaturados e é influenciada por fatores como grau de instauração dos ácidos graxos e presença de íons de metais de transição. Os ácidos graxos poli-insaturados, entre eles os ácidos oleico, linoleico, linolênico e araquidônico, são os principais precursores da formação dos compostos aldeídos, em razão de suas prevalências nos produtos lácteos (SCHAICH et al., 2015).

A reação se inicia quando um átomo de hidrogênio é retirado do grupo metileno de um ácido graxo insaturado, levando a formação de um radical livre. O oxigênio adiciona-se ao radical livre e forma um radical peróxido. Cada radical peróxido pode retirar um átomo de hidrogênio de uma molécula não oxidada formando hidroperóxidos. (McCLEMENTS; DECKER, 2010). Os hidroperóxidos de

lipídios, são bastante instáveis e podem se desfazer com rapidez, com rompimento da cadeia hidrocarbonada, dando origem a compostos voláteis de cadeia curta, como hidrocarbonetos, ácidos, álcoois, aldeídos e cetonas, que produzem sabores indesejáveis (SCHAICH et al., 2015).

Os sabores produzidos pela oxidação dos produtos lácteos são descritos como oxidado, semelhante a papelão, de grão de soja, verde, metálico, de gordura, de peixe, amargo, de fruta, de sabão, de tinta, rançoso, de grama, de manteiga, de sebo. “Sabor oxidado” é o termo geral recomendado para descrever todos esses sabores (SHIPE et al, 1978).

1.1.3.1.2. “Caking” e cristalização da lactose

O leite em pó armazenado em ambiente que permita absorção de umidade poderá apresentar aglomeração (“caking”), reduzindo a solubilidade do pó e provocando alterações de sabor, odor e redução da qualidade nutricional do produto.

“Caking” ocorre quando um pó de baixa umidade e livre escoamento se torna grumoso e posteriormente se aglomera. Os seguintes estágios no processo de formação de “caking” em leite em pó foram descritos por Troy e Sharp (1930): (a) absorção de umidade pela lactose; (b) aglomeração das partículas do pó e; (c) solidificação e cristalização da lactose. A cristalização da lactose, a qual se apresenta na fase amorfa no leite em pó fresco, é uma das reações mais frequentemente observadas quando este alimento é exposto à umidade relativamente alta e/ou temperaturas elevadas.

A temperatura de transição vítrea (T_g) da lactose em fase amorfa é 101 °C, sendo que em umidade de 0,05 g de água/g de material, a T_g pode ser alcançada em temperatura ambiente (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2005). Desta forma, ainda que a ocorrência de “caking” esteja intrinsecamente relacionada à absorção de água, a cristalização da lactose poderá ocorrer mesmo em alimentos com baixo percentual de umidade. Segundo Thomas et al. (2004), diversos autores correlacionaram a T_g da lactose e/ou de leite em pó integral e desnatado com a

atividade de água (JOUPIIIA; ROOS, 1994; LLOYD; CHEN; HARGREAVES, 1996; VUATAZ, 1999 apud THOMAS,2004) conforme representado na Figura 1.1, onde os diferentes tipos de leite em pó contendo lactose como principal açúcar, apresentam Tg similar.

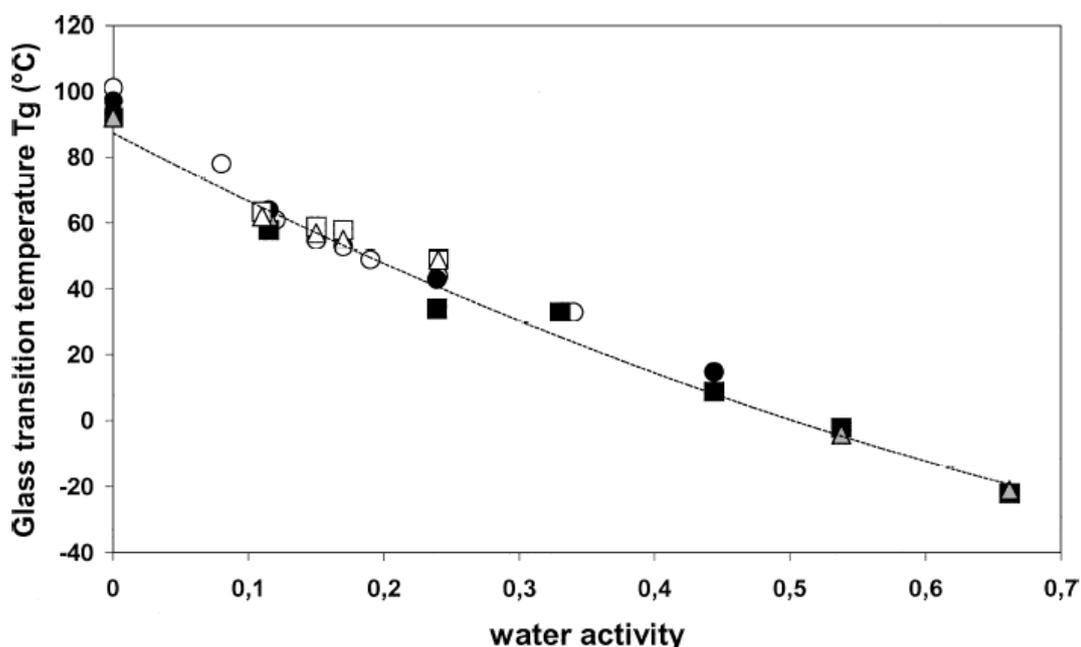


Figura 1.1. Temperatura de transição vítrea de leite em pó em função de atividade de água. ○ Tg da lactose (LLOYD; CHEN; HARGREAVES, 1996). ● Tg da lactose; Δ Tg do leite em pó desnatado; ■ Tg do leite em pó integral (JOUPIIIA; ROOS, 1994). Δ Tg do leite em pó desnatado; □ Tg do leite em pó integral (VUATAZ, 1999). Uma única curva descreve leite em pó contendo lactose (Fonte: THOMAS et al, 2004)

A lactose é o maior componente do leite em pó. Proteína, gordura e ar estão dispersos em uma fase contínua da lactose sólida em estado amorfo. Em estado vítreo, a lactose tem baixa pressão de vapor e é altamente higroscópica, absorvendo a umidade ao seu redor. Com a absorção de umidade, as moléculas deste açúcar adquirem mobilidade suficiente para se ordenarem em cristais de α -lactose monohidratada. Estes cristais são pequenos, usualmente com dimensões inferiores a 1 μ m. Fendas e rachaduras existem ao longo da borda dos cristais, por onde outros componentes são expelidos (FOX; McSWEENEY, 1998).

Neste contexto, a cristalização da lactose aumentará a atividade de água devido à liberação da água, antes ligada, resultando em uma aceleração da reação de escurecimento não-enzimático, também denominada reação de Maillard (ROOS, 1995, apud THOMSEN et al., 2005). Por outro lado, à medida que mais cristais de lactose são formados, uma quantidade menor deste açúcar estará disponível para a ocorrência dessa reação (MAZZOBRE; AGUILERA; BUERA, 2003). O aumento na taxa de escurecimento é esperado em estágio inicial da mudança de estado vítreo da lactose (THOMSEN et al, 2005).

1.1.3.1.3. Escurecimento não enzimático

O escurecimento não enzimático, também denominado reação de Maillard, será favorecido durante o armazenamento de leite em pó sob temperatura elevada. O prejuízo ocasionado aos aminoácidos e açúcares presentes no leite em razão da ocorrência desta reação irá contribuir para a perda de solubilidade e redução do valor nutricional deste alimento (VAN BOEKEL, 1998).

Uma série de reações induzidas termicamente onde a combinação do grupamento amino de um aminoácido e do grupamento carbonila de um açúcar redutor irá gerar compostos de coloração escura denominados melanoidinas. Na maior parte dos produtos lácteos o componente carboidrato será inicialmente o açúcar redutor lactose (ou seus produtos de hidrólise, de glucose e de galactose) e o grupo amino pode ser derivado de caseína ou proteínas de soro de leite, que contêm resíduos de aminoácidos, sobretudo, lisina (TURNER; SWAISGOOD; HANSEN, 1978; NEWTON, et. al., 2012).

Apesar da vasta pesquisa ligada ao escurecimento não-enzimático, a sequência da reação inicial (Figura 1.2) proposta por Hodge (1953) ainda permanece válida. A condensação entre os grupamentos amino e carbonila, também denominada reação de carbonilamina, irá gerar um produto reconhecido como composto de adição, que perde água com rapidez, e forma uma base Schiff seguida por ciclização para a correspondente glicosilamina N-substituída (MESQUITA; QUEIROZ, 2015). Neste contexto, a atividade de água pode aumentar

durante a armazenagem de leite em pó, visto que a água é um produto de estágios iniciais da reação de Maillard (VUATAZ, 2002).

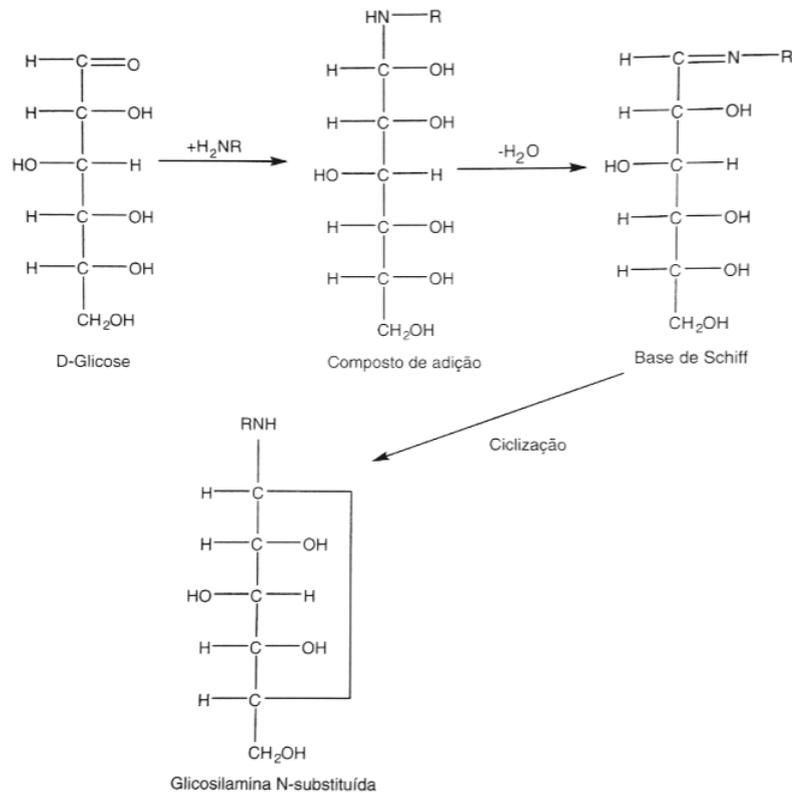


Figura 1.2. Reação de condensação descrita por Hodge (1953) (Fonte: MESQUITA; QUEIROZ, 2015)

A glicosilamina é altamente instável e passa por uma série de rearranjos (rearranjo de Amadori ou de Heyns, enolização, formação de 5-hidroximetilfurfural —HMF), que terminam na polimerização e no aparecimento de compostos estáveis e escuros denominados melanoidinas (SIKORSKI; POKORNY; DAMODARAN, 2010; MESQUITA; QUEIROZ, 2015).

A temperatura tem efeito significativo tanto na cristalização da lactose quanto na ocorrência da reação de Maillard. Essas duas reações sensíveis à temperatura podem interagir ainda mais com a oxidação lipídica, uma vez que o aumento de atividade de água a partir da cristalização da lactose ou durante os

passos iniciais da reação de Maillard irá acelerar a oxidação dos lipídios devido ao aumento na mobilidade molecular (THOMSEN et al, 2005).

1.1.3.1.4. Degradação proteica

No âmbito das alterações degenerativas provocadas pelo efeito da temperatura, além das supracitadas, é deveras importante ressaltar a ação do calor sobre as proteínas do leite em pó. Wright (1933 apud HALL; HEDRICK, 1971) demonstrou que a desestabilização das proteínas do leite pode ocorrer: (a) no leite fluido devido à aplicação de calor, resultando na coagulação das proteínas do leite, em particular, das caseínas; (b) ou em leites em pó, onde o calor provocará a desestabilização das proteínas associada à liberação de água ligada à caseína. A desestabilização das proteínas avançará durante armazenamento prolongado.

Além disso, sendo a lisina o principal aminoácido envolvido na reação de escurecimento não enzimático, o valor nutricional do leite se reduz à medida que a reação de Maillard avança, já que a lisina se torna indisponível para ser digerida (VAN BOEKEL, 1998; THOMAS et al., 2004).

1.1.4. Ômega 3

Assim como o leite, os óleos e gorduras também são necessários na alimentação humana, pois constituem uma importante fonte de energia, apesar de serem associados negativamente à saúde. O seu papel negativo geralmente é atribuído a sua alta densidade calórica de 9 kcal.g⁻¹. Entretanto, existem evidências crescentes de que alguns lipídios comestíveis podem reduzir o risco de diversas doenças. Esses lipídios incluem ácidos graxos ômega 3 e 6 (McCLEMENTS; DECKER, 2010).

Os ácidos graxos poli-insaturados, principalmente do grupo ômega 3 ou ácido alfa-linolênico, bem como seus metabólitos, o ácido eicosapentaenoico – EPA

e o docosahexaenoico – DHA, e os ômega 6 têm uma função muito importante na prevenção de doenças cardiovasculares devido às suas propriedades hipotensivas, diminuição do colesterol, entre outras (POLLONIO, 2000). O consumo de ômega 3 vem sendo ainda correlacionado à prevenção da aterosclerose, estimulação da liberação de insulina, à manutenção da integridade das células endoteliais, à participação no desenvolvimento normal da placenta e do crescimento fetal, ao desenvolvimento neural, à participação das funções de imunidade e à redução dos sintomas da depressão (HU et al., 2001; GRIMM et al., 2002; ANDRADE; CARMO, 2006; MARTIN et al., 2006; LIN et al., 2012; HOFFMIRE et al., 2013). Estudos recentes têm demonstrado ainda que o ômega 3 exerce efeitos positivos na memorização de adultos seniores saudáveis (KÜLZOW et al., 2016).

Devido à insaturação da cadeia, o ácido graxo ômega 3 é propenso à oxidação e, conseqüentemente, às alterações das características sensoriais promovidas, reduzindo a vida útil dos produtos. Sendo assim, durante muitos anos a indústria de alimentos removeu de seus produtos os ingredientes ricos nesses ácidos graxos, substituindo-os por gorduras saturadas (RIBEIRO et al., 2014). Porém, o crescente número de evidências científicas que reforçam a importância do consumo desses ácidos graxos para a saúde fez crescer o interesse da indústria em aplicá-los em seus produtos. Segundo Ribeiro et al. (2014), o volume global de consumo de ômega 3 adicionado em alimentos processados registrou um aumento de 50 vezes entre 2004 e 2009. As dificuldades encontradas na utilização de ômega 3 estão relacionadas à sensibilidade do composto ao oxigênio, umidade, luz e temperatura que promovem o desenvolvimento de sabor e odor desagradáveis no produto. Essas dificuldades podem ser minimizadas através do uso da tecnologia de microencapsulação.

1.1.4.1. Microencapsulação de ômega 3

A microencapsulação pode ser definida como um processo tecnológico no qual se promove a formação de uma barreira (parede) ao redor de uma substância de interesse (ativo) para controlar a forma como essa substância interage com o meio (alimento) no qual ela será inserida (ALVIM et al., 2013). A microencapsulação

evita interações indesejáveis do material encapsulado com os demais componentes do alimento e também reações químicas que podem levar à degradação do ingrediente bioativo, minimizando as conseqüentes alteração de sabor e odor do alimento ou efeitos negativos à saúde (ARBOLEYA et al., 2010).

O processo de microencapsulação de ômega 3 pode ser realizado por diversos métodos sendo o *spray dryer* e a coacervação os dois processos mais comumente usados (KAUSHIK et al., 2015).

Na microencapsulação por *spray dryer*, o material do núcleo (ativo) é disperso em uma solução de polímero, formando uma emulsão ou dispersão que é bombeada e atomizada em uma câmara onde, em contato com ar aquecido, ocorre a secagem e formação das microcápsulas (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2005). O sucesso do sistema de microencapsulação é avaliado com base na eficiência de encapsulação e estabilidade à estocagem das microcápsulas de ômega 3, as quais dependem principalmente do tipo e composição do material de parede utilizado (KAUSHIK et al., 2015). O processo de *spray dryer* vem se destacando como um processo econômico, adaptável às linhas de processamento, além de produzir partículas de boa qualidade (SOUZA SOBRINHO; FARIAS, 2012), entretanto, ainda existem limitações quanto aos materiais de parede que podem ser aplicados no processamento por *spray dryer* devido à sensibilidade dos materiais às altas temperaturas e rápida evaporação que prevalecem no uso dessa tecnologia (DESAI; PARK, 2005).

O processo de microencapsulação por coacervação consiste na interação e separação de duas fases líquidas em uma solução coloidal durante a mistura de soluções de substâncias com cargas opostas. Uma fase é rica em polímeros e denominada “fase coacervada” ou “fase rica”. Na outra fase “pobre em polímeros”, permanece o solvente (STRAUSS; GIBSON, 2004). Dois fenômenos de coacervação são descritos na literatura: simples e complexo. A coacervação simples envolve um único polímero e ocorre pela remoção do solvente que envolve as moléculas do colóide, utilizando-se outro composto que compete com o polímero pela água, tal como sais ou alcóois. A coacervação complexa consiste basicamente na combinação de duas soluções hidrocolóides de cargas opostas que resultam na formação de microcápsulas devido às interações eletrostáticas entre os

componentes que ocorre durante a alteração do pH da fase aquosa. O passo final do processo de microencapsulação por coacervação complexa consiste na secagem do coacervado (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2005).

Outro processo de microencapsulação de ômega 3 descrito na literatura é a liofilização, onde a emulsão contendo tanto o ativo quanto o material de parede é congelada em temperatura entre -90 e -40 °C e seca por sublimação sob baixa pressão. A grande vantagem dessa tecnologia é que a mesma é aplicada a baixas temperaturas (KAUSHIK et al., 2015), entretanto, estudos sobre a microencapsulação de óleo de peixe utilizando a tecnologia demonstraram susceptibilidade das partículas geradas à oxidação uma vez que são formadas estruturas com grandes porosidades e reduzida vida de prateleira (ANWAR; KUNZ, 2011).

A tecnologia de secagem em leito fluidizado pode ser empregada para recobrimento de partículas de ômega 3 em pó. Skelbaek e Andersen (1994 apud KAUSHIK et al., 2015) patentearam um processo de dupla encapsulação de óleo de peixe. Primeiramente, o óleo de peixe foi emulsificado usando caseinato como agente emulsificante e essa emulsão foi seca por *spray dryer*. O pó obtido foi coberto com amido em leito fluidizado. O método tem sido usado apenas para prover uma cobertura adicional ao óleo de peixe já microencapsulado, mas nunca para microencapsulação direta de ácidos graxos poli-insaturados de ômega 3.

1.1.5. Mistura de alimentos em pó

A combinação dos ingredientes leite em pó e ômega 3 microencapsulado depende da operação unitária denominada mistura. A mistura de alimentos em pó é amplamente utilizada por uma variedade de indústrias e o objetivo principal do processo é a obtenção de uma distribuição uniforme. Diversos parâmetros influenciam a homogeneidade de misturas de pós, entre eles, o tamanho, o formato e a densidade das partículas, o tempo e o tipo de equipamento utilizado para a mistura dos ingredientes (SHENOY et al., 2015). A umidade, as características de superfície e do fluxo de cada componente, bem como a tendência dos materiais a

se aglomerarem, também são fatores que influenciam a homogeneidade da mistura de alimentos em pó. Geralmente, materiais que são similares em forma, tamanho e densidade possibilitam a formação de uma mistura mais uniforme do que materiais muito diferentes (FELLOWS, 2017b).

Em algumas misturas de alimentos em pó a uniformidade é alcançada após determinado período e, em seguida, inicia-se a separação dos componentes da mistura. Desta forma, a determinação do tempo de mistura se torna fundamental para garantir a melhor distribuição e uniformidade dos componentes (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2005, FELLOWS, 2017b). Uma mistura adequada também é necessária para assegurar que os produtos cumpram a legislação correspondente e contenham os ingredientes na quantidade especificada (ORDÓÑEZ, 2007).

Em uma mistura perfeita, o desvio padrão da concentração de um componente analisado a partir de amostras coletadas de diferentes pontos da mistura seria igual à zero, contudo, na prática, a mistura perfeita não pode ser obtida. Em misturas eficientes, o valor do desvio padrão se torna bastante baixo após um determinado período, quando a uniformidade é alcançada. Neste ponto, a continuação do processo de mistura pode levar à separação dos componentes, o que justifica a importância do conhecimento do tempo de processamento para obtenção de uma mistura homogênea (FELLOWS, 2017b). O Coeficiente de Variação também é empregado na avaliação da uniformidade de misturas, e os produtos obtidos são considerados de qualidade satisfatória quando esta medida de dispersão for menor do que 6% (BERTHIAUX; MARIKH; GATUMEL, 2008; MARIKH et al, 2008).

1.1.6. Embalagens para alimentos em pó

A embalagem é um veículo de comunicação e interação com o consumidor e apresenta papel fundamental por aumentar a segurança no consumo, prolongar a vida útil e reduzir perdas de alimentos, o que gera impactos econômico e ambiental. Para desempenhar seu papel, a embalagem deve ser especificada de

forma correta, considerando o produto, as etapas de processo e de distribuição. Em relação à conservação, a embalagem é responsável pela proteção contra, sujidades, micro-organismos, oxigênio, luz e troca de umidade, além de viabilizar o transporte adequado do ponto de venda até a residência do consumidor.

A absorção de umidade é um dos fatores mais importantes para o controle da vida de prateleira dos alimentos desidratados em pó, desta forma, estes alimentos requerem uma embalagem que tenha baixa permeabilidade ao vapor d'água ou irão absorver a umidade presente no ambiente e estarão susceptíveis às reações químicas e físicas indesejáveis. Se a atividade de água se eleva acima de um nível que permita o crescimento microbiano, o alimento irá se deteriorar. De forma semelhante, os alimentos que contém quantidades apreciáveis de lipídios ou de outros componentes sensíveis ao oxigênio sofrerão deterioração se a embalagem não constituir uma barreira adequada (FELLOWS, 2017c).

Para as microcápsulas de ômega 3, embora a própria cápsula possa ser considerada a embalagem do ativo (óleo de peixe rico em EPA e DHA), não se pode ignorar que ela será incorporada a um produto e este por sua vez será acondicionado em uma embalagem que será responsável por assegurar que as características globais desse alimento se encontrem aceitáveis sob o ponto de vista de qualidade até o momento do consumo. Sendo assim, é imprescindível que os produtos desenvolvidos sejam submetidos a estudos de estabilidade nas respectivas embalagens, de forma que se possam garantir as propriedades desejadas.

Embalagens para leite em pó (especialmente quando produzido a partir de leite integral) também devem oferecer proteção à luz, de outra forma, as reações oxidativas serão aceleradas (ROBERTSON, 2013a).

A determinação das propriedades de barreira a gases, vapor d'água e luz são baseadas em medições padronizadas. A barreira a gases e ao vapor d'água é quantificada em termos de taxa de permeabilidade a gases e taxa de permeabilidade ao vapor d'água respectivamente, ou seja, pela quantidade de gás e vapor d'água que passa através da superfície da embalagem por unidade de tempo, a determinada temperatura e umidade relativa. A barreira a luz é medida em termos de transmissão de luz ultravioleta ou visível e é expressa como

porcentagem de transmissão em uma faixa de comprimento de onda (SARANTOPOULOS et al., 2008).

1.1.6.1. Lata metálica

A lata é uma embalagem rígida sendo a folha de flandres o material mais comumente empregado na sua fabricação. A folha de flandres é um laminado de aço com baixo teor de carbono, revestido nas duas faces com estanho comercialmente puro (Figura 1.3). A folha de flandres combina em um único material a resistência mecânica e a capacidade de conformação do aço com a resistência à corrosão, soldabilidade e boa aparência do estanho (DANTAS, 1999).

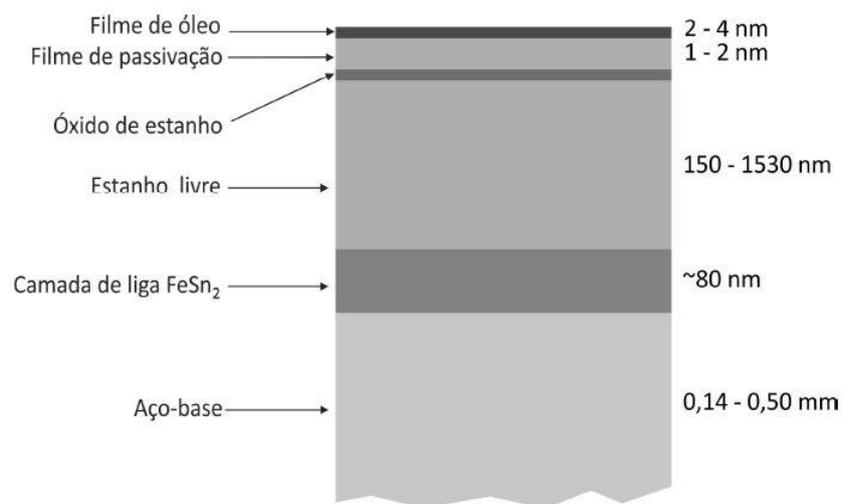


Figura 1.3. Seção transversal da folha de flandres (Fonte: CSN, s.d.).

No processo de fabricação, a folha de aço com revestimento eletrolítico de estanho é submetida ao aquecimento controlado conhecido por “fusão”, que permite a formação de uma camada intermediária de liga entre o aço e o estanho. É essa etapa que confere à folha de flandres o brilho característico que a destaca. Ao produto laminado (aço-base/ camada liga estanho-ferro/ estanho livre) é depositada uma fina camada de compostos de cromo denominado filme de

passivação, cujas principais funções são aumentar a resistência à corrosão atmosférica e favorecer a aderência de revestimentos orgânicos, eventualmente necessários. Sobre o filme de passivação é aplicada uma fina camada de óleo, conferindo fácil manuseio e prevenção contra a corrosão (SARON; GATTI, 1999).

As embalagens metálicas se caracterizam pela hermeticidade de fechamento e impermeabilidade garantida pelas propriedades de barreira intrínsecas ao material, que restringem a interação do produto com o meio externo, impedindo a passagem de luz e de oxigênio e evitando a penetração de microrganismos.

Para o acondicionamento de leite em pó, a lata metálica mais comumente utilizada é a denominada lata de três peças – tampa, corpo e fundo. As latas de 3 peças são caracterizadas pela costura lateral do corpo ao qual serão acoplados a tampa e o fundo através do processo de recravação.

A hermeticidade das embalagens metálicas também é função da qualidade da recravação e da costura lateral. A recravação é definida como a junção formada pela interligação e compressão mecânica das extremidades da tampa e do corpo de uma lata, pela qual a aba ou encurvamento da tampa ou fundo e a pestana ou flange do corpo são enganchadas firmemente entre si, resultando em uma estrutura resistente (ABNT, 2007; DANTAS et al., 1996). Duas operações estão presentes no processo de recravação e normalmente um vedante é previamente colocado na tampa ou no fundo. O corpo da lata é suportado por uma placa base enquanto que a tampa ou o fundo são mantidos por uma placa de recravação que atua como uma superfície de suporte para a pressão dos roletes de recravação (WEDDING, 2007).

A primeira operação é responsável pelo enganchamento da aba da tampa ou do fundo à pestana do corpo formando as cinco camadas de metal envolvidas, enquanto a segunda operação promove a compressão dessa estrutura, forçando o vedante a preencher o espaço vazio, caracterizando a hermeticidade do fechamento. A Figura 1.4 representa as duas operações de recravação da lata metálica.

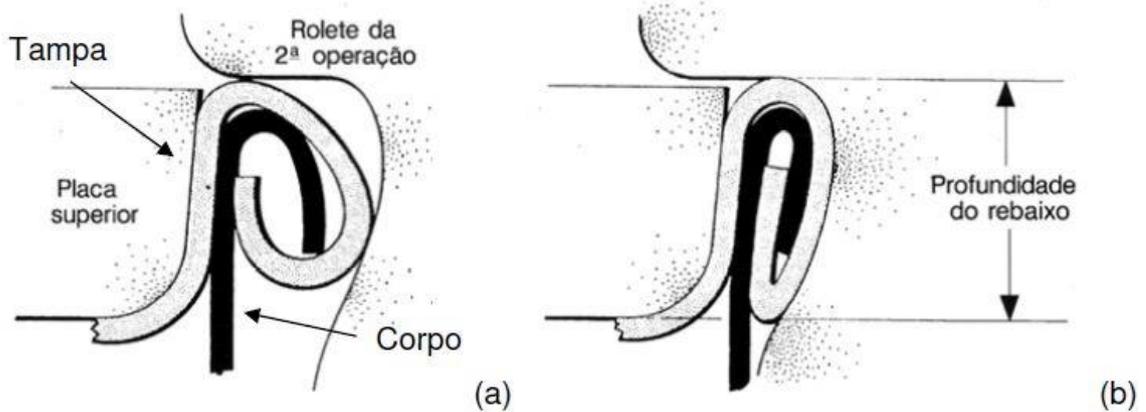


Figura 1.4. Primeira (a) e segunda (b) operação de recavação da lata metálica (Fonte: DANTAS, 2014)

A costura lateral ou solda pode ser do tipo convencional ou eletrossolda. A soldagem convencional, praticamente extinta por aspecto toxicológico, só pode ser aplicada a latas de folha de flandres e envolve a aplicação de uma solda metálica na parte externa dos cilindros, onde foi previamente realizada a agrafagem (as duas extremidades dos cilindros são enganchadas). A solda é fundida e transferida para o cilindro, penetrando na estrutura por ação capilar. Na soldagem elétrica a junção do corpo é obtida pela fusão do aço através da aplicação de pressão e corrente elétrica que geram calor suficiente para a união das extremidades do cilindro (DANTAS, 1999).

As latas utilizadas para acondicionamento de leite em pó usualmente possuem uma sobretampa plástica que pode ser retirada e novamente colocada. Para garantir a hermeticidade, um selo de alumínio pode ser fixado sobre um anel na lata. Esse selo é removido pelo consumidor antes da utilização e é denominado *peel off*.

1.1.6.2. Lata multifoliada

Outra categoria de embalagem também denominada lata é a multifoliada (ou lata composta), que possui corpo cilíndrico formado por três elementos básicos: o revestimento interno (liner), o corpo, e o revestimento externo (rótulo) (Figura 1.5).

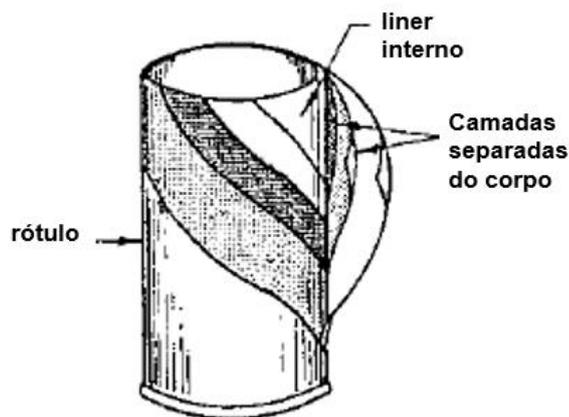


Figura 1.5. Estrutura lata multifoliada (Fonte: ROMAINE, 2005)

O revestimento interno (liner) é o responsável pela barreira, geralmente conferida por uma folha de alumínio. Dependendo do produto a ser embalado, o liner pode ser composto por uma ou duas camadas. Quando não há necessidade de resistência à permeabilidade de gases ou vapor d'água, o liner poderá ser composto por papel e polietileno. Outros materiais também empregados para revestimento interno são polipropileno (PP), politereftalato de etileno (PET), politereftalato de etileno metalizado (PETm), entre outros (ROMAINE, 2005).

O corpo pode ser formado por cartão tipo Kraft e é responsável pela forma e resistência da lata multifoliada. O papel Kraft é fabricado a partir de uma mistura de fibras de celulose curtas e longas provenientes de polpas de madeiras macias. Enquanto a celulose de fibra longa confere ao papel resistência mecânica, a celulose de fibra curta proporciona um papel de melhor formação, com excelente superfície para laminação (CAMILLO, 2011). O rótulo é a parte externa contendo as informações gráficas sobre o produto além de conferir barreira adicional à embalagem.

Um dos processos empregados na união dos substratos (papel, alumínio e filme plástico) é o enrolamento espiral de camadas de materiais ao redor de um mandril estacionário em um padrão helicoidal. As camadas são ligadas por adesivo, em produção contínua. Para manter as propriedades de barreira durante o enrolamento espiral, a borda de um enrolamento se sobrepõe ao enrolamento anterior. Os tamanhos individuais são determinados pelo corte, realizado conforme a especificação desejada para a lata (ROMAINE, 2005)

Assim como as latas metálicas, as latas multifoliadas podem ser fabricadas em 3 peças onde as extremidades do corpo são unidas à tampa e ao fundo através do processo de recravação. A tampa e o fundo podem ser compostos de materiais metálicos, geralmente folha de flandres. Na recravação de latas multifoliadas, as extremidades da aba ou encurvamento da tampa e fundo metálico penetram a estrutura do corpo de papel multifoliado sem atravessá-lo por completo. Desta forma, as extremidades da aba da tampa e fundo permanecem inseridas dentro da estrutura do corpo da lata conferindo hermeticidade ao material.

A lata multifoliada pode ser utilizada para diversos produtos incluindo o leite em pó, exceção feita aos produtos termoprocessados, para os quais a característica de resistência térmica é exigida.

As latas multifoliadas possuem resistência similar às latas metálicas, contudo apresentam a vantagem adicional de serem mais leves e não apresentarem corrosão, problema que pode ocorrer com as latas metálicas sob condições de alta umidade (ROBERTSON, 2013a), entretanto, a resistência pode ser significativamente reduzida pela influência da umidade do ambiente.

1.1.6.3. Embalagens plásticas flexíveis

Embalagens flexíveis compreendem qualquer tipo de material que não é rígido, contudo, o termo “filme flexível” é geralmente reservado aos polímeros plásticos que possuem menos de 0,25 mm de espessura (ROBERTSON, 2013b; FELLOWS, 2017c).

As embalagens plásticas flexíveis também são largamente empregadas e representam uma alternativa de baixo custo para as empresas, principalmente a embalagem laminada produzida com poliéster metalizado e polietileno. A vida de prateleira do produto acondicionado nessas embalagens depende da taxa de permeabilidade ao oxigênio (TPO_2) do material, da quantidade de leite e da área de exposição. A TPO_2 dos materiais à base de poliéster metalizado varia principalmente com a espessura e homogeneidade da camada de metalização. As embalagens flexíveis normalmente utilizadas para leite em pó são termosseláveis, sendo que a integridade de fechamento afeta diretamente as propriedades de barreira (ALVES, 2008).

A permeabilidade ao vapor d'água, também deve ser levada em consideração na escolha do material de embalagem, principalmente quando a mesma for utilizada na contenção de um alimento altamente higroscópico.

Um componente muito importante do grupo dos poliésteres é o polietileno tereftalato (PET), obtido por polimerização com dimetil tereftalato ou ácido tereftálico. O PET é um filme transparente, muito resistente, com brilho e propriedades muito boas contra gases. No Brasil, o PET metalizado laminado com polietileno (PE) vem sendo utilizado para compor filmes flexíveis para embalagens de leite em pó (ALVES, 2008).

O polietileno (PE) é um polímero do etileno e possui propriedades notórias quanto à sua resistência, baixo custo, disponibilidade, facilidade de termossoldagem e excelente barreira à água, porém, não representa boa barreira a gases e às gorduras (FELLOWS, 2017c).

A metalização consiste em um fino revestimento de alumínio para melhorar as propriedades de barreira a gases, umidade, odores e luz. O processo é realizado pela vaporização a vácuo de partículas de alumínio na superfície do filme. O filme metalizado é mais barato e mais flexível do que os laminados com folha de alumínio com propriedades de barreira semelhantes, sendo, dessa forma, adequados para uso em equipamentos de enchimento de alta velocidade ou formadores-ensasadores-seladores (ROBERTSON, 2013b).

A laminação de dois ou mais filmes melhora a aparência, as propriedades de barreira e/ou a resistência mecânica de uma embalagem. O método de

laminação mais versátil é a laminação adesiva. Dentre as várias possibilidades de sistemas adesivos disponíveis comercialmente, os adesivos poliuretânicos são muito bem conhecidos por suas propriedades mecânicas e de adesão superiores, além de boa flexibilidade e boa resistência as intempéries (MALUCELLI et al., 2005 apud CAMPANELLA et. al., 2015). Após aplicação do adesivo, os dois filmes são unidos por pressão pela passagem entre rolos. O sucesso do processo de laminação depende da similaridade de características de tensão entre os filmes, da distribuição de adesivo e das condições de secagem, que devem ser controladas com precisão para permitir que o laminado se desenrole suavemente sem formar ondulações ou separação das camadas (ROBERTSON, 2013b; FELLOWS, 2017c).

Filmes de polipropileno biorientado (BOPP) compreendem um dos primeiros polímeros utilizados no processo de produção de filmes por estiramento biaxial. Após extrusão do polipropileno (PP) e formação de um filme, ocorre o estiramento longitudinal e transversal, onde as cadeias de PP são orientadas nas duas direções. Em virtude da biorientação, a película formada apresenta propriedades de barreira, rigidez e resistência mecânica bastante superiores em relação ao filme de gramatura equivalente de PP não orientado. O BOPP, com suas cadeias orientadas em função dos estiramentos mecânicos sofridos, guarda um “efeito memória” que conduz à uma retração severa quando o filme é aquecido até temperatura necessária à selagem. A termosoldabilidade de filmes de BOPP é possível com o processo de coextrusão do polipropileno com um polímero de selagem. Neste processo, cada uma das faces da camada estrutural de PP recebe uma fina camada de polímero durante o processo de fabricação (ROBERTSON, 2013b; GARCIA; SARANTOULOPOULOS; COLTRO, 2017).

As principais vantagens das embalagens laminadas flexíveis em relação à lata metálica são, além do custo mais baixo, o menor peso do material empregado. As desvantagens são que os laminados não possuem a força mecânica e durabilidade dos recipientes rígidos e pode ser difícil obter uma soldagem por calor satisfatória devido à contaminação da área de selagem pelo pó durante o envase em alta velocidade (ROBERTSON, 2013b).

1.1.7. Vida útil de alimentos embalados

A vida útil ou vida de prateleira de um alimento é o tempo em que ele pode ser conservado em determinadas condições de temperatura, umidade relativa, luz, etc., sofrendo pequenas, mas bem estabelecidas alterações que são, até certo ponto, consideradas aceitáveis pelo fabricante, pelo consumidor e pela legislação alimentar vigente (VITALI; QUAST; GERMER, 2010).

Fatores intrínsecos ao produto (atividade de água, presença de enzimas, concentração de compostos reativos), bem como os fatores extrínsecos (temperatura e umidade relativa do ambiente de estocagem, exposição à luz e a gases) irão controlar a estabilidade e a vida útil de um alimento (PADULA; ITO; GARCIA, 2010).

As embalagens para alimentos têm um efeito significativo sobre muitos destes fatores extrínsecos e conseqüentemente influenciam a velocidade das reações de deterioração. A vida útil de produtos alimentícios está relacionada à sua composição, formulação, processo de fabricação, parâmetros de processamento, forma de acondicionamento, sistema de embalagem e condições do ambiente de estocagem e armazenamento (ROBERTSON, 2013c; LEE et al., 2008).

Neste âmbito, embora as embalagens não melhorem a qualidade de um alimento, quando adequadamente especificadas, podem retardar a deterioração do produto, permitindo que o alimento chegue ao consumidor em condições aceitáveis, dentro de um período de tempo definido (PADULA; ITO; GARCIA, 2010).

Para se definir um sistema de embalagem que confira proteção adequada ao conteúdo, é necessário o conhecimento das características do alimento a ser embalado, tais como os mecanismos de deterioração previstos. Além disso, as condições do ambiente de estocagem e o efeito dos demais fatores externos sobre o produto, como a umidade, luz e gases devem ser presumidos (PADULA; SARANTÓPOULOS; OLIVEIRA, 2006).

Informações sobre a vida útil de novos produtos alimentícios são requeridas durante o desenvolvimento e para o lançamento no mercado. No entanto, muitos produtos têm vida útil prolongada, o que dificulta a determinação experimental em

tempos compatíveis com as programações comerciais das empresas. Para essas situações, a aplicação de Testes Acelerados de Vida de Prateleira (TAVP) se apresenta como uma alternativa interessante.

O TAVP consiste no armazenamento do produto de interesse sob condições ambientais definidas e controladas de forma a acelerar as taxas de transformação. As taxas aceleradas de transformação determinadas são, então, relacionadas àquelas obtidas sob condições normais de armazenamento (LABUZA; SCHIMIDL, 1985). Dessa forma, em um tempo reduzido de estudo, a vida útil do produto de interesse é estimada. O TAVP permite, também, o desenvolvimento de modelos matemáticos para a previsão de vida de prateleira em diferentes condições de armazenamento (VITALI; TEIXEIRA NETO; GERMER, 2010).

1.2. REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. L.; CORÓ, F. A. G.; PEDRÃO, M. R. Componentes ativos de origem animal. **B. CEPPA**, v. 23, n. 2, p. 413-434, 2005.

ALVES, R. M. V.; JAIME, S. B. L.; ITO, D.; MOREIRA, C. Q. Influência das propriedades de barreira de embalagens flexíveis na estabilidade de leite em pó integral. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n.1, p. 46-53, 2008.

ALVES, A. T. S.; SPADOTI, L. M.; GAMA, M. A. S. Capítulo 6: Funcionalidade e Prevenção. In: _____. **Brasil Dairy Trends: Tendências do Mercado de Produtos Lácteos**. 1 ed. – Campinas: ITAL, 2017. p. 143-169.

ALVIM, I. D.; SOUZA, F. S.; KOURY, I. P.; JURT, T.; DANTAS, F. B. H. Use of the spray chilling method to deliver hydrophobic components: physical characterization of microparticles. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, p. 34-39, 2013.

ANDRADE, P. M. M.; CARMO, M. G. T. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. **Journal of Metabolism and Nutricion**, v. 8, n. 3, p. 135-143. 2006.

ANWAR, S. H.; KUNZ, B. The influence of drying methods on the stabilization of fish oil microcapsules: comparison of spray granulation, spray drying, and freeze drying. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 2, p. 367-378, 2011.

ARBOLEYA, J.-C.; LASA, D.; OLABARRIETA, A. I.; MARAÑÓN, I. M. de. New trends for food product design. In: SMITH, J.; CHARTER, E. **Functional food product development**. UK: Wiley-Blackwell, 2010. p. 229-241.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10531**: embalagens metálicas: terminologia. Rio de Janeiro, 2007. 15 p.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; ORTEGA-RIVAS, E.; JULIANO, P.; YAN, H. Encapsulation processes. In: _____. **Food powders**: physical properties, processing, and functionality. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005. p. 199-218.

BERTHIAUX, H.; MARIKH, K.; GATUMEL, C. Continuous mixing of powder mixtures with pharmaceutical process constraints. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, n. 47, n. 12, p. 2315-2322, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 03 maio 1999a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 03 nov.1999b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 10 dez. 1999c.

CAMILO, A. N. **Embalagens**: design, materiais, processos, máquinas e sustentabilidade. São Paulo: Instituto de Embalagens, 2011.

CAMPANELLA, G.; GHAANI, M.; QUETTI, G.; FARRIS, S. On the origin of primary aromatic amines in food packaging materials. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, p. 137-143, 2015.

CHANDAN, R. C.; KILARA, A.; SHAH, N. P. (Ed.). **Dairy processing and quality assurance**. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, 2009. 575 p.

COMPANHIA SIDERÚRGICA NACIONAL. **Folhas metálicas**. São Paulo: CSN, [s.d.]. 36 p. Catálogo.

COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. **Alimentos funcionais**: componentes bioativos e efeitos fisiológicos. Rio de Janeiro, RJ: Editora Rubio, 2010. cap. 2, p. 9-32.

DANTAS, F. B. H. **Sulfuração negra em carne enlatada: efeito dos parâmetros de processamento e da embalagem**. 185f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014

DANTAS, S. T.; ANJOS, V. D. A.; SEGANTINI, E.; GATTI, J. A. B. Ensaio para avaliação da qualidade de latas. In: **Avaliação da qualidade de embalagens metálicas: aço e alumínio**. Campinas: CETEA/ITAL, 1996. cap. 4, p. 205-317.

DANTAS, S. T. Tipos de embalagens metálicas para alimentos e bebidas. In: DANTAS, S. T.; GATTI, J. A. B.; SARON, E. S. **Embalagens metálicas e sua interação com alimentos e bebidas**. Campinas: CETEA/ITAL, 1999. cap. 2, p. 35-57.

DESAI, K. G. H; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005.

FELLOWS, P. J. Dehydration. In: _____. **Food processing technology: principles and practice**. 4th ed. Duxford, UK: Woodhead Publishing, 2017a. p. 661-716.

FELLOWS, P. J. Mixing, forming and coating. In: _____. **Food processing technology: principles and practice**. 4th ed. Duxford, UK: Woodhead Publishing, 2017b. p. 329-386.

FELLOWS, P. J. Packaging. In: _____. **Food processing technology: principles and practice**. 4th. ed. Duxford, UK: Woodhead Publishing, 2017c. p. 949-1044.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London:Blackie Academic & Professional: Thomson Science, 1998. 461 p.

GARCIA, E. E. C.; SARANTOPOULOS, C. I. G. L.; COLTRO, L. Materiais plásticos para embalagens flexíveis. In: SARANTOPOULOS, C. I. G. L.; TEIXEIRA, F. G. (Ed.). **Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades**. 2. ed. Campinas: ITAL/CETEA, 2017. cap. 1, p. 15-62.

GRIMM, H. et al. Regulatory potential of n3 fatty acids in immunological and inflammatory processes. **British Journal of Nutrition**, v. 87. n. 1, p 59-67, 2002.

HALL, C. W.; HEDRICK, T. I. **Drying of milk and milk products**. 2nd. ed., Westport: The AVI Publishing, 1971. p. 138-164.

HOFFMIRE, C. A.; BLOCK, R. C.; THEVENET-MORRISON, K., VAN WIJNGAARDEN, E. Associations between omega-3 poly-unsaturated fatty acids from fish consumption and severity of depressive symptoms: an analysis of the 2005-2008 National Health and Nutrition Examination Survey. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 86, p. 155-160, 2013.

HU, F. B.; MANSON, J. E.; WILLET, W. C. Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. **The Journal of American College of Nutrition**, v. 20, n. 1, p. 5-19, 2001.

JONES, P. J.; VARADY, K. A. Are functional foods redefining nutritional requirements? **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 33, n. 1, p. 118-123, 2008.

JOUPPILA, K.; ROOS, Y. H. Glass transitions and crystallization in milk powders. **J. Dairy Sci.**, n. 77, p. 2907-2915, 1994.

KAUSHIK, P.; DOWLINGA, K.; BARROWB C. J.; ADHIKARIC, B. Microencapsulation of omega-3 fatty acids: a review of microencapsulation and characterization methods. **Journal of Functional Foods**, v.19, p. 868-881, 2015.

KÜLZOW, N. et al. Impact of omega-3 fatty acid supplementation on memory functions in healthy older adults. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 51, n. 3, p. 713-725, 2016.

LABUZA, T.; SCHMIDL, M. K. Accelerated shelf-life testing of foods. **Food Technology**, v. 39, n. 9, p. 57-64, 1985.

LEE, D. S.; YAM, K. L.; PIERGIOVANNI, L. **Food packaging science and technology**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008. p. 425-444.

LIN, P. Y. et al. Are omega-3 fatty acids anti-depressants or just mood-improving agents? **Molecular Psychiatry**, v. 17, n.12, p. 1161-1163, 2012.

LLOYD, R. J.; CHEN, X. D.; HARGREAVES, J. B. Glass transition and caking of spray-dried lactose. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v. 31, n. 4, p. 305-311, 1996.

MARIKH, K; BERTHIAUX, H.; GATUMEL, C.; MIZONOV, V.; BARANTSEVA, E. Influence of stirrer type on mixture homogeneity in continuous powder mixing: a model case and a pharmaceutical case. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 86, n. 9, p. 1027-103, 2008.

MARTIN, C. A. et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 6, p. 761-770, 2006.

MATTILA-SHANDHOLM, T.; SAARELA, M. **Functional dairy products**. Cambridge: Woodhead Publ., 2003. 395 p.

MAZZOBRE, M. F.; AGUILERA, J. M.; BUERA, M. P. Microscopy and calorimetry as complementary techniques to analyze sugar crystallization from amorphous systems. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 6, p. 541-548, 2003.

McCLEMENTS, D. I.; DECKER, E. A. Lipídeos. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2010. cap. 4, p. 131-178.

MESQUITA, V. L. V.; QUEIROZ, C. Escurecimento enzimático. In: ESKIN, M.; SHAHIDI, F. **Bioquímica de alimentos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. cap. 10, p. 352-377.

MILKNET. **Consumo de lácteos tem estagnação no Brasil**. 14 dez. 2015.

Disponível em:

<<http://www.projetosparalaticinios.com.br/?pg=noticia&id=26810&buscador=CONSUMO-DE-LACTEOS-TEM-ESTAGNACAO-NO-BRASIL&local=1>>. Acesso em:

15 maio 2016.

MONICI, K. S. Q.; PACHECO, M. T. B. Benefícios à saúde conferidos pelo CLA. In: ANTUNES, A. E. C.; PACHECO, M. T. B. **Leite para adultos**: mitos e fatos frente à ciência. São Paulo: Livraria Varela, 2009. cap. 11, p. 257-270.

NEWTON, A. E.; FAIRBANKS, A. J.; GOLDING, M.; ANDREWES, P.; GERRARD, J. A. The role of the Maillard reaction in the formation of flavor compounds in dairy products – not only a deleterious reaction but also a rich source of flavour compounds. **Food & Function**, v. 3, n. 12, p. 1231-1241, 2012.

ORDÓÑEZ, J. A. Leites de consumo. In: _____. **Tecnologia de alimentos**: alimentos de origem animal. v. 2. Porto Alegre: Artmed Editora, 2005a. cap. 3, p. 49-63.

ORDÓÑEZ, J. A. Características gerais do leite e componentes fundamentais. In: _____. **Tecnologia de alimentos**: alimentos de origem animal. v. 2. Porto Alegre: Artmed Editora, 2005b. cap. 1, p. 13-37.

ORDÓÑEZ, J. Operações de transformação. In: _____. **Tecnologia de alimentos**: componentes dos alimentos e processos. v. 1. Porto Alegre: Artmed Editora, 2007. cap. 12, p. 249-290.

PADULA, M.; SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M. Alterações em alimentos. In: OLIVEIRA, L. M. (Ed.). **Requisitos de proteção de produtos em embalagens plásticas rígidas**. Campinas: ITAL/CETEA, 2006. cap. 1, p. 17-39.

PADULA, M.; ITO, D.; GARCIA, E. E. C. Influência da embalagem na vida-de-prateleira de alimentos. In: MOURA, S. C. S. R.; GERMER, S. P. M. **Reações de transformação e vida-de-prateleira de alimentos processados**. 4. ed., Campinas: ITAL, 2010. p. 58-63.

POLLONIO, M. A. R. Alimentos funcionais: as recentes tendências e os aspectos de segurança envolvidos no consumo. **Higiene Alimentar**, São Carlos, v. 14, n. 74, p. 26-31, jul. 2000.

RAINER, L.; HEISS, C. J. Conjugated linoleic acid: health implications and effects on body composition. **Journal of American Dietetics Association**, v. 104, n. 9, p. 963-998, 2004.

RIBEIRO, I. P.; ALVIM, I. D.; MIGUEL, A. M. R. de et al. Avaliação de estrutura mista de proteção para microencapsulação de ômega-3. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8., 2014. **Anais...** Campinas, SP: ITAL, 2014. 8 p.

ROBERTSON, G. L. Packaging of dairy products. In: _____. **Food packaging: principles and practice**. Boca Raton: CRC Press, 2013a. p. 519-544

ROBERTSON, G. L. Processing and converting of thermoplastic polymers. In: _____. **Food packaging: principles and practice**. Boca Raton: CRC Press, 2013b. p. 131-166.

ROBERTSON, G. L. Shelf life of foods. In: _____. **Food packaging: principles and practice**. Boca Raton: CRC Press, 2013c. p. 329-365.

SARANTOPOULOS, C. I. G. L.; COLTRO, L.; PADULA, M.; ALVES, R. M. V. Propriedades de barreira. In: OLIVEIRA, L. M.; QUEIROZ, G.C. (Org.) **Embalagens plásticas rígidas: principais polímeros e avaliação de qualidade**. Campinas, SP: CETEA/ITAL, 2008. p. 215-253.

SARON, E. S.; GATTI, J. A. B. Materiais metálicos utilizados na fabricação de embalagens para alimentos e bebidas. In: DANTAS, S. T.; GATTI, J. A. B.; SARON, E. S. **Embalagens metálicas e sua interação com alimentos e bebidas**. Campinas: CETEA/ITA, 1999. cap. 1, p. 1-21.

SCHAICH, K. M.; SHAHIDI, F.; ZHONG, Y.; ESKIN, M. Oxidação lipídica. In: ESKIN, M.; SHAHIDI, F. **Bioquímica de alimentos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. cap. 11, p. 382-434.

SHAHIDI, F. Functional and nutraceutical lipids. In: SMITH, J.; CHARTER, E. **Functional food product development**. UK: Wiley-Blackwell, 2010. p. 101-107.

SHENOY, P. et al. Effect of powder densities, particle size and shape on mixture quality of binary food powder mixtures. **Powder Technology**, v. 272, p. 165-272, 2015.

SHIPE, W. F., BASSETTE, R., DEANE, D. D., DUNKLEY, W. L., HAMMOND, E. G., HARPER, W. J., KLEYN, D. H., MORGAN, M. E., NELSON, J. H., SCANLAN, R. A. Off flavors of milk: nomenclature, standards, and bibliography. **Journal of Dairy Science**, v. 61, p. 855-869, 1978.

SIKORSKI, Z. E.; POKORNY, I.; DAMODARAN, S. Interações físicas e químicas dos componentes dos alimentos. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2010. cap. 14, p. 669-674.

SIQUEIRA, K. B.; CARNEIRO, A. V.; ALMEIDA, M. F. de; NALON, R. C. S. **O mercado lácteo brasileiro no contexto mundial**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2010. 12 p. (Circular técnica; 104).

SMITH, J.; CHARTER, E. **Functional food product development**. UK: Wiley-Blackwell, 2010. p. 3-19.

SOUZA SOBRINHO, E. C. de; FARIAS, M. C. A microencapsulação na indústria alimentícia. **Infarma**, v. 24, n. 1-3, p. 84-92, 2012.

SP: leite em pó cai no ranking das exportações, diz Viva Lácteos. **O Leite**, 06 jul.2017. Disponível em: <<http://www.oleite.com.br/Noticia/sp253a-leite-em-po-cai-no-ranking-das-exportacoes252c-diz-viva-lacteos-496366>>. Acesso em: 23 jul. 2017.

STRAUSS, G.; GIBSON, S. M. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 81-89, 2004.

STRINGHETA, P. C.; VILELA, M. A. R.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEN T. G. **Alimentos funcionais: conceitos, contextualização e regulamentação**. Juiz de Fora, MG: Templo, 2007. 246 p.

THOMAS, M. E. C.; SCHER, J.; DESOBRY-BANON, S.; DESOBRY, S. Milk powders ageing: effect on physical and functional properties. **Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 5, p. 297-322, 2004.

THOMSEN, M. K.; LAURIDSEN, L.; SKIBSTED, L. H.; RISBO, J. Temperature effect on lactose crystallization, maillard reactions, and lipid oxidation in whole milk powder. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 53, n. 18, p. 7082-7090, 2005.

TROY, H. C.; SHARP, P. F. α and β -lactose in some milk products. **Journal of Dairy Science**, v.13, n. 2, p. 140-157, 1930.

TURNER, L. G.; SWAISGOOD, H. E.; HANSEN, A. P. Interaction of lactose and proteins of skim milk during ultra-high temperature processing. **Journal of Dairy Science**, v. 61, n. 4, p. 384-392.

VAN BOEKEL, M. A. J. S. Effect of heating on Maillard reactions in milk. **Food Chemistry**, v. 62, n.4, p. 403-414, 1998.

VITALI, A. A.; QUAST, D. G.; GERMER, S. P. M. Vida-de-prateleira em alimentos. In: MOURA, S. C. S. R.; GERMER, S. P. M. **Reações de transformação e vida-de-prateleira de alimentos processados**. 4. ed. Campinas: ITAL, 2010. p. 47-57.

VITALI, A. A.; TEIXEIRA NETO, R. O.; GERMER, S. P. M. Testes acelerados de vida-de-prateleira em alimentos. In: MOURA, S. C. S. R.; GERMER, S. P. M.

Reações de transformação e vida-de-prateleira de alimentos processados.
4.ed. Campinas: ITAL, 2010. p. 80-87.

VUATAZ, G. The phase diagram of milk: a new tool for optimizing the drying process. *Lait*, v. 82, p. 485-500, 2002.

WEDDING, L. M. (Ed.) **Canned foods**: principles of thermal process control, acidification and container evaluation. 7th ed. Washington, DC: GAMA, 2007. 193 p.

2. CAPÍTULO 2

EXPERIMENTAL METHOD TO OBTAIN A UNIFORM FOOD POWDER MIXTURE OF OMEGA-3 MICROCAPSULES AND WHOLE MILK POWDER

S.S.C. Novaes¹, F.B.H. Dantas¹, I.D. Alvim², A.M.O. Rauen-Miguel³, F.Z. Vissotto², R.M.V. Alves¹

¹ Packaging Technology Center - CETEA, Institute of Food Technology - ITAL, CEP 13070-178, Campinas, SP, Brazil.

² Cereal and Chocolate Technology Center - CEREAL CHOCOTEC, Institute of Food Technology - ITAL, CEP 13070-178, Campinas, SP, Brazil

³ Food Science and Quality Center - CCQA, Institute of Food Technology - ITAL, CEP 13070-178, Campinas, SP, Brazil

O artigo foi submetido à revista LWT Food Science and Technology (ISSN: 0023-6438)

ABSTRACT

The aim of this study was to develop a methodology, based on image analysis, to obtain a uniform distribution of microcapsules containing omega-3 (EPA and DHA) in whole milk powder. Both ingredients, whole milk powder and omega-3 microcapsules, were characterized in terms of mean diameter, particle size distribution, water activity, moisture, apparent and bulk density, flow properties, morphology and microstructure. After preliminary tests, the mixing time to establish a standard deviation of zero was determined. Adopting the developed method, the mixing experiment was validated by chemical analysis (quantification of EPA and DHA content in the mixture). Although some characteristics between the powdered milk and the omega-3 microcapsules showed statistically significant differences ($p < 0.05$), the developed method was able to determine the processing time to obtain a homogeneous mixture. The validation tests carried out using chemical analysis indicated standard deviation equal to 0.011 $\mu\text{g}/100\text{g}$ and 0.014 $\mu\text{g}/100\text{g}$ and coefficient of variation of 3.38% and 3.71% after the defined processing time.

Keywords: mixing time; powder mixture; omega-3 microcapsules; milk powder

2.1. INTRODUCTION

The consumption of omega-3 source foods containing essential polyunsaturated fatty acids such as eicosapentaenoic acid (C20:5 n-3, EPA) and docosahexaenoic acid (C22:6 n-3, DHA) has been recognized in the medical community as being beneficial to consumer health. This nutrient is associated to the prevention of cardiovascular diseases, the participation of immunity functions, and it is also advantageous to the normal development of the placenta, fetus, nervous system, among other benign effects (Hu, Manson, & Willet, 2001; Grimm, Mayer, Mayser, & Eigenbrodt, 2002; Gould, Makrides, Colombo & Smithers, 2014; Nestel et al., 2015)

Although a variety of marine fish is the main natural source of EPA and DHA in the human diet (Shahidi, 2010), current dietary habits, especially in Western countries, have considerably reduced the daily intake of this food (Ferguson et al., 2014; Salem, & Eggersdorfer, 2015). In contrast, the considerable demand for food sources of omega-3 has boosted the development of added food products of these polyunsaturated fatty acids (Ganesan, Brothersen, & McMahon, 2014; Walker, Decker, McClements, 2015).

Fortified milk powder may be an option for omega-3 source food that is easily accessible to a large proportion of the population due to the high frequency of consumption of this food in various age groups. However, incorporating these fatty acids into some foods still poses as a challenge to the food industry. The high degree of establishment of omega-3 fatty acids makes them susceptible to lipid oxidation leading to the production of hydroperoxides that trigger "off flavours". In addition, lipid oxidation reduces the shelf life, nutritional value and functionality of the food (Arab-Tehrany et al., 2012).

Microencapsulation technology, which consists of forming a barrier (wall) around a substance of interest (active) (Alvim, Stein, Koury, Dantas, & Cruz, 2016), has been shown to be an efficient alternative to protect substances such as EPA and DHA fatty acids against oxidative processes, making it possible to use them in fortified foods (Kaushik, Dowlinga, Barrowb, & Adhikaric, 2015).

Food fortification requires critical care in complying with the laws governing these foods. Many countries regulate fortified food labelling in order to ensure the suitability of the product and clarify nutrition information to consumers. Although there are particularities inherent in each country, some of these laws require compliance with the information declared on the product label (Scrinis, & Parker, 2015). In products comprising different ingredients, as most fortified products, the main operation responsible for ensuring a regular distribution of nutrients is mixing. In this context, adequate mixing is necessary to ensure that the products comply with the corresponding legislation and contain the ingredients in the specified quantity (Ordóñez, 2007).

In the mixing powdered food process, manipulating two or more components should enable individual particles of the different materials present to

be evenly distributed (Vaizoglu, 1999). Various parameters influence the homogeneity of these multi-component foods, including the size, shape and density of the particles, the time, as well as the type of equipment used to mix the ingredients (Shenoy et al., 2015). The moisture, surface and flowability characteristics of each component, as well as the tendency of the materials to agglomerate are also factors that influence the regularity of the mixture of the particles. Generally, materials that are similar in shape, size and density allow the formation of a more uniform blend than very different materials (Fellows, 2017).

In some mixtures, the uniformity is reached after a certain period and then segregation of the components begins (Huang & Kuo, 2014). Thus, determining the mixing time is fundamental to guarantee the best distribution and homogeneity of the ingredients (Barbosa-Cánovas, Ortega-Rivas, Juliano, & Yan, 2005; Fellows, 2017).

According to Ehrhardt, Montagne, Berthiaux, Dalloz-Dubrujeaud, & Gatamel (2005), the statistical definition of standard deviation or variance commonly used in industrial practice can be used to estimate the mixture quality using random sampling. In a perfect mixture, the standard deviation of the concentration of a component analysed from samples collected from different points in the mixture would be zero, however, in practice, the perfect blend cannot be achieved.

If a two-component mixture is sampled at the start of mixing, most samples will consist entirely of one of the components. As mixing proceeds, the composition of each sample becomes more uniform and approaches the average composition of the mixture (Fellows, 2017). There are fundamental industrial interests in monitoring and estimating the quality of the blend. This is traditionally carried out by withdrawing samples from the mixing line, measuring their concentrations and then calculating appropriate mixing indices (Amin, Hall, Wang, & Ablett, 2005). In order to ensure the quality and performance of some manufactured products, the Coefficient of Variation is used to evaluate the uniformity of mixtures, and this index should be below 6% in mixtures with satisfactory quality (Berthiaux, Marikh, & Gatamel, 2008)

The aim of this study was to develop an experimental method to obtain a uniform binary food powder mixture. The method was based on image analysis to

identify and determine the concentration and standard deviation of the minority component: omega-3 microcapsules (M ω 3¹) in the mixture over mixing time. The omega-3 microcapsules were stained so that they could be distinguished in the mixture. A mathematical function was defined to determine the mixing time required to reach a standard deviation equal to zero.

2.2. MATERIAL AND METHODS

2.2.1. Material

Whole milk powder (Itambé, Minas Gerais, Brazil) and microcapsules containing omega-3 (M ω 3) whose concentrations of EPA and DHA in 100 g of particles ranged from 10.1 g (first repetition of validation test) to 11.9 g (second repetition of validation test) (Dry n-3 12 Food, BASF, Denmark) were used to obtain the mixture.

2.2.2. Characterization of the powders

2.2.2.1. Mean diameter and size distribution

The mean diameter and size distribution of the powders were obtained by laser diffraction using LV 950-V2 equipment (Horiba, Kyoto, Japan) according to the method described by Alvim et al. (2016). Samples were previously dispersed in absolute ethanol.

¹ Microcapsules containing fish oil rich in omega-3

After initial dispersion, the solutions were added to the wet analysis chamber of the equipment until they reached adequate transmittance levels to carry out the measurements. The mean particle diameter was expressed as the mean diameter of the volume and the polydispersity was given by the span index which was calculated according to Equation (1). Measurements were taken in triplicate with 6 readings of each preparation.

$$Span = \frac{D_{0.9} - D_{0.1}}{D_{0.5}} \quad (1)$$

Where D0.1, D0.5 and D0.9 correspond to the diameters relative to 10, 50 and 90% of the accumulated size distribution.

2.2.2.2. Morphology and microstructure

The surface morphology of the whole milk powder and the omega-3 microcapsules were visualised using scanning electron microscopy (SEM). The samples were fixed on metal surfaces and then sputter coated with gold (four coating cycles, Baltec Sputter Coater SDC 50, Balzers, Liechtenstein) and observed using scanning electron microscope DSM 940A FOCUS (Zeiss, Jena, Germany) capturing electronic images at different magnifications and an electron beam at 10 kV.

2.2.2.3. Poured bulk density and Tapped density

The poured bulk density was calculated by weighing 10 g of the sample (powdered milk or omega-3 microcapsules) deposited in a 25 mL graduated glass cylinder (diameter 2.5 cm). The cylinder was slightly tapped to remove the powder sticking to the walls and the volume was read directly from the cylinder. To calculate the tapped density, the cylinder containing the sample was tapped 30 times on a marble surface covered with an EVA (Ethyl Vinyl Acetate) sheet before the volume

was read. Both densities were obtained by the ratio of the mass to the volume occupied by the sample in the graduated cylinder (Goula & Adamopoulos, 2012). Samples were evaluated in six replicates.

2.2.2.4. Flowability properties

The flowability was evaluated using the Carr Index (compressibility index: C) and Hausner Ratio (HR) adopting the method proposed by Turchiuli et al. (2005). The Carr Index indicates compressibility or free flowing property while HR indicates the cohesiveness of the powders. The Carr Index (C) and the Hausner Ratio were calculated from the poured bulk density and tapped density values according to Equations 2 and 3.

$$\text{Carr Index (C)} = \frac{\text{Tapped density } (D_t) - \text{Poured bulk density } (D_p)}{\text{Tapped density } (D_t)} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Hausner Ratio (HR)} = \frac{\text{Tapped density } (D_t)}{\text{Poured bulk density } (D_p)} \quad (3)$$

2.2.2.5. Water Activity

The powders were deposited in the sample capsules and the water activity was determined in quadruplicate using the dew point principle in Aqua Lab 4TEV equipment (Decagon, Pullman, USA) at a temperature of 25.00 +/- 0.30 °C.

2.2.2.6. Moisture Content

To determine the percentage of moisture content, the samples were weighed and dried in a kiln (Fanem – 515/4-C, Garulhos, Brasil) at a temperature of 102 °C until obtaining a constant weight between consecutive weighings. The first

weighing was performed 4 hours after stabilizing the oven temperature. The samples were evaluated in quadruplicate (International Organization for Standardization/ International Dairy Federation, 1993).

2.2.3. Preparing the omega-3 microcapsule for the mixing test

After characterization, the M ω 3 were stained in an intense blue solution of permanent marker ink (composed of resin, glycols, dyes and additives) diluted in acetone (99.5% Synth, Brazil) at a ratio of 1.75:100. Afterwards, the added particle of the dye solution was allowed to stand in the exhaust hood for 30 minutes to dry the liquids in suspension. The result obtained is shown in Figure 2.1A (stained microcapsules). The color contrast between the stained M ω 3 and the whole milk powder allowed the distinction of the M ω 3 in the mixture (Figure 2.1B).

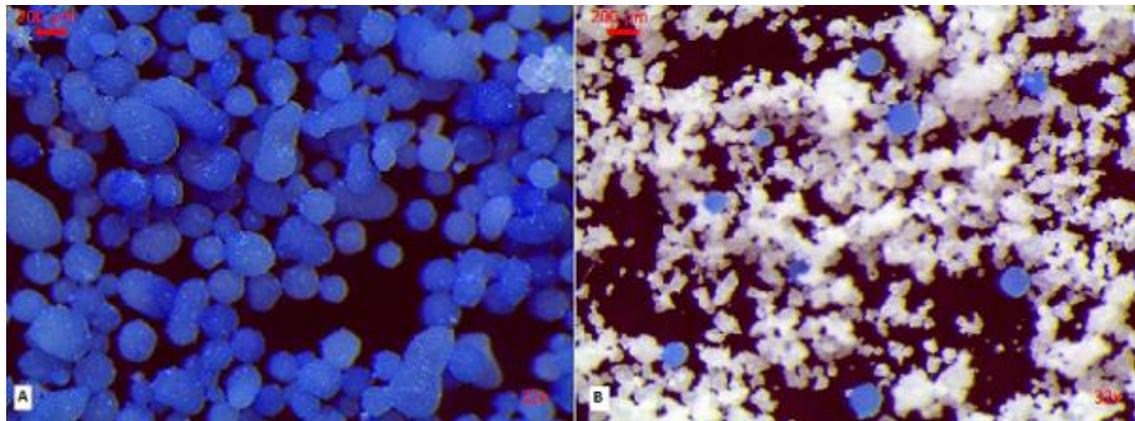


Figure 2.1. Stained omega-3 microcapsules (A) and mixing these particles into the whole milk powder (stereoscopy) bar = 200 μ m

2.2.4. Mixture Processing

The mixing procedure of the stained M ω 3 in the whole milk powder was carried out in two steps. The first step was called pre-mixing and the second step

was called final mixing. Table 2.1 shows the absolute composition of the mixture, as well as the percentage value of each component.

Table 2.1. Mixing composition

Component	Quantity (kg)	%
Whole milk powder	7.050	96.921
Omega-3 microcapsules	0.224	3.079
Total	7.274	100

2.2.4.1. Pre-mixing

A Kitchenaid ProLine Stand Mixer (Kitchenaid, USA) was used to pre-mix the powders and blender-mixer blades were used. The pre-mix consisted of dispersing the total amount of stained M ω 3 (0.224 kg) to 20% of the total whole milk powder (1,410 kg), according to the procedure shown in Figure 2.2.

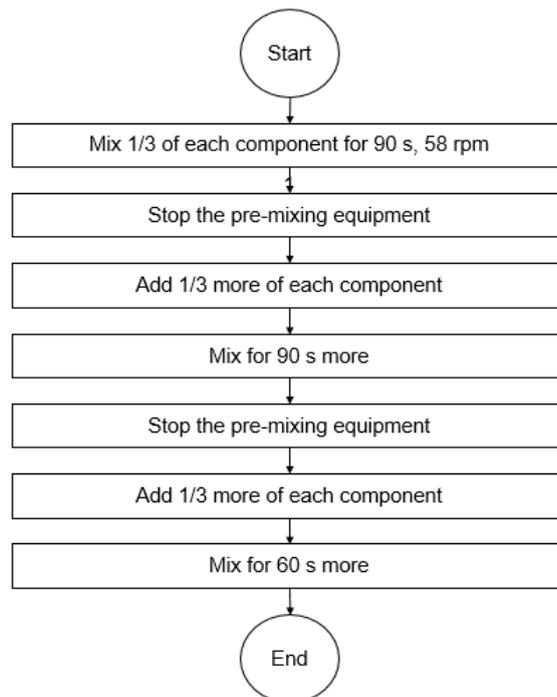


Figure 2.2. Pre-mixing flowchart

2.2.4.2. Final mixing and sample collection

The final mixture was made by adding the premix to the remaining volume of whole milk powder. For the final mix, a horizontal paddle blender (Consolid brand, model MM, maximum capacity of 20 litres) was used (Figure 2.3).



Figure 2.3. Intensive Horizontal Mixer Consolid. (a) external view, (b) internal view

The mixer was set to operate at 40 revolutions per minute. The equipment was stopped at 30, 60, 90, 120, 150 and 180 seconds of mixing to collect the samples.

Twenty samples from 10 different points were collected using a sample holder made by the authors (Figure 2.4).

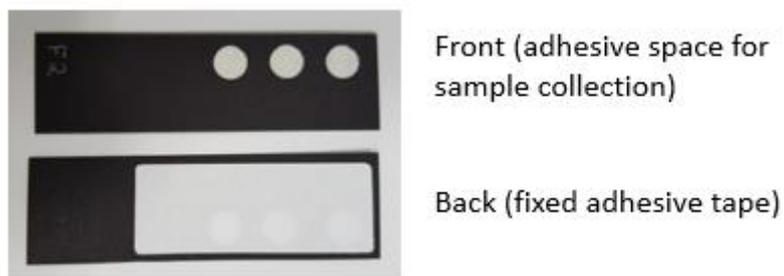


Figure 2.4. Accessory for sample collection made by the authors

The sampling points are shown in Figure 2.5. The sample holder used consisted of rectangular blades (100 mm x 30 mm) made of black paper (180 g/m²) with 3 circular orifices 9 mm in diameter. On the back of the sample holder, an adhesive label was affixed where the adhesive side of the label covered the circular orifices.

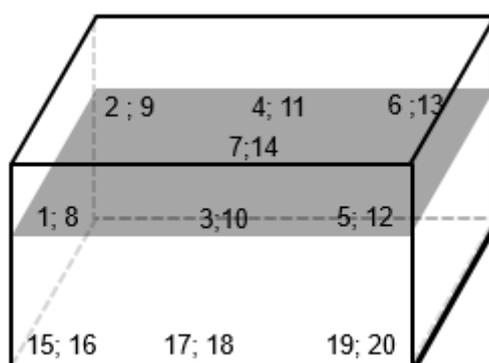


Figure 2.5. Diagram showing sample collection points

The samples were collected by sticking the adhesive side facing the orifices of the label on the surface of the powder mixture at the sampling points, so that as few disturbances possible were caused to the system. The samples were stuck to the adhesive within the limits of the 3 circular areas of the sample holders.

The sample holders were weighed individually on an analytical balance (BG2000, Gehaka, Brazil) immediately before (initial weight, without sample) and after (final weight) collecting the samples. The mass of the mixture collected in each sample holder was obtained by the difference between the final weight and the initial weight of the sample.

The various sample holders containing the samples from different points of the mixer were analyzed under a stereoscope microscope at 10x magnification and images of each orifice were obtained using the LEICA EC3 equipment coupled to the microscope. Figure 2.6A illustrates some of the images.

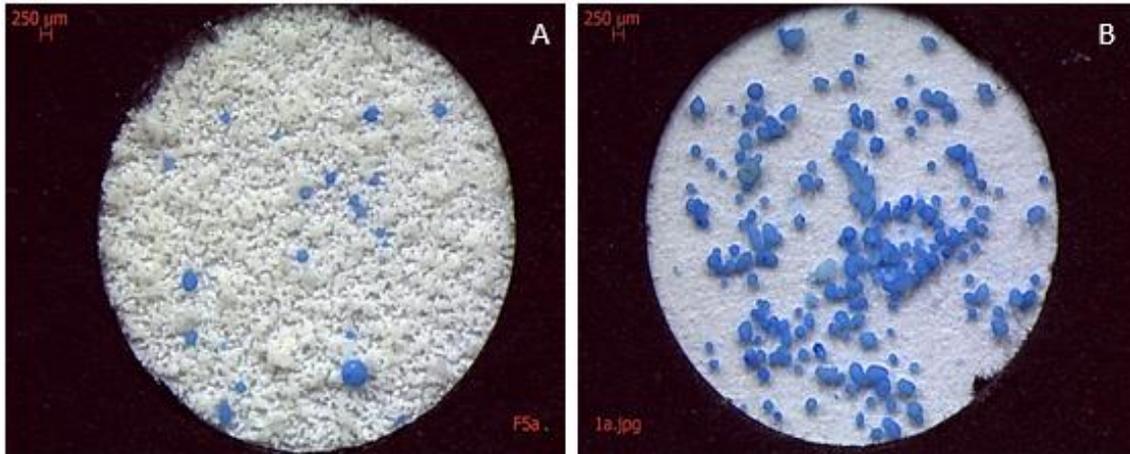


Figure 2.6. Images of the mixture samples (M ω 3 + milk) (A) and of M ω 3 (B) adhered to the circular orifices of the accessory obtained by the LEICA EC3 equipment coupled to the LEICA M165C stereomicroscope (LEICA, Germany) times 10x magnified

The stained M ω 3 of each accessory were counted and their concentration in the mixture was calculated by the ratio of the mass of stained M ω 3 adhered to the sample holder and the total mass of the powdered milk and stained M ω 3. This result was multiplied by 100 to obtain the concentration expressed in μg (of M ω 3) /100 μg (of mixture).

To determine the average mass of the stained M ω 3, samples of these microcapsules were adhered to the sample holder (Figure 2.6B) and the same procedures were used to determine the mass of the mixture samples (difference between weighing the samples before and after collecting them). Regarding the visual evaluation of the mixture, images of the samples containing only stained M ω 3 were evaluated and the stained particle count of each sample holder determined the average mass of these microcapsules by the ratio of the mass of the sample adhered to the sample holder and number of particles. In total, 10 samples containing only stained M ω 3 were analysed.

2.2.5. Definition of the mathematical function to determine the mixing time

Based on the results obtained from the concentration of stained Mw3 ($\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$) of each sample, the standard deviation of the mixture (σ_m , expressed in $\mu\text{g}/100 \text{g}$) of the 20 samples collected at each mixing time was determined.

The results were plotted on a graph of standard deviation (y) x mixing time (x). Using the XLSTAT statistical program, the mathematical function that adjusted the obtained results was determined. The criterion for choosing the mathematical function was to obtain a function whose R^2 was higher or equal to 0.95.

From the obtained function, the value of x (time, in seconds) where y (σ_m) was equal to zero could be determined.

2.2.6. Validation of mixing time

To validate the obtained result (mixing time for a standard deviation equal to zero), two replicates of tests were reproduced under the same experimental conditions (pre-mixing and final mixing) with whole milk powder and Mw3 without staining, taking 203 seconds to process the final blend. The objective was to determine the concentration of EPA and DHA at different points in the final mixture, as well as the standard deviation and coefficient of variation of these components.

The mixing equipment was stopped after the pre-set mixing time and 10 samples from 5 different points were collected (about 20 grams of sample from each point) and packed in glass containers with a lid. The collection points are shown in Figure 2.7.

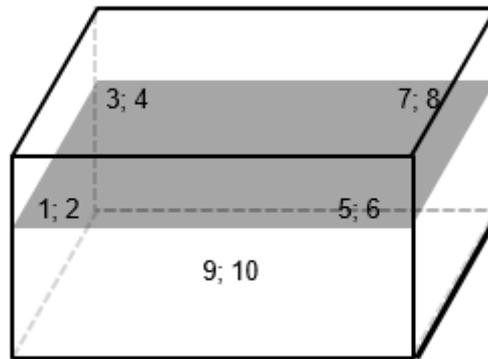


Figure 2.7. Illustrative scheme of the sample collection points of the validation tests of the mixing time.

To determine the omega-3 concentration in the powdered milk samples added of particles, they were subjected to lipid extraction using the method described by Bligh & Dyer (1959).

After evaporating the solvent, the extracts were subjected to esterification of the fatty acids (transforming them into methyl esters using the Hartman & Lago method (1973). The fatty acid composition (including docosahexaenoic acid (DHA, C22: 6) and eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5) were determined by gas chromatography using a flame ionization detector (CG-DIC) by comparing the retention times of the fatty acids of the samples with those obtained for the standards used (Fame mix37 Sigma-Aldrich) (Firestone, 2014). Quantification was carried out in duplicate, from normalization and transformation of the area to g/100 g (Mc Cance & Widdowson's, 2002).

2.2.7. Statistical analysis

The results were statistically analyzed by means comparisons and by the t - independent test using the XLSTAT statistical program, version 19.02.42756 (Addinsoft, USA).

2.3. RESULTS AND DISCUSSION

2.3.1. Characterization of the powders

The results of the characterization of the whole milk powder and the M ω 3 in the mean diameter and polydispersity index (span) are shown in Table 2.2 The M ω 3 presented a mean diameter ($D_{4,3}$) equal to 270.87 μm , which is larger than the mean diameter of the whole milk powder ($D_{4,3}$ equal to 244,79 μm), and also has a lower polydispersity (span index equal to 0.98) when compared to whole milk powder (span index equal to 1.87) ($p < 0.05$).

Table 2.2. Characterization of whole milk powder and omega-3 microcapsules according to the mean diameter and the expansion index

Material		Mean diameter (μm)				Polydispersity index (span)
		$D_{0,1}^{(1)}$	$D_{0,5}^{(2)}$	$D_{0,9}^{(3)}$	$D_{4,3}^{(4)}$	
Whole milk powder	$\bar{X}^{(5)}$	62.45	216.33	459.58	244.79 ^(a)	1.84
	SD ⁽⁶⁾	13.74	11.71	25.40	15.14	
Omega-3 microcapsules	$\bar{X}^{(5)}$	165.76	254.33	415.26	270.87 ^(b)	0.98
	SD ⁽⁶⁾	8.92	3.57	8.99	6.68	

^{(1); (2); (3); (4)} Mean diameters relative to 10%, 50%, 90% and 43% of the cumulative size distribution, respectively
^{(5); (6)} Mean (μm) of two replicates with six readings of each replication and Standard Deviation (μm), respectively
^{(a); (b)} Different lowercase letters in the same column correspond to statistically significant difference ($p < 0.05$)

The polydispersity characteristics of the powdered milk samples and Mw3 were also corroborated by the morphology presented in Figure 2.8, obtained by scanning electron microscopy (SEM) as more uniformity in size (i.e. lower span) of the Mw3 particles was observed (Figure 2.8 B1) than in the milk particles (Figure 2.8 A1), which were more varied in size (i.e. longer span). The surface details of whole milk powder (Figure 2.8 A2) and Mw3 (Figure 2.8 B2) and the mixture of these two components (Figure 2.8, C1 and C2) were also illustrated.

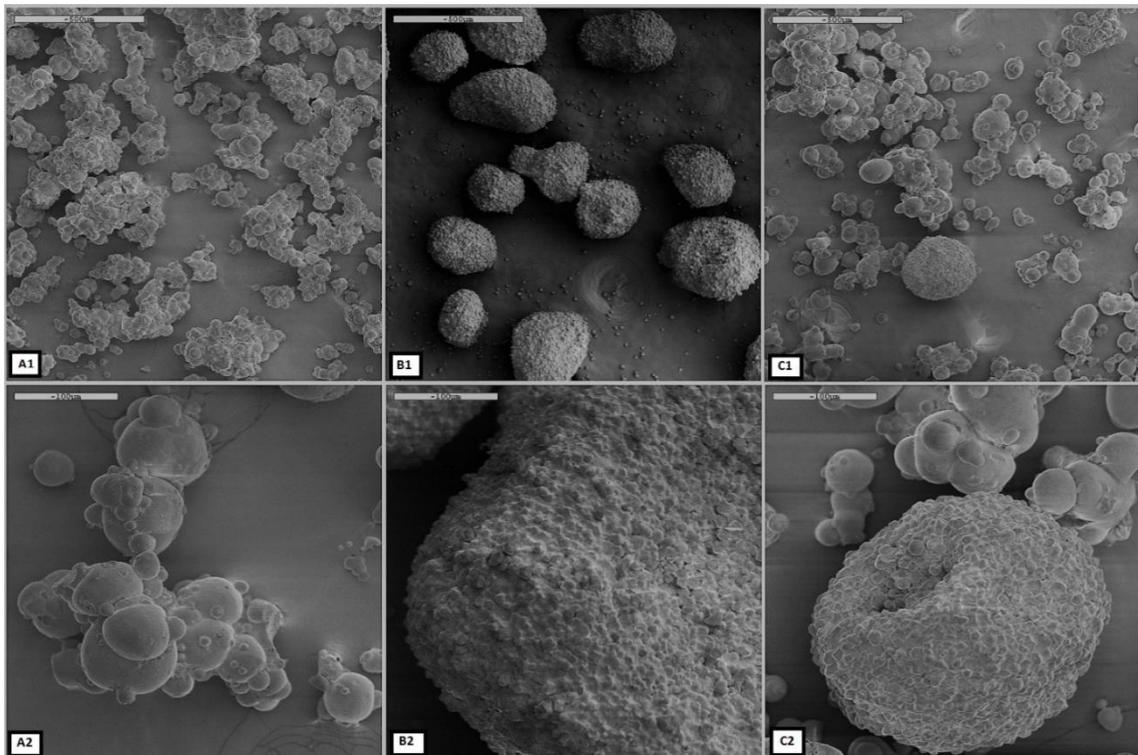


Figure 2.8. Surface morphology and microstructure (Scanning Electron Microscopy - SEM) of whole milk powder (A), Mw3 particles (B) and mixture between the two components (C), where A1, B1 and C1, bar = 500 µm; A2, B2 and C2, bar = 100 µm

Images A1 and A2 (Figure 2.8) for powdered milk showed the presence of smaller particle agglomerates, which is a typical aspect of this type of product (Kosasih, Bhandari, Prakash, Bansal, & Gaiani, 2016; Torres et al., 2017). Powdered milk is usually obtained by spray drying and the appearance of these smaller particles, constituents of the small agglomerates, was characteristic of materials dried by this process (Alvim et al., 2016; Tonon, Grosso, Hubinger, 2011).

In microencapsulation, the particle size and polydispersity characteristics may vary depending on the technology used for active retention/protection. The omega-3 microcapsules used in this study (Figure 2.8 B1 and B2) presented a significantly different appearance from the powdered milk particles (Figure 2.8 A1 and A2). Their appearance was similar to microcapsules obtained by spray granulation and fluidized bed film coating, as described by Barbosa-Cánovas et al. (2005).

In this technology, fish oil microcapsules were emulsified with the wall composite material and the emulsion obtained was spray dried. The granules were then coated with starch to ensure double encapsulation of the active. Multiple particle coatings may contribute to the increase in the mean diameter (Kaushik et al., 2015). Despite this similar appearance to the one cited by the authors, the omega-3 microcapsules supplier did not state the method of obtaining the particles for the study.

Physical parameters such as poured bulk density and tapped density affect the powder flowability (Carr, 1965) and the results obtained in the characterization of the materials used in this study are shown in Table 2.3. The poured bulk and tapped densities of the omega-3 microcapsules (D_p equal to 0.61 g/mL and D_t equal to 0.65 g/mL) were higher than the values obtained for whole milk powder (D_p equal to 0.50 g/mL and D_t equal to 0.61 g/mL) ($p < 0,05$). The ratio between the poured bulk density of the two powders was 1.22 and, according to a study by Shenoy et al. (2015), good quality mixtures can be obtained when the ratio between the poured bulk densities among powders of a binary mixture is lower or equal to 3.50.

Table 2.3. Characterization of whole milk powder and omega-3 microcapsules according to density and flow properties

Material		Density (g/mL)		Flow Properties	
		$D_p^{(1)}$	$D_t^{(2)}$	$C^{(3)}$ (%)	RH ⁽⁴⁾
Whole milk powder	$\bar{X}^{(5)}$	0.50 ^(a)	0.61 ^(a)	18.93	1.22
	SD ⁽⁶⁾	0.01	0.01		
Omega-3 microcapsules	$\bar{X}^{(5)}$	0.61 ^(b)	0.65 ^(b)	5.84	1.06
	SD ⁽⁶⁾	0.01	0.01		

^{(1); (2)} Poured Bulk Density and Tapped Density, respectively

^{(3); (4)} Carr Index (% of compressibility) and Hausner Ratio

^{(5); (6)} Mean (g/mL) and Standard Deviation (g/ mL), respectively

^{(a); (b)} Different lowercase letters in the same column correspond to statistically significant difference ($p < 0.05$)

The flow properties of the powders and particles are generally evaluated using the Carr index (percent compressibility) and Hausner ratio (HR). The boundary between free-flowing granules and difficult-to-flow powders is approximately 20-25% compressibility (Carr, 1965), therefore, both materials used in this study have free flow properties. However, the compressibility of milk powder (18.93%) was higher than that of Mw3 (5.84%) ($p < 0.05$). The greater the Hausner Ratio, the greater the cohesiveness and the less the ability to flow freely. The powdered milk had an HR of 1.22 and HR values higher than 1.34 generally indicate low flow characteristics between dry powders (Turchiuli et al. 2005). The Mw3 presented an HR value of 1.06, which was less cohesive than the whole milk powder ($p < 0.05$).

The whole milk powder had a moisture content of 3.57% and a water activity equal to 0.262 (Table 2.4). Both values were higher than those for the omega-3 microcapsule (moisture equal to 1.36% and A_w equal to 0.176) ($p < 0.05$). Although influential studies of these parameters in the powder mixing process are scarce in the literature, it is important to emphasize that these attributes directly interfere in the occurrence of caking and, consequently, in the size and shape of the particles. According to Shenoy et al. (2015), particles with different shapes can benefit the segregation of powdered food mix.

Table 2.4. Characterization of whole milk powder and omega-3 microcapsules according to moisture and water activity

Material		Moisture (%)	A_w to 25 +/- 0.01 °C
Whole milk powder	\bar{X} ⁽¹⁾	3.57 ^(a)	0.262 ^(a)
	DP ⁽²⁾	0.03	0.008
Omega-3 microcapsules	\bar{X} ⁽¹⁾	1.36 ^(b)	0.176 ^(b)
	DP ⁽²⁾	0.06	0.009

^{(1); (2)} Mean and Standard Deviation, respectively

^{(a); (b)} Different lowercase letters in the same column correspond to statistically significant difference ($p < 0.05$)

2.3.2. Determination of the mixing time

The mean mass of the stained M ω 3 was 9.82 μg and the concentrations of the stained M ω 3 in the mixture as well as the sample standard deviations at the different mixing times are shown in Table 2.5.

Table 2.5. Total concentration of omega-3 microcapsules in the mixture ($\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$), sample standard deviation ($\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$) and Coefficient of Variation (%) at different mixing times

Sample	Mixing time					
	30 s	60 s	90 s	120 s	150 s	180 s
1	4.775	4.509	3.487	3.988	3.029	3.816
2	5.796	5.425	4.278	5.017	2.098	3.486
3	3.496	4.770	4.124	5.260	4.032	3.434
4	3.510	4.879	3.338	4.090	2.733	2.425
5	3.946	3.378	4.043	4.449	3.780	2.869
6	3.164	3.780	2.106	3.854	2.567	2.775
7	3.100	6.017	3.699	3.446	3.887	3.943
8	5.379	6.834	5.274	3.931	4.536	3.276
9	3.542	3.568	4.570	4.625	4.550	3.756
10	3.385	3.340	4.760	3.510	4.344	2.954
11	3.170	3.646	2.709	3.487	3.523	2.883
12	3.852	3.276	2.687	4.121	2.880	2.824
13	3.093	2.902	2.400	2.808	3.395	2.349
14	3.498	2.822	3.400	4.914	4.195	4.062
15	4.487	4.112	4.360	3.669	2.915	3.901
16	3.835	4.286	5.122	3.370	4.018	4.043
17	2.967	3.402	4.043	3.077	4.047	3.890
18	4.004	4.352	4.648	3.866	4.221	3.296
19	2.705	4.276	3.532	3.373	4.715	3.320
20	2.783	4.612	3.432	3.209	3.800	4.566
σ_m ($\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$)	0.830	1.031	0.885	0.670	0.739	0.601
CoV (%)	22.286	24.493	23.286	17.165	20.173	17.711

The values of the sample standard deviation (y-axis) of each mixing time (x-axis) were plotted on the graph shown in Figure 2.9. The mathematical function that modelled the results for standard deviation (y) over time (x), where R^2 was 0.9728 was established. According to the mathematical function obtained, the mixing time for a standard deviation equal to zero was 203.48 seconds.

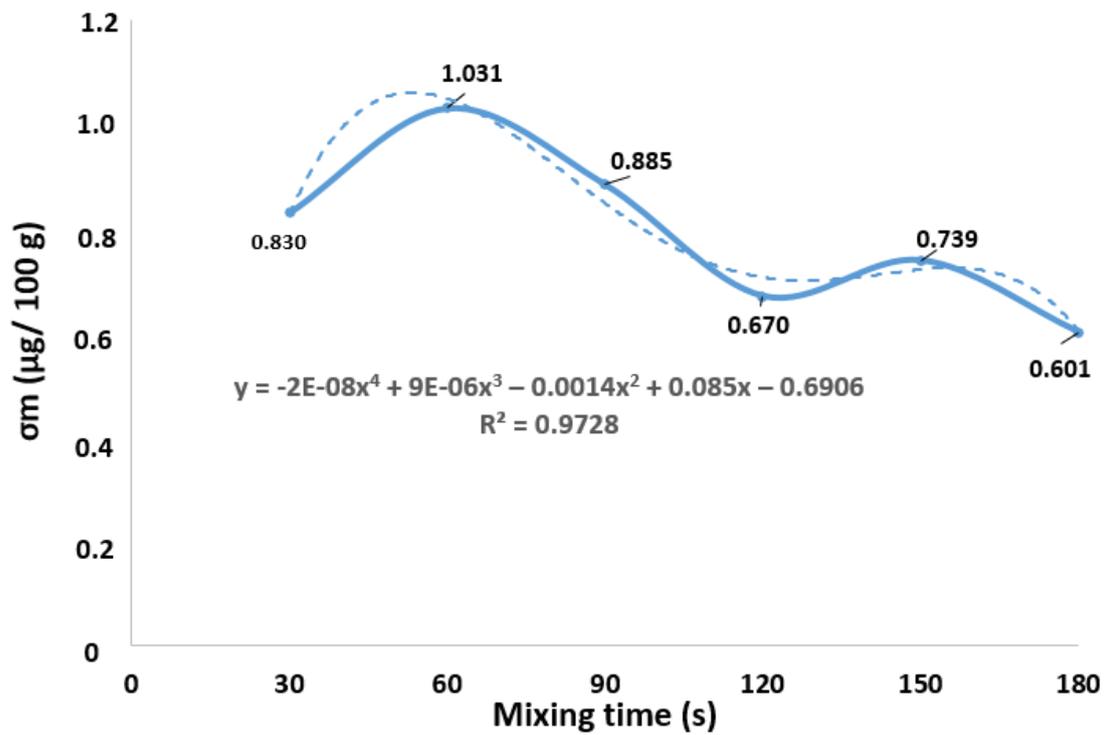


Figure 2.9. Graphical representation of the fourth order polynomial obtained for expression of the standard deviation of the mixture (σ_m) over the mixing time (s)

2.3.3. Validation of mixing time

The results of the EPA and DHA fatty acid concentration, mean, standard deviation and coefficient of variation of the samples collected at the different mixing points of both duplicates of tests are shown in Table 2.6.

Table 2.6. Concentrations of ecosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) fatty acids and their concentrations at different sampling points

Repetition	Sample	EPA ^{(1) (2)}	DHA ^{(1) (2)}	EPA + DHA ^{(1) (2)}	Mean EPA + DHA ⁽²⁾	SD EPA + DHA ⁽³⁾	CoV EPA + DHA ⁽⁴⁾
1	1	0.21	0.10	0.31	0.31	0.011	3.38
	2	0.21	0.10	0.31			
	3	0.20	0.10	0.30			
	4	0.21	0.10	0.31			
	5	0.20	0.10	0.30			
	6	0.21	0.10	0.31			
	7	0.21	0.10	0.32			
	8	0.21	0.11	0.32			
	9	0.22	0.11	0.33			
	10	0.22	0.11	0.33			
2	1	0.25	0.13	0.38	0.37	0.014	3.71
	2	0.25	0.13	0.38			
	3	0.26	0.14	0.40			
	4	0.24	0.12	0.37			
	5	0.25	0.12	0.36			
	6	0.24	0.12	0.36			
	7	0.24	0.12	0.36			
	8	0.24	0.12	0.36			
	9	0.24	0.12	0.36			
	10	0.24	0.12	0.36			

⁽¹⁾ Means of two replicates of each sample.

⁽²⁾ Concentration values expressed as $\mu\text{g}/100\ \mu\text{g}$.

⁽³⁾ Sample standard deviation of the concentration of EPA and DHA sum expressed as $\mu\text{g}/100\ \mu\text{g}$

⁽⁴⁾ Coefficient of Variation of the concentration of the EPA and DHA sum expressed as a percentage (%)

From the analysis of EPA and DHA concentration in collected samples from 5 different points in the mixture (Figure 2.7), the standard deviation obtained in the first repetition ($0.011\ \mu\text{g}/100\ \mu\text{g}$) and second repetition ($0.014\ \mu\text{g}/100\ \mu\text{g}$) was compatible with the mixing time equal to 203 seconds. The difference between the results of the two replications may have occurred because of the imprecision in the interruption of the mixing equipment.

The coefficients of variation obtained in the duplicates (3.38%, for the first and 3.71% for the second), are in agreement with those obtained in mixtures of satisfactory quality, according to Berthiaux et al. (2008).

2.4. CONCLUSION

Some characteristics of the materials used in this study showed significant differences between whole milk powder and omega-3 microcapsules (mean diameter, polydispersity, density, water activity, moisture, flow properties and morphology). Although such differences may hinder mixing, the proposed method was very reliable since it allowed obtaining a uniform mixture of satisfactory quality in 203 seconds of mixing. The methodology proposed in this study was able to define the mixing time in which the standard deviation was close to zero. It can be adapted to a variety of mixture of particles but, if the components or the process parameters vary, the protocol may be repeated and probably a new mathematical function should be obtained.

Acknowledgements

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) [grant #2015/12955-0]. The authors are grateful to BASF SA and Itambé Alimentos S/A for providing the materials, the staffs Sophia Moyses Lamonica Ribeiro and Karoline Urbano for their contributions in the execution of this work and Daisy Moitinho for assistance of statistical analysis.

2.5. REFERENCES

Alvim, I.D., Stein, M. A., Koury, I. P., Dantas, F. B. H., & Cruz, C. L. C. V. (2016). Comparison between the spray drying and spray chilling microparticles contain ascorbic acid in a baked product application. *LWT- Food Science and Technology*, 65, 689-694.

- Amin, M. H. G., Hall, L. D., Wang, W., & Ablett, S. (2004). In situ quantification of the index of mix in single screw extruder by magnetic resonance imaging. *Measurement Science and technology*, 15, 1871-1876.
- Arab-Tehrany, E., Jacquot, M., Gaiani, C., Imran, M., Desobry, S., & Linder, M. (2012) Beneficial effects and oxidative stability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Trends in Food Science & Technology*, 25, 24-33.
- Barbosa-Cánovas, G. V., Ortega-Rivas, E., Juliano, & P., Yan, H. (2005). *Food Powders – Physical Properties, Processing and Functionality*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, (Chapter 9).
- Berthiaux, H., Marikh, K., & Gatumel, C. (2008). Continuous mixing of powder mixtures with pharmaceutical process constraints. *Chemical Engineering and Processing*, 47, 2315–2322.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.
- Carr, R. L. (1965). Evaluating flow properties of solids. *Chemical Engineering*, 18, 63– 68.
- Ehrhardt, N., Montagne, M., Berthiaux, H., Dalloz-Dubrujeaud, B., & Gatumel, C. (2005). Assessing the homogeneity of powder mixtures by on-line electrical capacitance. *Chemical Engineering and Processing*, 44, 303-313.
- Fellows, P. J. (2017). *Food Processing Technology Principles and Practice*. (4th ed.). United Kingdom: Woodhead Publishing, (Chapter 5).
- Ferguson, J. F., Mulvey, C. K., Patel, P. N., Shah, R. Y., Doveikis, J., Zhang, W., Tabita-Martinez, J., Terembula, K., Eiden, M., Koulman, A., Griffin, J. L., Mehta, N. N., Shah, R., Propert, K. J., Song, W. L., & Reilly, M. P. (2014). Omega-3 PUFA supplementation and the response to evoked endotoxemia in healthy volunteers. *Molecular nutrition & food research*, 58, 601-613.
- Firestone, D. (2014) *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society* (6th ed.) Urbana: AOCS.

- Ganesan, B., Brothersen, C., & McMahon, D. J. (2014). Fortification of foods with omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54, 98-114.
- Goula, A. M., & Adamopoulos, K. G. (2014). Spray drying of tomatopulp: effect of feed concentration. *Drying Technology*, 22, 2309–2330, In: Ferrari, C. C., Germer, S. P. M., Alvim, I. D., Vissotto, F. Z., & Aguirre, J.M. (2012). Influence of carrier agents on the physicochemical properties of blackberry powder produced by spray drying. *International Journal of Food Science & Technology*, 47, 1237-1245.
- Gould, J., Makrides, M., Colombo, J., & Smithers, L. G. (2014). Randomized controlled trial of maternal omega-3 long-chain PUFA supplementation during pregnancy and early childhood development of attention, working memory, and inhibitory control. *The American journal of clinical nutrition*, 99, 851-859.
- Grimm, H., Mayer, K., Mayser P., & Eigenbrodt, E. (2002). Regulatory potential of n3 fatty acids in immunological and inflammatory processes. *British Journal of Nutrition*, 87, 59-67.
- Hartman, L., & Lago, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, 22, 494-495.
- Hu, F. B., Manson, J. E., & Willet, W. C. (2001). Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. *The Journal of American College of Nutrition*, 20, 5-19.
- Huang, K., Kuo, H. (2014). Developments in the tools for the investigation of mixing in particulate systems – A review. *Advanced Powder Technology*, 25, 163-173.
- International Organization for Standardization/ International Dairy Federation, ISO/IDF (1993). Dried milk and dried cream: determination of water content. *IDF bulletin N° 26 A*. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- Kaushik, P., Dowlinga, K., Barrowb, C. J., & Adhikaric, B. (2015) Microencapsulation of omega-3 fatty acids: a review of microencapsulation and characterization methods. *Journal of Functional Foods*, 19, 868-881.

- Kosasih, L., Bhandari, B., Prakash, S., Bansal, N., & Gaiani, C. (2016). Effect of whole milk concentrate carbonation on functional, physicochemical and structural properties of the resultant spray dried powder during storage. *Journal of Food Engineering*, 179, 68-77.
- Mc Cance & Widdowson's (2002) Food Standards Agency. The Composition of Foods, Sixth summary edition. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Nestel, P., Clifton, P., Colquhoun, D., Noakes, M., Mori, T. A., Sullivan, D., & Thomas, B. (2015). Indications for omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid in the prevention and treatment of cardiovascular disease. *Heart, Lung and Circulation*, 24, 769-779.
- Ordóñez, J. A. (2007). *Tecnología de alimentos: alimentos de origem animal*. Porto Alegre: Artmed Editora, (Chapter 12).
- Salem, N. Jr, & Eggersdorfer, M. (2015) Is the world supply of omega-3 fatty acids adequate for optimal human nutrition?. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 18, 147-154.
- Scrinis, G., & Parker, C. (2016). Front-of-Pack Food Labeling and the Politics of Nutritional Nudges. *Law & Policy*, 38, 234-249.
- Shahidi, F. (2010). Functional and nutraceutical lipids. In J. Smith, & E. Charter (Eds.), *Functional food product development* (pp. 101-109), United Kingdom: Blackwell Publishing Ltd.
- Shenoy, P., Viau, M., Tammel, K., Innings, F., Fitzpatrick, J., & Ahrné, L. (2015). Effect of powder densities, particle size and shape on mixture quality of binary food powder mixtures. *Powder Technology*, 272, 165-172.
- Tonon, R. V., Grosso, C. R., & Hubinger, M. D. (2011). Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying. *Food Research International*, v. 44, 282-289.
- Torres, J. K. F., Stephani, R., Tavares, D. M., De Carvalho, A. F., Costa, R. G. B., De Almeida, C. E. R., Almeida, M. R., De Oliveira, L. F. C., Schuck, P., & Perrone, Í. T. (2017) Technological aspects of lactose-hydrolyzed milk powder. *Food Research International*, doi: 10.1016/j.foodres.2017.08.043

- Turchiuli, C., Fuchs, M., Bohin, M., Cuvelier, M. E., Ordonnaud, C., Peyrat-Maillard, M. N., & Dumoulin, E. (2005). Oil encapsulation by spray drying and fluidized bed agglomeration. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6, 29-33.
- Vaizoglu, O. (1999). Assessment of the degree of Mix of Powder Mixtures. *Turkey Journal of Physics*, 23, 97-104.
- Walker, R., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2015). Development of food-grade nanoemulsions and emulsions for delivery of omega-3 fatty acids: opportunities and obstacles in the food industry. *Food & function*, 6, 41-54.

3. CAPÍTULO 3

STABILITY OF OMEGA-3 ENRICHED MILK POWDER IN DIFFERENT COMMERCIAL PACKAGES STORED UNDER ACCELERATED CONDITIONS OF TEMPERATURE AND RELATIVE HUMIDITY

Sylvia Salioni Camargo Novaes¹, Fiorella Balardin Hellmeister Dantas¹, Izabela Dutra Alvim², Ana Maria Rauen De Oliveira Miguel³, Silvia Tondella Dantas¹, Rosa Maria Vercelino Alves¹

¹ Packaging Technology Center - CETEA, Institute of Food Technology - ITAL, CEP 13070-178, Campinas, SP, Brazil.

² Center of Cereal and Chocolate Technology - CEREAL CHOCOTEC, Institute of Food Technology - ITAL, CEP 13070-178, Campinas, SP, Brazil

³ Food Science and Quality Center - CCQA, Institute of Food Technology - ITAL, CEP 13070-178, Campinas, SP, Brazil

O Artigo foi submetido à revista International Dairy Journal (ISSN: 0958-6946)

Keywords: omega-3 microcapsules; milk powder; PETmet/LDPE; BOPP/PP; metal can; composite can

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of two storage conditions (34 °C/ 83% of relative humidity and 43 °C/no relative humidity control) on the stability of whole milk powder added with omega-3 microcapsules packed in flexible metallized polyethylene terephthalate laminated to low density polyethylene (PETmet/LDPE), polypropylene bioriented laminated to polypropylene (BOPP/PP) packaging and in metal and composite cans. The results showed that the oxygen consumption in the package headspace is directly related to the storage condition. A lactose crystal formation occurred in the product in BOPP/PP stored at 34 °C/ 83% RH and in products in metal and composite cans stored at 43 °C. This phenomenon was correlated to other causes of food degradation. Microencapsulation was effective in maintaining the product "source of omega-3" over time, regardless of the type of packaging and storage condition. Metal and composite cans and PETmet/LDPE packaging kept the product in a satisfactory condition at 34 °C/ 83% RH.

3.1. INTRODUCTION

Regular intake of marine fish or omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) from these fish, eicosapentaenoic acid (C20: 5 n-3, EPA) and docosahexaenoic acid (C22: 6 n-3, DHA) is known to be beneficial to consumer health. EPA and DHA are associated to a reduced risk of cardiovascular diseases (Bonaccio et al., 2017; Endo & Arita, 2016; Lajous et al., 2013) and some types of cancer (Apte, Cavazos, Whelan & de Graffenried, 2013; Moore, Wang-Johanning, Chang & Johanning, 2001), good neurological functioning (Innis, 2008) and bone health (Högström; Nordström & Nordström, 2007).

EPA and DHA supplementation is recommended for pregnant women because it is related to a lower risk of preterm birth (Salvig & Lamont, 2011) and to a reduction in the occurrence of allergic diseases in childhood (Best et al., 2016). The consumption of these fatty acids during pregnancy is possibly attributed to the substantial increase in the attention of preschool children (Gould, Makrides, Colombo & Smithers, 2014; Ramakrishnan et al., 2016). The importance of these fatty acids to cognitive functions of the brain, when consumed by school-age children, has also been demonstrated by Sheppard and Cheatham (2013). Omega-3 consumption by healthy older adults has had positive effects on visual acuity (Stough et al., 2012) and memorization (Külzow et al., 2016).

The diet in western countries is characterized by an unbalanced consumption of essential fatty acids. In the last century, changes in socioeconomic conditions and consequently lifestyle has led to a decrease in the consumption of naturally occurring sources of n-3 PUFA (Simopoulos & Cleland, 2004). In order to supplement the nutrient deficiency, various food processing industries have reoriented their businesses to developing novel functional foods based on specific ingredients with positive health consequences (Niva, 2007).

Milk and dairy product consumption is often related to a healthy and balanced diet. Milk provides the energy and nutrients needed for proper growth and development, and is crucial for bone mass formation. Epidemiological studies confirm the nutritional importance of milk in the human diet and reinforce the possible correlation between dairy consumption and preventing various chronic conditions such as cardiovascular diseases, some cancers, obesity and diabetes (Pereira, 2014).

As milk is a staple food found in the diet of children, pregnant women and elderly people (Upadhyay et al., 2014), fortification of milk powder with EPA and DHA is an alternative to the supplementation of these important essential fatty acids. In this context, using technologies that can combine these ingredients in order to maintain their functional properties throughout the shelf life of the food is necessary.

EPA and DHA are highly susceptible to auto catalytic lipid oxidation that occurs through the action of free radicals in the presence of molecular oxygen (Arab-Tehrany et al., 2012). In foods high in unsaturated lipids, auto-oxidation will occur

even in mild conditions and is described in initiation, propagation and termination steps involving a series of complex chain reactions (Frankel, 2014). Microencapsulation of n-3 PUFAs has been shown to be efficient in minimizing the oxidative deterioration to which these fatty acids are prone, allowing them to be used in different food systems (Kaushik, Dowling, Barrow & Adhikari, 2015).

Whole milk powder is a highly nutritious food comprising mainly of lactose (38%), fat (27%), protein (26%) and ash (6%) (Chandan, Kilara & Shah 2009). Among the lipids that comprise it, alpha-linolenic acid (C18: 3 n-3, ALA) represents n-3 PUFA naturally found in this food (Pereira, 2014). The main causes of powdered milk deteriorating during storage are lactose crystallization, caking, non-enzymatic browning and lipid oxidation (Thomas, Scher, Desobry-Banon & Desobry, 2004).

In dry powdered milk by spray dryer, amorphous lactose forms a continuous matrix in which proteins, fat and air vacuoles are dispersed (Aguilar & Ziegler, 1994). In this matrix, water is bound to proteins and lactose. The non-crystalline amorphous state of lactose is a "non-equilibrium" condition with a large driving force towards the crystalline equilibrium state. At temperature and water content exceeding the critical values for glass transition, molecular mobility increases rapidly resulting in lactose crystallization (Haque & Roos, 2005; Roos, 2009).

By studying the crystallization kinetics of lactose, Clark, Paterson, Joe & Mcleod (2016) demonstrated that the phenomenon is characterized by an "all or nothing" event, as directly measuring crystallization kinetics was not possible. The authors observed that once the glass transition of sugar begins, crystallization is completed quickly. The rapid crystallization of lactose may be due to the auto catalytic effect of the moisture released during crystallization. The water released by the lactose crystallization or other reactions that have it as a product (e.g. non-enzymatic browning), as well as the water absorbed from the environment surrounding the food, will also favour the formation of liquid bridging, inter-particles that result in caking of the food powder (Roos, 2009).

Lactose crystallization in milk powder helps increase the non-enzymatic browning rate and other deteriorative changes. Non-enzymatic browning (Maillard reaction) occurs between proteins and reducing sugars found in foods. In dairy products, the reaction begins by condensing lactose with amino acid residues and

involves a variety of chemical reactions that, in advanced stages, will result in the formation of high molecular weight compounds called melanoidins (Thomas et al., 2004). Lactose crystallization can also favor lipid oxidation (Shimada, Roos & Karel, 1991).

Various authors have studied the effect of temperature on the occurrence of milk powder degradation reactions and milk formulas containing n-3 PUFA (Cheng et al., 2017; García-Martínez et al., 2010; Gonzales, Naranjo, Leiva & Malec, 2010; Romeu-Nadal et al., 2007; Thomsen, Lauridsen, Skibsted & Risbo, 2005; Yazdanpanah & Langrish, 2013) and it is well known that the reaction rate is more noticeable the higher the storage temperature. Generally, studies are conducted with samples packed in non-commercial packages (glass vials, capsules or pouches made of plastic materials with non-quantified gas and water vapor barrier properties).

The aim of this study was to evaluate the effect of two accelerated storage conditions (34 °C/ 83% relative humidity (RH) and 43 °C/ variable RH, as humidity was not controlled but monitored) on the stability of whole milk powder added with omega-3 microcapsules (fish oil rich in EPA and DHA) and packaged in 4 commercially available packaging systems for 15 weeks of storage.

3.2. MATERIALS AND METHODS

3.2.1. *Materials*

Bovine whole milk powder was produced by Itambé, Minas Gerais, Brazil. The milk powder contained approximately 23% total lipids and 90 mg/100 g α -linolenic acid (C18: 30 n-3). The moisture content was 3.6% and water activity was 0.305.

Fish oil microcapsules rich in EPA and DHA omega-3 fatty acids were produced by BASF, Denmark. The microcapsules contained 60% total lipids, 10,150

mg/100 g of the DHA and EPA summation and 500 mg/100 g of alpha-linolenic acid. The moisture content was 1.4% and the water activity was 0.252.

The characteristics of the packages used in this study were represented in Table 3.1.

Table 3.1. Main characteristics of evaluated packages and their closure systems

Package	Description	OTR	WVTR	
PETmet/ LDPE	Metallized polyethylene terephthalate laminated to low density polyethylene, heat sealed	0.731 ±0.06	1.189 + 0.10	
BOPP/PP	Polypropylene bioriented laminated to polypropylene, heat sealed	1197 + 10.53	4.160 ± 0.17	
Metal Can	Three-piece can (body, top and bottom) composed entirely of metallic material (tinplate) sealed with aluminum foil-based laminate and plastic cover	<0.005*	<0.0001*	
Composite can	Three-piece can whose body was composed of combined materials, characterized by the lamination of plastic, cellulose and aluminum foil. The bottom and top was made of tinplate. The top was sealed with aluminum foil-based laminate and plastic cover	<0.005*	<0.0001*	

OTR – oxygen transmission rate at 23 °C, 1 atm. PETmet/LDPE and BOPP/PP values were expressed in cm³ (STP)m⁻².day⁻¹. Metal and composite can values were expressed in cm³ (STP)/packaging/day.

WVTR – water vapor transmission rate at 38 °C and 90% of relative humidity. PETmet/LDPE and BOPP/PP values were expressed in g water m⁻².day⁻¹. Metal and composite can values were expressed in g water/package/ day.

Results presented as mean + standard deviation.

(*) Corresponding to the detection limit of the equipment and analytical conditions.

3.2.2. Preparation and packaging of samples

The whole milk powder and omega-3 microcapsules were blended in two stages: the first was called the premixture and the second the final blend. In the premixture stage, the total amount of omega-3 microcapsules was added to 20% of the total amount of powdered milk. The premixture stage was performed in a Kitchenaid Mixer ProLine Mixer (Kitchenaid, USA) with mixer blades. The premix was performed for 240 seconds and 58 revolutions per minute. The final blend was made by adding the premixture to the remainder of the powdered milk where the ingredients were blended for approximately 200 seconds in a horizontal blender, model MM 20 L (Consolid, São Paulo, Brazil). The final composition of the product was 96.9% of whole milk powder and 3.1% of omega-3 microcapsules.

The quality of the mixture was evaluated by analyzing the standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) of the concentration of eicosapentaenoic acid (EPA, C20: 5 n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, C22: 6 n-3) of samples collected at 5 different points equidistant from the mixer. The method of analyzing the concentration of EPA and DHA was described in item 3.2.7. The mixture presented a SD equal to 0.01 µg/ 100µg and CV equal to 3.38%.

Portions of 400 g of the product obtained were packed in the 4 packaging systems (Table 3.1). The products were packaged in atmospheric air.

The closure of the flexible plastic packages was evaluated by the color solution penetration test (erythrosine 0.15%), based on the ability of the low surface tension solution to penetrate small defects and microholes, according to the procedure described by Arndt Júnior (2001). The closure for the cans (metal and composite) was evaluated by cross-sectional cuts of the seaming, which was observed in a WACO VSM II image analysis system, Accuseam 2000 Automatic Vision Seam System version 3.0 (Dantas, Anjos, Segantini & Gatti, 1996). The metal container sealing was evaluated using mass spectrometry and helium gas equipped with a sniffer based on ASTM E499/E499M. No closure gaps were identified. The product packaged in the containers was stored under the following accelerated conditions of temperature and RH:

- 34 ± 1 °C and 83 ± 5 % RH and;
- 43 ± 1 °C and variable RH, as relative humidity was not controlled, but constantly monitored, varying from 16 to 57.8%.

3.2.3. Package headspace oxygen content

The packages were analyzed for the headspace oxygen content at the initial time (day zero), soon after being packed, and every 3 weeks. The analysis was performed in an Agilent gas chromatograph, model 7890 and the results were analyzed by the Chemstation/Agilent program, version B 03.01, based on standard curves made with calibration gases. This gas was collected using a hermetic syringe through a septum fixed on the different packages (Sarantópoulos et al., 2017). Three packages of each type were analyzed at each analysis period.

3.2.4. Water activity

The water activity was determined for 3 product samples of each package/ storage condition at each analysis period using the Aqua Lab equipment (model 4TEV, Decagon, Pullman, USA) at a constant temperature (25.00 ± 0.30 °C).

3.2.5. Moisture content

The samples were weighed and dried in an air circulation kiln (Fanem - 515/4 - C, Guarulhos, Brazil) at a temperature of 102 °C until constant weight was obtained between consecutive weighings. The first weighing was performed 4 hours after the kiln temperature stabilization (ISO/IDF, 1993). Four product samples of each package/ storage condition were analyzed at each analysis period.

3.2.6. Colour (b^* value)

The colour was measured instrumentally using a Konica Minolta portable colorimeter (Chroma Meter CR-410, Reston, USA), with CIELAB scale. About 5 g of product were packed in a black circular container. Ten readings of the b^* values were performed per product sample surface of each package/ storage condition at each analysis period. The b^* value can vary from yellowness (+) to blueness (-). An increase in the b^* value indicates a colour change to yellow and brown

3.2.7. Concentration of n -3 fatty acids (PUFA)

To determine the EPA (C20: 5 n -3) and DHA (C22: 6 n -3) concentrations, omega-3 fatty acids from the omega-3 microcapsules and alpha linolenic acid (ALA), omega-3 fatty acid found in milk powder and in the omega-3 microcapsules, 5 samples of the product of each package/ storage condition at each analysis period were subjected to extraction of the lipid fraction using the method described by Bligh & Dyer (1959). The extracts of each product/ type of packaging/ storage condition were mixed to compose a blend. After the solvent evaporated, the extract blends were subjected to esterification of the fatty acids, transforming them into methyl esters using the Hartman & Lago method (1973). The composition of fatty acids (including EPA, DHA and ALA) was determined by gas chromatography using a flame ionization detector (GC-FID), by comparing the retention times of the fatty acids of the samples with those obtained for the standards used (Fame mix37 Sigma-Aldrich) (Firestone, 2014). Quantifications were performed from normalization and transformation of the area for g/100 g.

3.2.8. Morphology and Microstructure

The surface morphology of the product (whole milk powder and omega-3 microcapsules) was visualized using scanning electron microscopy (SEM). The samples were fixed on metal surfaces and then coated with gold (four coating

cycles, Baltec Sputter Coater SDC 50, Balzers, Liechtenstein) and observed through a scanning electron microscope JEOL JSM-5800LV (GenTech, USA) capturing electronic images at different magnifications and an electron beam at 10 kV (Goldstein et al., 2012).

3.2.9. Statistical analysis

The results of the package head space oxygen content, water activity, moisture content, colour (b^* value) and concentration of fatty acids EPA (C20: 5 n-3), DHA (C22: 6 n-3) and ALA (C18: 3 n-3), were statistically analyzed by comparing the means. When the results presented normality (Shapiro-Wilk or Anderson-Darling tests) and homoscedasticity (equal variances, Levene or Bartlett tests), ANOVA was used, the Tukey's multiple paired comparisons test. In the case of normality and different variances, Welch's ANOVA and the paired multiple comparison tests of T2 and Games-Howell were used. In the cases of non-normality, the Kruskal-Wallis non-parametric test and Dunn's paired multiple comparison test were used. The tests were performed using the XLSTAT statistical program, version 19.02.42756 (Addinsoft, USA).

3.3. RESULTS AND DISCUSSION

Samples of the product in the different packages and storage conditions were evaluated for the oxygen concentration in the package headspace, water activity, moisture content, EPA (C20: 5 n-3), DHA (C22: 6 n-3) and ALA (C18: 3 n-3) concentrations and colour (b^* value), right after processing the mixture of ingredients (zero time) and every 3 weeks. The morphology and microstructure of the product were evaluated by SEM at zero time and in the twelfth week.

The initial results (zero time) of oxygen content in the package headspace did not present a statistically significant difference ($p < 0.05$) between the 4 packages

and were equal to 20.73% (PETmet/LDPE), 20.66% (BOPP/PP), 20.61% (metal can) 20.67% (composite can).

A similar reduction in the oxygen content of the headspace was observed throughout the storage time at 34 °C/83% RH (Figure 3.1a) in all the packages. The results obtained in the fifteenth week of storage were lower than those characterized at zero time ($p < 0.05$) and the results showed a statistically significant difference between the packages at the end of the study (15th week) ($p < 0.05$) with values equal to 18.64% (BOPP/PP), 18.23% (composite can), 17.44% (metal can) and 16.87% (PETmet/ LDPE).

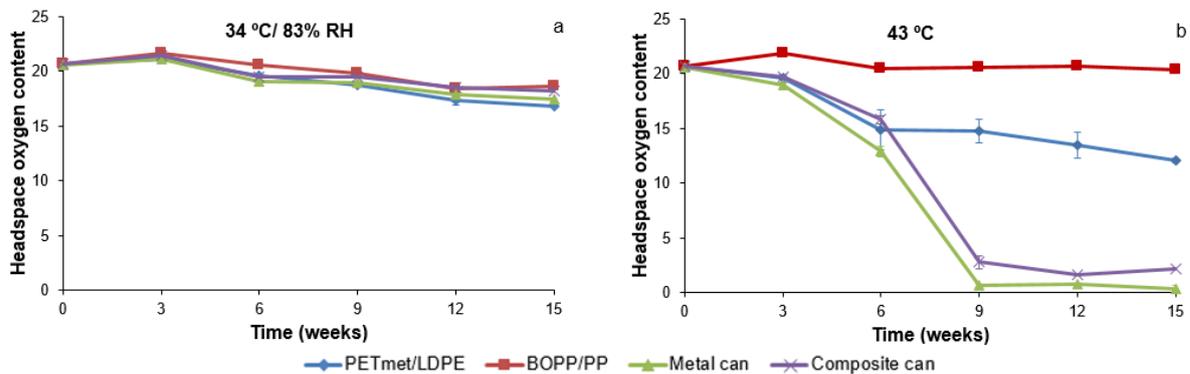


Figure 3.1. Oxygen content (%v/v) in the package headspace over time in the storage conditions of 34 °C/ 83% RH (a) and 43 °C (b).

In the storage condition at 43 °C, although a slight increase in the percentage of oxygen in the package headspace was observed in the third week of storage (increase of 1.24% in relation to the initial time), the sample in BOPP/PP was shown to be stable throughout the storage time (Figure 3.1b). In the other analysis periods, there was no statistically significant difference ($p < 0.05$). This behaviour was expected due to the high OTR of BOPP/PP which allowed gas exchanges between the package headspace and the external environment. Thus, even though oxygen was being consumed due to oxidative reactions, oxygen permeation to the inside of the package maintained 20 to 21% of this gas in the package headspace until the end of the study.

At 43 °C, there was a significant reduction in the percentage of oxygen available in the PETmet/LDPE package headspace from the third week of storage (Figure 3.1b) ($p < 0.05$). There was no statistically significant difference between the 9th and 12th weeks, however at the end of the study the oxygen content in the package headspace of the PETmet/LDPE was reduced to 12.05%. The OTR of the PETmet/LDPE was about 1000-fold lower than that reported by BOPP/PP (Table 3.1), which justifies the results observed in PETmet/LDPE.

In the cans (metal and composite), the reduction in the oxygen content in the package headspace was significant until the ninth week of storage at 43 °C (Figure 3.1b) ($p < 0.05$). In the following weeks, the oxygen content remained stable and similar to that observed in the ninth week. These results are consistent with the gas sealing and impermeability of the can materials that did not allow oxygen permeation. Oxidative reactions consumed the oxygen found in the headspace of the cans reaching levels close to zero after the sixth week of storage.

The initial A_w (zero time) of the product was 0.313, while the moisture content was $3.54 \pm 0.04\%$.

In the storage condition at 34 °C/ 83% RH, the BOPP/PP product showed an increase in A_w and moisture content due to the water vapour permeability of this packaging material (Figs. 3.2a and 3.3a, Table 3.1) and the high relative humidity storage condition. A peak water activity in the ninth week suggests that in addition to of water vapour sorption, reactions were occurring in order to release water that was previously complexed to the food matrix. The increase in A_w is consistent with lactose crystal formation and initiation of the Maillard reaction for the product in this package, since both phenomena are associated with water release. The increase in the b^* value (Figure 3.4a), which will be discussed next, denotes the browning of the product, corresponding to the formation of melanoidines.

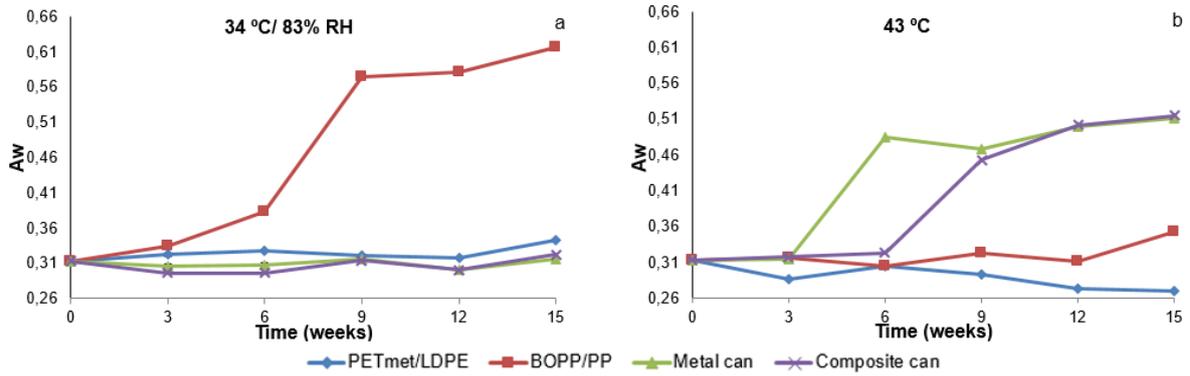


Figure 3.2. Aw of the product in different packages over time in the storage conditions of 34 °C/ 83% RH (a) and 43 °C (b)

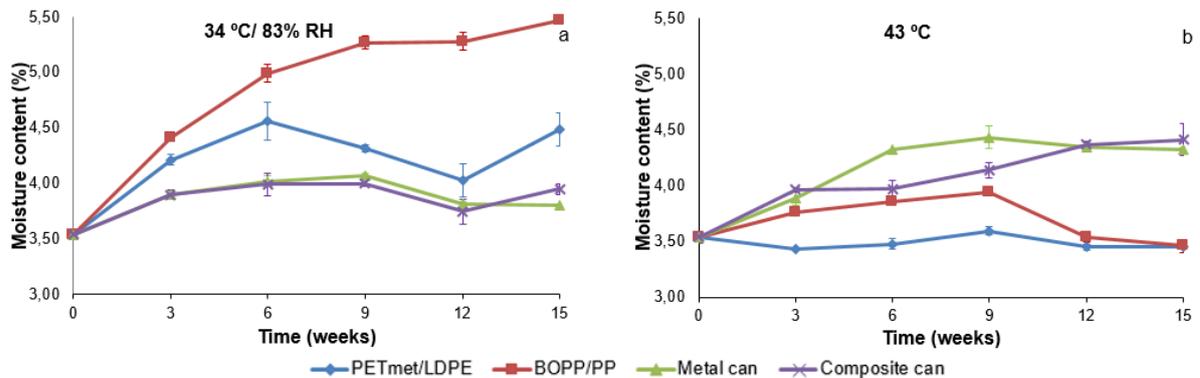


Figure 3.3. Product moisture content (%) in different packages over time in the storage conditions of 34 °C/ 83% RH (a) and 43 °C (b)

At 34 °C/83 % RH, the product packaged in the other packages presented lower, however a significant increase in Aw at the end of fifteen weeks of storage when compared to zero time ($p < 0.05$). The mean values at the end of the study were 0.616 (BOPP/PP), 0.342 (PETmet/LDPE), 0.322 (composite can) and 0.316 (metal can).

In the same storage condition, in the 15th week, the moisture content of the products in the metal and composite cans, with no statistically significant difference between the two packages ($p < 0.05$), was lower than that observed for the PETmet/LDPE product (Figure 3.3a). The cans are characterized by the closure sealing and the lack of water vapour permeation through the packaging material, which justifies

the results obtained. Over time, small differences in the moisture content of the products in the cans in relation to zero time could be due to the balance of the food with the relative humidity of the package headspace. In the 15th week, the products had a moisture content of 5.46% (BOPP/PP), 4.48% (PETmet/LDPE), 3.80% (composite can) and 3.80% (metal can) (Figure 3.3a).

At 43 °C, the samples in the metal cans showed an increase in A_w from 0.313 to 0.484 in the sixth week of storage. Similar behaviour was observed for the samples in composite cans (increase from 0.313 to 0.453) in the 9th week under equal storage conditions (Figure 3.2b). At the end of the study, the A_w values of the product in the metal cans (0.515) and composite cans (0.510) were statistically equal to and greater than the A_w presented by the samples in BOPP/PP (0.353) and PETmet/LDPE (0.269) (<0.05) (Figure 3.2b). Thomsen et al. (2005) also showed an increase in water activity (from 0.23 to 0.46) in milk powder packed in hermetically sealed glass vials and stored at 45 °C for 147 days. The authors report that the same did not occur with the product stored at 35 °C. The authors attributed increased water activity to the lactose crystallization.

A recent study by Cheng et al. (2017) demonstrated a significant increase in water activity in infant formulas supplemented with PUFAs stored in closed containers after 48 days of storage at 55 °C and after 2 days of storage at 70 °C. The authors correlated the phenomenon to the degradation of lactose and proteins, which release water as the product of the reactions.

In the storage condition at 43 °C, the product in BOPP/PP presented higher moisture content than the product in PETmet/LDPE (Figure 3.3b) from the 3rd to 12th week of storage ($p < 0.05$). The WVTR of the BOPP/PP film was about 3.5 times greater than the PETmet/LDPE film at 38 °C and 90% RH (a condition in which the materials were characterized for WVTR according to Table 3.1). A decline in moisture content of the sample in BOPP/PP was observed after 9 weeks of storage (Figure 3.3b). This may have occurred as a function of the relative humidity variation of the chamber at 43 °C during the study. Although the relative humidity of this chamber was not controlled, monitoring of this parameter showed a peak of 57.80% in the sixth week and values always below 45.60% of RH from the ninth week of storage.

The increase in moisture of the product in BOPP/PP at 43 °C by the ninth week may have benefitted the lactose crystallization and, consequently, release of water previously bound to the amorphous structure of the sugar, since the A_w of the product in this package increased from the twelfth week of storage (Figure 3.4b), even considering the reduction in moisture content, which also justifies the colour change with an increase in the b^* value (Figure 3.4b) for the product in BOPP/PP at 12th week, as well as the surface characteristics of milk powder observed in scanning electron microscopy (Figure 3.10) shown next.

The change in colour was expressed by the b^* value whose coordinate varies from yellow (+) to blue (-), where an increase in the b value reflects a change in colour from yellow to brown (Morales & Van Boekel, 1999). At zero time, the product had a b^* value of 20.20 (Figure 3.4).

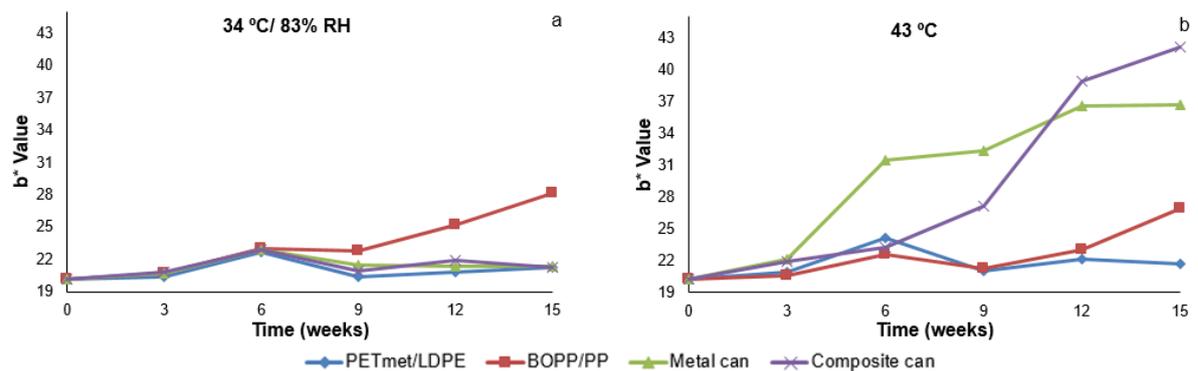


Figure 3.4. b^* value (colour) of the product in different packages over time in the storage conditions of 34 °C/ 83% RH (a) and 43 °C (b)

At 34 °C/ 83% RH, only the sample in BOPP/PP showed a significant increase in the b^* value after 6 weeks of storage ($p < 0.05$). In the 15th week of storage, the b^* values obtained for the products were 28.13 (BOPP/PP), 21.40 (metal can), 21.29 (PETmet/LDPE) and 21.24 (composite can) (Figure 3.4a).

In the storage condition at 43 °C, the product in the metal can presented a significant increase of the b^* value (31.51) when compared to the products in the other packages ($p < 0.05$) after three weeks of storage. The b^* value (28.36) of the

product in the composite can began to show a significant increase when compared to the product in PETmet/LDPE (21.08) and BOPP/PP (21.27) from the sixth week of storage. At the end of the study, the results obtained were equal to 42.15 (composite can), 36.69 (metal can), 26.95 (BOPP/PP) and 21.65 (PETmet/LDPE) (Figure 3.4b).

Cheng et al. (2017) evaluated the variation of the b^* value in infant formulas stored at different temperatures and the values obtained also showed a pattern of change similar to those detected for A_w of the products at 55 °C. Below this temperature, at 25 °C and 40 °C, the changes observed by the authors were minimal. The relationship between the intensity of yellow and A_w in milk powder had already been pointed out by Stapelfeldt, Nielsen and Skisted (1997) in a stability study of powdered milk stored with different A_w controlled at 45 °C. Thomsen et al. (2005) observed no change in the b^* value in milk powder samples stored in hermetically sealed vials at 37 °C. For samples stored at 45 °C, the difference of the b^* value was observed after 71 days of storage while at 55 °C, the change in coloration could already be observed from the seventh day of storage. The authors stated that the increase in the b^* value quantifies the formation of final products of the Maillard reaction (melanoidines) and confirmed that the darkening occurred simultaneously with the increase in A_w .

Saltmarch, Vagnini-Ferrari & Labuza, (1981) showed that the darkening rate at 45 °C increased rapidly in A_w 0.33, with a peak between A_w 0.44 and 0.53. The maximum rate of non-enzymatic browning coincided with the intense lactose crystallization, which was observed by the authors using scanning electron microscopy. Kim, Saltmarch & Labuza (1981) observed that the lactose crystallization from whey powder stored at 35° C in closed pouches increased water activity rapidly and accelerated non-enzymatic browning compared to the reaction rate observed in samples stored at the same temperature, open and exposed to the environment, where water activity was maintained constant.

In the present study, as observed by the aforementioned authors, the non-enzymatic darkening, shown by the change of the b^* value throughout the storage time, presented a pattern similar to the A_w results (Figures 3.2 and 3.4).

ALA Concentrations, as well as the EPA and DHA summation were expressed in milligrams of fatty acids per 13 grams of product (Figure 3.5). The concentration of these fatty acids in mg/13 g was due to legislation in Brazil, where the study was conducted, which recommends the minimum concentration of 40 mg of the EPA and DHA summation for 100 mL of the ready-to-eat product so that it can be called "source" of omega-3 (Brasil, 2012). The 100 mL portion ready for consumption uses 13 g of the powder for preparation.

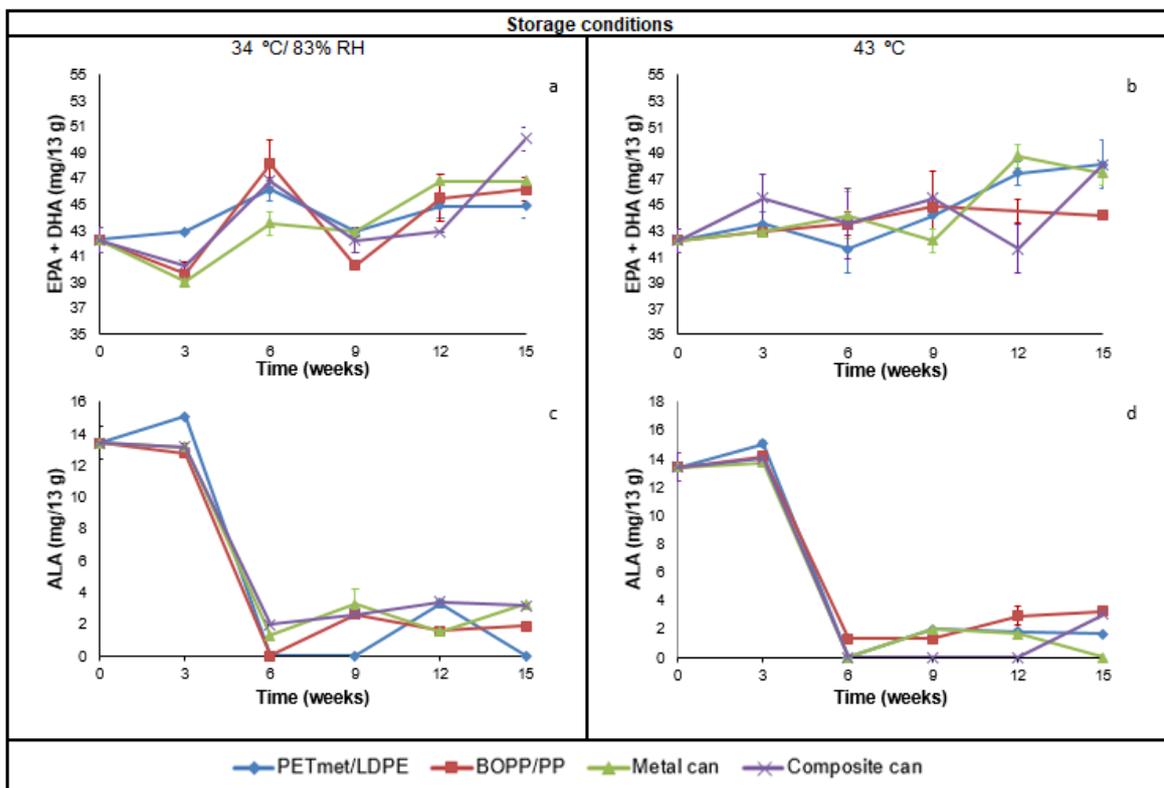


Figure 3.5. Summation of the EPA and DHA concentrations (mg/13 g) of the product in different packages over time in the storage conditions of 34 °C/83 % RH (a) and 43 °C (b) and the ALA concentration (mg/ 13 g) of the product in different packages over time in the storage conditions of 34 °C/ 83% RH (c) and 43 °C (d)

The summation content of EPA and DHA at zero time was 42.25 mg/13 g (Figure 3.5a and 3.5b), while the initial concentration of ALA was 13.41 mg/13 g (Figure 3.5c and 3.5d).

In the storage condition at 34 °C/83 % RH, at the end of the 15-week study the concentration of the EPA and DHA summation ranged from 44.85 mg/13 g (PETmet/ LDPE sample) to 50.05 mg/13 g (composite can sample). Intermediate values were observed in the BOPP/PP and metal can samples (46.15 mg/13 g and 46.80 mg/13 g respectively), with no statistically significant difference between these samples ($p < 0.05$) (Figure 3.5a).

At 43 °C, the BOPP/PP sample presented the lowest value for the EPA and DHA summation content (44.20 mg/13 g), while the values obtained for the metal can (47.45 mg/13 g), PETmet/LDPE and composite can samples (both 48.10 mg/13 g) did not differ significantly ($p < 0.05$) (Figure 3.5b).

Although the EPA and DHA summation content showed a variation during the 15 weeks of storage in both storage conditions, the difference between the analyses, when significant, may have been due to the variation of the concentration of these fatty acids in the product. At the end of the study, all samples remained a "source of omega-3" (summation of EPA and DHA ≥ 40 mg/13 g) according to Brazilian legislation.

Until the third week of storage, the ALA concentration of the products in BOPP/ PP (12.75 mg/13 g), metal can (13.17 mg/13 g) and composite can (13.18 mg/13 g) remained stable and without a statistically significant difference ($p < 0.05$) at 34 °C/ 83% RH. The PETmet/LDPE sample presented ALA content of 15.06 mg/13 g (Figure 3.5c). From the third week, the ALA concentration of the products in the different packages reduced about 7 to 10 times in relation to the initial content, and were not able to be detected in some samples at different analysis periods (Figure 3.5c).

In this same storage condition, at the end of 15 weeks, the ALA concentration reached undetectable limits for the PETmet/LDPE sample. The values of ALA concentration were 3.25 mg/13 g and 3.15 mg/13 g in the cans (metal and composite), with no statistically significant difference ($p < 0.05$), whereas the content of this fatty acid in samples in BOPP/PP was 1.88 mg/13g (Figure 3.5c).

The ALA concentration in the samples at 43 °C was similar to that observed in the samples conditioned at 34 °C/83 % RH, i.e., until the third week. In the metal and composite cans, the ALA concentration remained stable (13.73 mg/13 g and 13.99 mg/ 13 g) and similar to zero time (13.41 mg/13 g) (Figure 3.5d). At the same time, samples in BOPP/PP and PETmet/LDPE showed an increase in ALA concentration (14.16 mg/13 g and 15.04 mg/13 g, respectively). In the following weeks, the ALA content was reduced about 4 to 10 times in relation to the concentration of this fatty acid at zero time. The metal can sample had no detectable value for ALA at the fifteenth week of storage, while the PETmet/LDPE sample presented an ALA content of 1.63 mg/13 g. Samples in BOPP/PP and the composite can presented results that did not differ significantly (3.26 mg/13 g and 3.01 mg/13 g, respectively) ($p < 0.05$) (Figure 3.5d).

Garcia-Martínez et al. (2010) studied the lipid stability of infant formulas supplemented with PUFAs of vegetal origin (blend of vegetable oils) stored in plastic packaging without modified atmosphere and stored at 25 °C, 30 °C and 37 °C. No significant change was observed in relation to the lipid profile extracted from infant formula during the storage period, however the authors report that the samples conditioned at 37 °C had a rancid flavour.

Romeu-Nadal et al. (2007) evaluated the oxidative stability of the lipid fraction in formulas made with whole milk powder and PUFAs. The formulas were packed in intact aluminum foil packages and stored at 25 °C and 37 °C for 15 months. Among the formulations evaluated, the product supplemented with 0.83% of fish oil microcapsules showed stable levels for DHA over the period studied in the two storage temperatures.

The stability of the EPA and DHA concentrations to the detriment of the significant reduction in the ALA concentration in the samples of all the packaging systems evaluated in the two storage conditions showed that the microencapsulation of EPA and DHA had a protective effect on these omega-3 fatty acids.

The SEM images showed that the integrity of the omega-3 microcapsules was preserved from the beginning (Figure 3.6) to the end of the study (Figures 3.7 and 3.8). Although the images presented in this work were taken in the 12th week

of storage, similar patterns of omega-3 microcapsules characteristics were observed in the last analysis period (week 15).

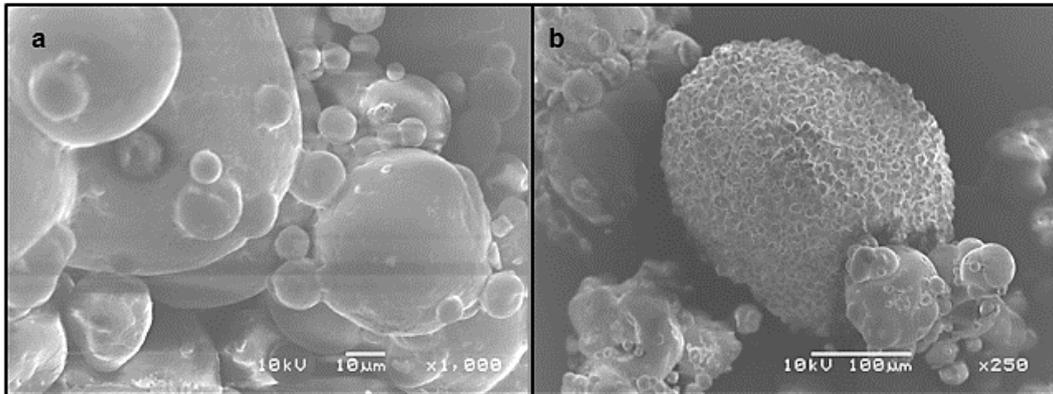


Figure 3.6. Surface and microstructure morphology (SEM) of samples at the beginning of the study (zero time), where a = whole milk powder particles, increase of 1000 x, 10 kv, bar = 10 μm and b = omega-3 microcapsules, increase of 250 x, 10 kv, bar = 100 μm

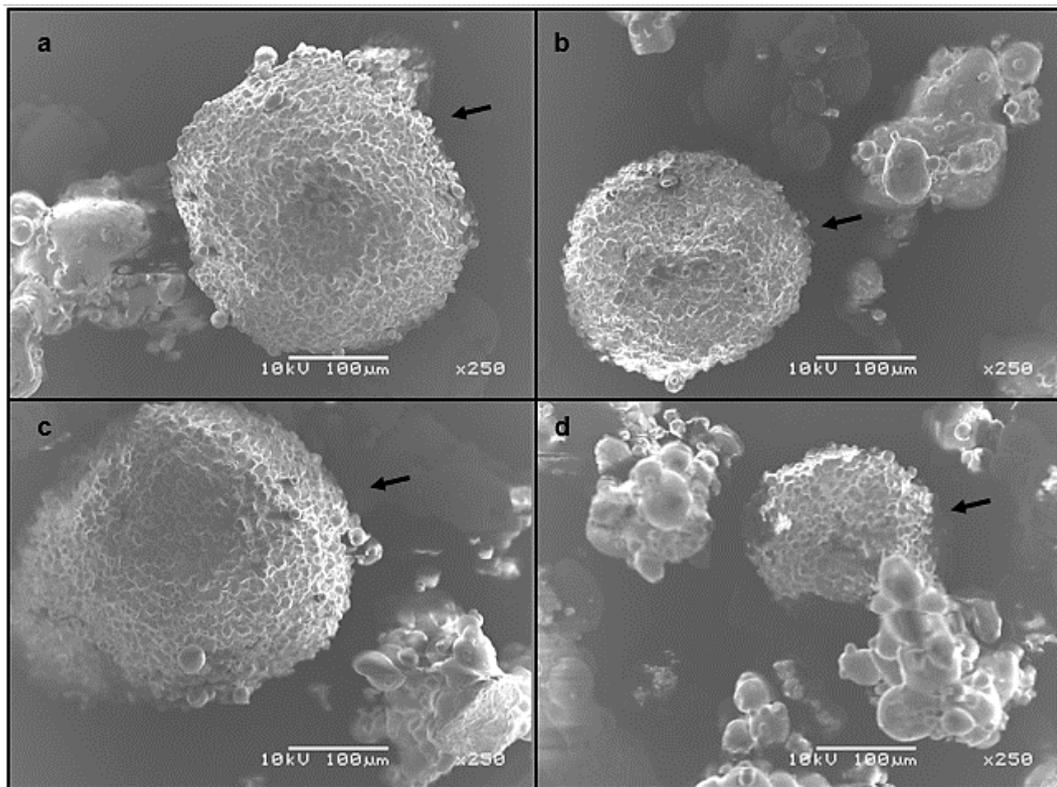


Figure 3.7. Surface and microstructure morphology (SEM) of samples at the 12th week of storage at 34 °C/ 83 % RH, where a = sample in PETmet/LDPE, b = sample in BOPP/PP, c = sample in metal can and d = sample in composite can. Increase of 250 x, 10 kv, bar = 100 μm. The arrows show the omega-3 microcapsules.

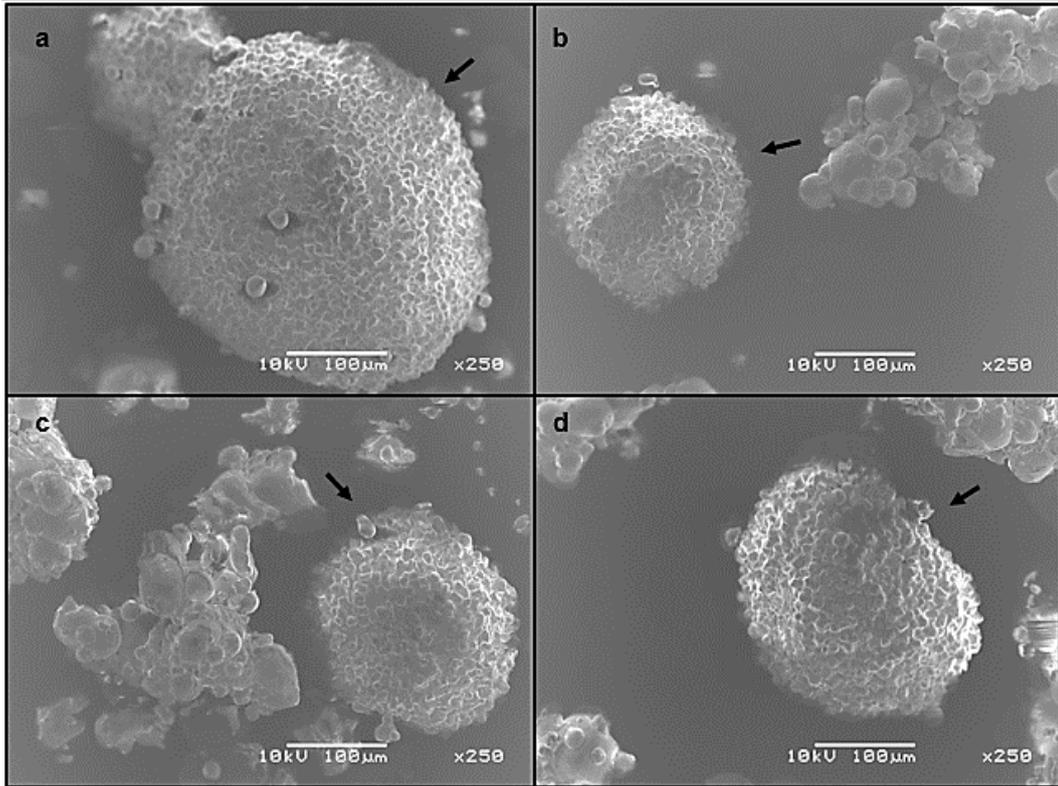


Figure 3.8. Surface and microstructure morphology (SEM) of samples at the 12th week of storage at 43 °C, where a = sample in PETmet/LDPE, b =sample in BOPP/PP, c = sample in metal can and d =sample in composite can. Increase of 250 x, 10 kv, bar = 100 µm. The arrows show the omega-3 microcapsules.

At the beginning of the study, the whole milk powder had rounded shape and polydispersed particles. Few clusters were observed and the surface was relatively smooth and regular (Figure 3.6.).

In the 12th week of storage at 34 °C/83 % RH, changes in the surface characteristics of whole milk powder were observed mainly in the BOPP/PP sample (Figure 3.9b). The surface of the milk became rough due to the lactose crystallization.

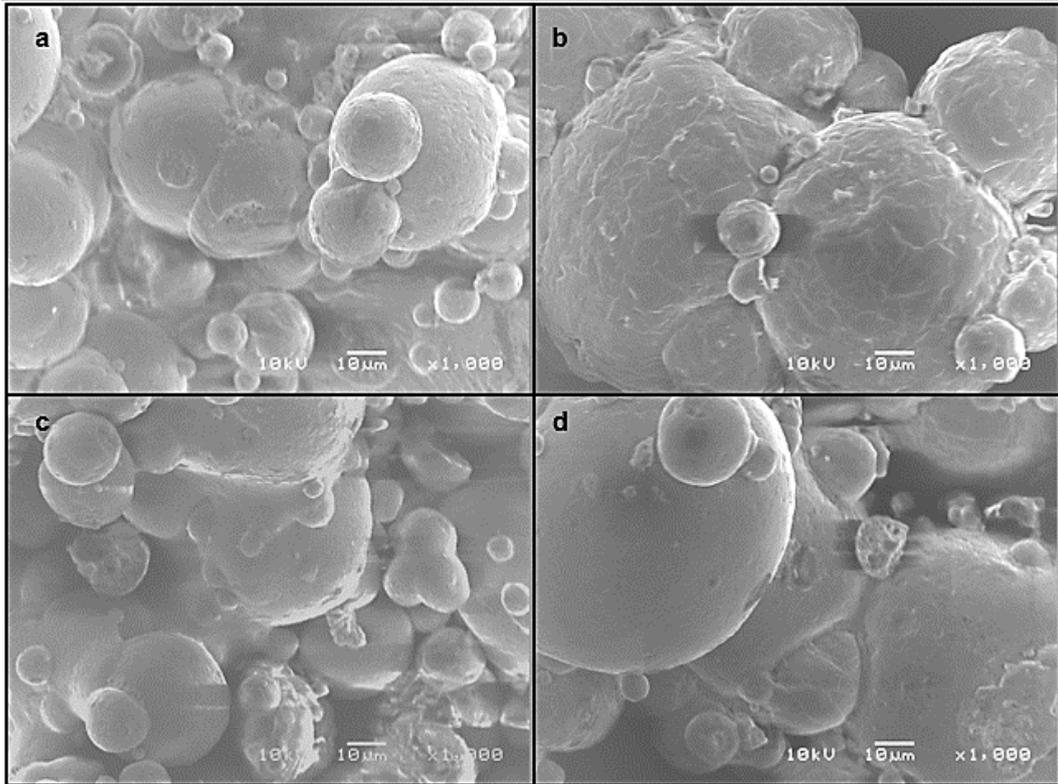


Figure 3.9. Surface and microstructure microscopy morphology (SEM) of samples in the 12th week of storage at 34 °C/ 83% RH, where a = sample in PETmet/LDPE, b = sample in BOPP/PP, c = sample in metal can and d = sample in composite can. Increase of 1000 x, 10 kv increase, bar = 10 µm

Similar images to the present study were published by Murrieta-Pazos et. al (2011). The authors evaluated the surface characteristics of whole milk powder samples whose A_w varied from 0.11 to 0.97 and found that from A_w 0.43, the surface of the particles became irregular, which corresponded to the formation of lactose crystals. The crystals were not visible because they were located under the surface of the whole milk powder, composed mainly of a thin layer of fat (Murrieta-Pazos et al., 2011; Ozkan, Walisinghe & Chen, 2002). At 34 °C/ 83% RH in week 12, A_w of the product in BOPP/PP was equal to 0.581, while the product in the other packages showed A_w always below 0.320.

At 43 °C, in the 12th week, A_w of the products in the metal and composite packages were 0.499 and 0.502 respectively. The products in flexible packaging presented A_w equal to 0.311 (BOPP/PP) and 0.273 (PETmet/LDPE). The images

obtained by SEM for the products in metal can and composite can packaging are shown in Figure 3.10 (c and d, respectively). The surface roughness of the canned samples can be observed in both images and, as the BOPP/PP product at 34° C/83% RH, changes were related to the formation of lactose crystals.

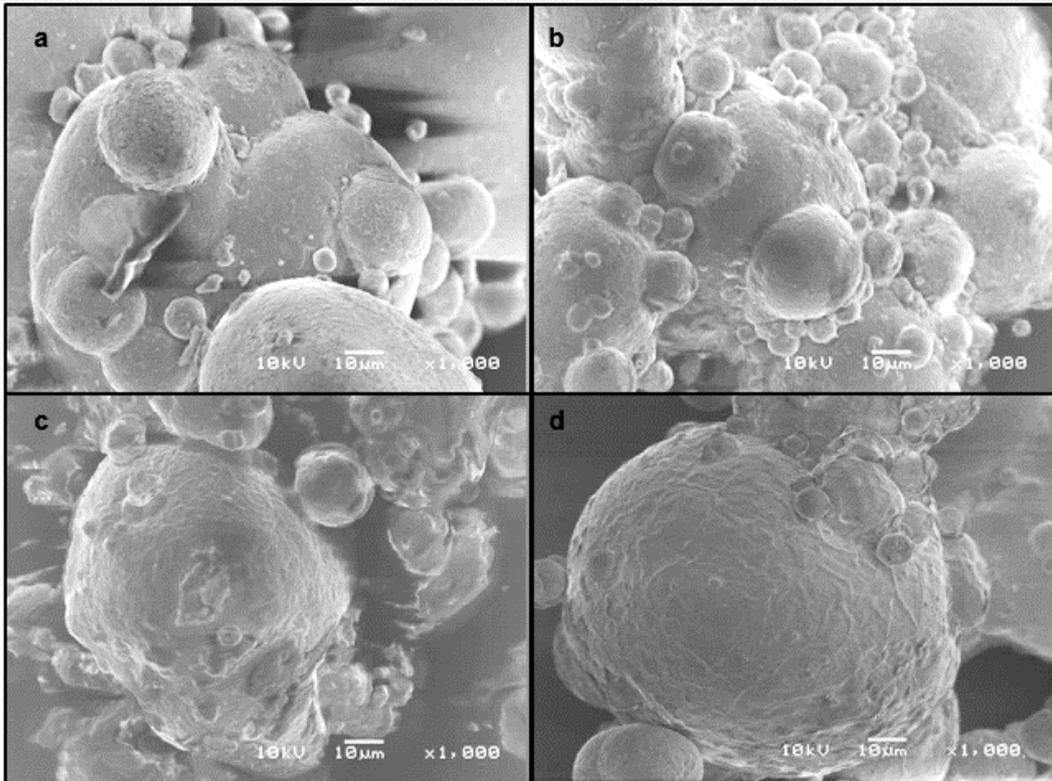


Figure 3.10. Surface and microstructure morphology (SEM) of samples in the 12th week of storage at 43 °C, where a = sample in PETmet/LDPE, b = sample in BOPP/PP, c = sample in metal can and d = sample in composite can. Increase of 1000 x, 10 kv, bar = 10 μm

In both storage conditions, the images showed the formation of clusters of milk powder particles that suggest the appearance of caking. The phenomenon may have occurred due to the increase in moisture content and A_w and probably also due to the migration of fat from the interior of the milk powder matrix to the surface, similar to that observed by Zhong et al. (2017) while heating whole milk powder by radiofrequency.

The PETmet/LDPE and BOPP/PP products (Figure 3.10, a and b, respectively) presented different surface characteristics than those observed at the initial time (Figure 3.6a), as an irregular surface pattern can also be observed, although the groove formations were less defined than those visualized for the product in the cans.

3.4. CONCLUSION

The lactose crystallization showed to be the phenomenon of greater interference in the stability of whole milk powder supplemented with omega-3 in different commercial packages and stored at 34 °C/ 83% RH and at 43 °C/ without relative humidity control. The degradation of this sugar was related to the increase in moisture content and A_w in the BOPP/PP package due to the high WVTR, mainly in the storage condition at high relative humidity (34 °C/ 83 % RH). The temperature of 43 °C was determinant for the occurrence of the phenomenon in metal and composite cans. The change in the vitreous state of lactose caused the release of water bound to the amorphous structure of this sugar. The sealing and high water vapor barrier of the cans prevented the water released by the lactose crystallization from permeating the packaging materials, favouring the increase in A_w and, consequently, increase in non-enzymatic browning (b^* value). The surface roughness of BOPP/PP samples (34 °C/ 83% RH) and metal and composite cans (43 °C) make it clear that lactose crystals are formed under the surface of whole milk powder.

The difference between the storage conditions was also relevant in the occurrence of lipid oxidation, since, at 43 °C, a higher consumption of oxygen can be seen. Flexible packages were permeable to oxygen (the OTR of the BOPP/PP package is about 1000 times greater than that of the PETmet/LDPE package) so that the permeation of oxygen through the packaging material caused the maintenance of higher contents than those observed for the headspace of the metal and composite cans. In both storage conditions and in all samples evaluated, ALA fatty acid, present mainly in milk powder, was degraded by the presence of oxygen

from the third week of storage, while the levels of EPA and DHA, microencapsulated fatty acids maintained satisfactory levels throughout the study so that the product maintained the functional property "source of omega-3", demonstrating that the microencapsulation had a protective effect on fatty acids from fish oil.

Acknowledgements

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) [grant #2015/12955-0].

The authors are grateful to BASF SA and Itambé Alimentos S/A. for providing the materials, the staffs Sophia Moyses Lamonica Ribeiro and Karoline Urbano for their contributions in the execution of this work and Daisy Moitinho for assistance of statistical analysis.

3.5. REFERENCES

- Aguilar, C. A. & Ziegler, G.R. (1994). Physical and microscopic characterization of dry whole milk with altered lactose content. 2. Effect of lactose crystallization. *Journal of Dairy Science*, 77, 1198–1204.
- Apte, S. A., Cavazos, D. A., Whelan, K. A., & de Graffenried, L. A. (2013). A low dietary ratio of omega-6 to omega-3 Fatty acids may delay progression of prostate cancer. *Nutrition and cancer*, 65(4), 556-562.
- Arab-Tehrany, E., Jacquot, M., Gaiani, C., Imran, M., Desobry, S., & Linder, M. (2012). Beneficial effects and oxidative stability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Trends in Food Science and Technology*, 25(1), 24–33.
- Arndt Júnior, G. W. (2001) Examination of flexible and semirigid food containers for integrity. In: Food & Drug Administration. Bacteriological analytical manual online. Silver Spring, MD: FDA, <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm072703.htm>

- ASTM (2011) ASTM E 499/E499M-11: standard practice for leaks using the mass spectrometer leak detector in the detector probe mode. West Conshohocken, 6 p.
- Best, K. P., Gold, M., Kennedy, D., Martin, J., & Makrides, M. (2016). Omega-3 long-chain PUFA intake during pregnancy and allergic disease outcomes in the offspring: a systematic review and meta-analysis of observational studies and randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 103(1), 128-143.
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.
- Bonaccio, M., Ruggiero, E., Di Castelnuovo, A., Costanzo, S., Persichillo, M., De Curtis, A., Cerletti, C., Donati, M. B., de Gaetano, G. & Iacoviello, L. (2017). Fish intake is associated with lower cardiovascular risk in a Mediterranean population: prospective results from the Moli-sani study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 27(10), 865-873.
- Brasil (2012), Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012. Regulamento Técnico sobre informação nutricional complementar.
- Clark, Z., Paterson, A. H. J., Joe, R., & Mcleod, J. S. (2016). Amorphous lactose crystallisation kinetics. *International Dairy Journal*, 56, 22-28.
- Chandan, R. C.; Kilara, A.; Shah, N. P. (Ed.). (2009) Dairy processing and quality assurance. John Wiley & Sons, 575 p.
- Cheng, H., Ru-Gang, Z., Erichsen, H., Soerensen, J., Petersen, M. A., & Skibsted, L. H. (2017). High temperature storage of infant formula milk powder for prediction of storage stability at ambient conditions, *International Dairy Journal*, 73, 166-174.
- Dantas, S. T., Anjos, V. D. A., Segantini, E., & Gatti, J. A. B. (1996) Assesment of metallic packaging quality: steel and aluminium. Brazil, 317 p.
- Endo, J. & Arita, M. (2016). Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Cardiology*, 67(1), 22-27.
- Firestone, D. (2014). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 6. ed. Urbana: AOCS.
- Frankel, E. N. (2014). Lipid oxidation (2nd ed., Chapt.1,2). Sawston, Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.
- García-Martínez, C., Rodríguez-Alcalá, L. M., Marmesat, S., Alonso, L., Fontecha, J., & Márquez-Ruiz, G. (2010). Lipid stability in powdered infant formula

- stored at ambient temperatures, *International Journal of Food Science & Technology*, 45(11), 2337-2344.
- Goldstein, J. L., Newbury, D. E., Echlin, P., Joy, D. C., Romig Jr., A. D., Lyman, C. E., Fiori, C., Lifshin, E. (1992). *Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis: a text for biologists, materials scientists, and geologists* (2nd ed.) New York: Plenum Press.
- Gonzales, A. P., Naranjo, G. B., Leiva, G. E., & Malec, L. S. (2010). Maillard reaction kinetics in milk powder: Effect of water activity at mild temperatures. *International Dairy Journal*, 20(1), 40-45.
- Gould, J. F., Makrides, M., Colombo, J., & Smithers, L. G. (2014). Randomized controlled trial of maternal omega-3 long-chain PUFA supplementation during pregnancy and early childhood development of attention, working memory, and inhibitory control, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99(4), 851-859.
- Haque, M. K., & Roos, Y. H. (2005). Crystallization and X-ray diffraction of spray-dried and freeze-dried amorphous lactose. *Carbohydrate Research*, 340(2), 293-301.
- Hartman, R. C. A. & Lago (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*. 22, 494-495.
- Högström, M., Nordström, P., & Nordström, A. (2007). n-3 Fatty acids are positively associated with peak bone mineral density and bone accrual in healthy men: the NO₂ Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(3), 803-807.
- Innis, S. M. (2008). Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. *Brain research*, 1237, 35-43.
- ISO/IDF. (1993). Dried milk and dried cream: determination of water content. IDF bulletin N° 26 A. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- Kaushik, P., Dowling, K., Barrow, C. J., & Adhikari, B. (2015). Microencapsulation of omega-3 fatty acids: A review of microencapsulation and characterization methods, *Journal of Functional Foods*, 19, 868-881.
- Kim, M. N., Saltmarch, M., & Labuza, T. P. (1981). Non-enzymatic browning of hygroscopic whey powders in open versus sealed pouches, *Journal of Food Processing and Preservation*, 5(1), 49-57.
- Külzow, N., Witte, A. V., Kerti, L., Grittner, U., Schuchardt, J. P., Hahn, A., & Flöel, A. (2016). Impact of omega-3 fatty acid supplementation on memory functions in healthy older adults, *Journal of Alzheimer's Disease*, 51(3), 713-725.

- Lajous, M., Willett, W. C., Robins, J., Young, J. G., Rimm, E., Mozaffarian, D., & Hernán, M. A. (2013). Changes in fish consumption in midlife and the risk of coronary heart disease in men and women, *American Journal of Epidemiology*, 178(3), 382-391.
- Moore, N. G., Wang-Johanning, F., Chang, P. L., & Johanning, G. L. (2001). Omega-3 fatty acids decrease protein kinase expression in human breast cancer cells, *Breast Cancer Research and Treatment*, 67(3), 279-283.
- Morales, F. J., & Van Boekel, M. A. J. S. (1999). A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: colour formation, *International Dairy Journal*, 8(10-11), 907-915.
- Murrieta-Pazos, I., Gaiana, C., Galetb, L., Cuqç, B., Desobrya, S., & Schera, J. (2011). Comparative study of particle structure evolution during water sorption: Skim and whole milk powders. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 87, 1-10.
- Niva, M. (2007). All foods affect health: understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns, *Appetite*, 48, 384.
- Ozkan, N., Walisinghe, N., & Chen, X. D. (2002). Characterization of stickiness and cake formation in whole and skim milk powders, *Journal of Food Engineering*, 55, 293-303.
- Pereira, P. C. (2014). Milk nutritional composition and its role in human health, *Nutrition*, 30(6), 619-627.
- Ramakrishnan, U., Gonzalez-Casanova, I., Schnaas, L., DiGirolamo, A., Quezada, A. D., Pallo, B. C., Hao, W. Neufeld, L.M., Riveira, J. A. Stein, A. D. & Martorell, R. (2016). Prenatal supplementation with DHA improves attention at 5 y of age: a randomized controlled trial, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 104(4), 1075-1082.
- Romeu-Nadal, M., Chavez-Servin, J. L., Castellote, A. I., Rivero, M., & Lopez-Sabater, M. C. (2007). Oxidation stability of the lipid fraction in milk powder formulas, *Food Chemistry*, 100(2), 756-763.
- Roos, Y. H. (2009). Solid and liquid states of lactose, *Advanced Dairy Chemistry*, 3, 17-33.
- Saltmarch, M., Vagnini-Ferrari, M., & Labuza, T.P. (1981). Theoretical basis and application of kinetics to browning in spray-dried whey food systems. *Progress in Food and Nutrition Science*, 5, 331-344.
- Salvig, J. D., & Lamont, R. F. (2011). Evidence regarding an effect of marine n-3 fatty acids on preterm birth: a systematic review and meta-analysis, *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 90(8), 825-838.

- Sarantópoulos, C. G. L., Alves, R. M. V., Coltro, L., Padula, L., Teixeira, F. G., Moreira, C. Q. (2017). Embalagens plásticas flexíveis principais polímeros e avaliação de propriedades (2nd ed., Chapt. 11) CETEA, ITAL, Brasil.
- Sheppard, K. W., & Cheatham, C. L. (2013). Omega-6 to omega-3 fatty acid ratio and higher-order cognitive functions in 7-to 9-y-olds: a cross-sectional study, *The American journal of clinical nutrition*, 98(3), 659-667.
- Shimada, Y., Roos, Y., & Karel, M. (1991). Oxidation of methyl linoleate encapsulated in amorphous lactose-based food model, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(4), 637-641.
- Simopoulos, A. P. & Cleland, L. G. (2004). Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio: The scientific evidence, *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 17(2), 165-166.
- Stapelfeldt, H., Nielsen, B. R., & Skibsted, L. H. (1997). Effect of treatment, water activity and storage temperature on the oxidative stability of whole milk powder. *International Dairy Journal*, 7, 331-339.
- Stough, C., Downey, L., Silber, B., Lloyd, J., Kure, C., Wesnes, K., & Camfield, D. (2012). The effects of 90-day supplementation with the omega-3 essential fatty acid docosahexaenoic acid (DHA) on cognitive function and visual acuity in a healthy aging population. *Neurobiology of Aging*, 33(4), 824.e1-824.e3.
- Thomas, M. E., Scher, J., Desobry-Banon, S., & Desobry, S. (2004). Milk powders ageing: effect on physical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(5), 297-322.
- Thomsen, M. K., Lauridsen, L., Skibsted, L. H., & Risbo, J. (2005). Temperature effect on lactose crystallization, maillard reactions, and lipid oxidation in whole milk powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7082-7090.
- Upadhyay, N., Goyal, A., Kumar, A., Ghai, D. L., & Singh, R. (2014). Preservation of milk and milk products for analytical purposes, *Food Reviews International*, 30, 203–224.
- Yazdanpanah, N., & Langrish, T. A. (2013). Comparative study of deteriorative changes in the ageing of milk powder. *Journal of Food Engineering*, 114(1), 14-21.
- Zhong, Y., Wu, Y., Zheng, Y., Zhu, H., Liu, Z., Jiao, S. (2017). Assessment of radio frequency heating on composition, microstructure, flowability and rehydration characteristics of milk powder. *Food Science and Technology*, 37(4), 544-551.

4. CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO SENSORIAL DE LEITE EM PÓ ENRIQUECIDO COM ÔMEGA 3 EM DIFERENTES EMBALAGENS COMERCIAIS: ESTABILIDADE EM CONDIÇÕES ACELERADAS DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA

O artigo será submetido a uma revista de alto impacto na área de Tecnologia de Alimentos

RESUMO

Métodos clássicos de análise sensorial apresentam vocabulário único para atribuição de características aos alimentos e não levam em consideração a variação individual na percepção de distintos atributos. A avaliação sensorial através do método Perfil Livre permite aos provadores desenvolverem seus próprios vocabulários sobre as percepções sensoriais e, também adaptarem as escalas às suas percepções. Este trabalho avaliou sensorialmente o produto leite em pó enriquecido com ômega 3 acondicionado em 4 diferentes sistemas de embalagens e estocado à alta umidade e/ou temperatura (34 °C/ 83% UR e 43 °C) durante 15 semanas. Tanto o produto em pó quanto a bebida “fonte de ômega 3”, reconstituída através da adição de água ao produto em pó foram avaliados. Análises sensoriais foram conduzidas previamente para a escolha do fornecedor e para a dosagem da microcápsula de ômega 3 na formulação do produto. O produto leite em pó integral enriquecido com microcápsulas de ômega 3 teve boa aceitação pelos consumidores, em concentrações limitadas. A 34 °C/ 83% de UR, o produto em embalagem com alta permeabilidade ao vapor d'água e ao oxigênio (polipropileno biorientado e laminado com polipropileno, BOPP/PP) obteve 95% de rejeição na nona semana de estudo, em função do escurecimento não enzimático e separação de fases observados. A 43 °C, o produto nas latas metálica e multifoliada foram 100% rejeitados na nona semana sendo a deterioração dos mesmos atribuídas à cristalização da lactose, que liberou água para que o escurecimento não enzimático ocorresse, levando à rejeição sensorial do produto.

4.1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de produtos enriquecidos com ácidos graxos ômega 3 provenientes de óleos de peixes marinhos, ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA), tem desafiado a indústria na busca de alternativas que

permitam a incorporação destes lipídios a alimentos, sem agregar características sensoriais desagradáveis.

EPA e DHA exercem funções relevantes no desenvolvimento cognitivo e visual (KAAR et al, 2011; LUCHTMAN; SONG, 2013) e atuam na prevenção e tratamento de uma série de desordens metabólicas (YASHODHARA et al., 2009; DECKELBAUM; TORREJON, 2012; SWANSON et al., 2012). O efeito protetor sobre as doenças cardiovasculares e o papel na mediação de processos inflamatórios e imunogênicos são reconhecidos na comunidade científica (RUXTON et al., 2004), além disso, o consumo de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 (n-3 PUFA) mostrou diminuição no risco de depressão e retardo da degeneração neurológica associada ao envelhecimento (KARR et al., 2011; LUCHTMAN; SONG, 2013).

A fortificação de alimentos com óleo de peixe pode prejudicar a qualidade sensorial dos produtos fortificados, contudo, o efeito sensorial depende da quantidade de óleo adicionado e do tipo de alimento (KOLANOWSKI; JAWORSKA; WEIXBRODT, 2007). Os n-3 PUFA são susceptíveis à oxidação lipídica devido ao alto grau de insaturações presentes em suas moléculas, dando origem a indesejáveis “off-flavours” que remetem a ranço e peixe (LET et al., 2003).

A microencapsulação de óleo de peixe visa minimizar os efeitos da exposição dos ácidos graxos ao oxigênio (KAUSHIK et al., 2015), além de facilitar a incorporação a alimentos em pó.

Produtos lácteos funcionais tem alta aceitabilidade por consumidores em função do sabor, aroma e alto valor nutritivo destes alimentos (SHIBY; MISHRA, 2013). Para indivíduos que não possuem o hábito de consumir peixe, produtos lácteos fortificados com óleo de peixe podem representar um importante veículo de EPA e DHA garantindo uma ingestão adequada destes n-3 PUFA (KOLANOWSKI; JAWORSKA; WEIXBRODT, 2007).

Métodos clássicos de análise sensorial consideram um vocabulário único para atribuição de características aos alimentos, entretanto, alguns autores defendem que existe uma variação individual na percepção de distintos atributos que não deve ser evitada. Neste âmbito, a análise de Perfil Livre pode representar

uma boa alternativa a este problema, pois os provadores utilizam diferentes termos descritivos.

O Perfil Livre é uma técnica sensorial descritiva proposta por Williams e Langron (1984). Os autores assumem que os provadores não diferem na forma como percebem as características sensoriais, mas sim, na forma como as descrevem. Esta técnica permite diminuir ou até eliminar as sessões de treinamento. A exigência com os provadores é que eles sejam objetivos e capazes de usar escalas de intensidade e desenvolver lista de atributos e vocabulários consistentes. Permite-se aos provadores desenvolverem seus próprios vocabulários sobre as percepções sensoriais e, também adaptarem as escalas às suas percepções.

O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações sensoriais do produto leite em pó enriquecido com ômega 3 e da bebida “fonte de ômega 3”, reconstituída através da adição de água ao produto em pó, durante estudo de estabilidade à alta umidade e/ou temperatura. O produto em pó foi acondicionado em 4 diferentes sistemas de embalagens e estocado à 34 °C/ 83% de UR e a 43 °C por 15 semanas.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Material

O leite em pó integral foi fornecido pela empresa Itambé, Minas Gerais, Brasil.

Microcápsulas de ômega 3 foram obtidas de dois diferentes fornecedores de ingredientes alimentícios.

Após seleção do fornecedor da microcápsula de ômega 3 e definição da concentração de EPA e DHA para a formulação do produto, as amostras elaboradas a partir da mistura dos dois ingredientes foram acondicionadas em 4 diferentes sistemas de embalagens:

- Embalagem flexível de polietileno tereftalato metalizado com alumínio e laminado com polietileno de baixa densidade (PETmet/PEBD), termosselada. Essa embalagem apresentava taxa de permeabilidade ao oxigênio (TPO₂) igual a 0,731 ± 0,06 cm³/m².dia e taxa de permeabilidade ao vapor d'água (TPVA) igual 1,189 ± 0,10 g água m⁻².dia⁻¹;

- Embalagem flexível de polipropileno biorientado e laminado com polipropileno (BOPP/PP), termosselada. Essa embalagem apresentava TPO₂ igual a 1197 ± 10,53 mL (CNTP) m⁻².dia⁻¹ e TPVA igual a 4,160 ± 0,7 g água m⁻².dia⁻¹;

- Lata metálica de três peças (corpo, fundo e tampa compostos por folha de flandres e tampa selada com folha de alumínio);

- Lata multifoliada de três peças (fundo e tampa de folha de flandres e corpo formado pela combinação de papel, alumínio e plástico, tampa selada com folha de alumínio).

A TPO₂ (<0,005 cm³.embalagem⁻¹.dia⁻¹) e TPVA (<0,0001 g água.embalagem⁻¹.dia⁻¹) de ambas latas apresentavam valores inferiores aos limites de detecção do equipamento.

A análise de TPO₂ foi realizada a 23 °C e 1 atm de gradiente de pressão parcial de gás, enquanto que os resultados de TPVA foram obtidos a 38 °C/ 90% UR.

4.2.2. Análise descritiva para a seleção de fornecedores de microcápsulas de ômega 3

O produto formulado a partir da incorporação das microcápsulas de cada fornecedor (denominados A e B) ao leite em pó integral foi avaliado pelo método de características sensoriais (MEILGAARD; CARR; CIVILLE, 2006; ABNT NBR ISO 5492, 2014).

A dosagem utilizada (9,5 mg de EPA e DHA em 100 mL do produto pronto para consumo) foi decidida após breve pesquisa de rótulos de compostos lácteos

comercialmente disponíveis no Brasil e adicionados desses ácidos graxos poli-insaturados.

O produto foi analisado em pó e reconstituído com a adição de água.

O produto constituído apenas por leite em pó integral sem microcápsulas de ômega 3, também foi avaliado, tanto na forma de pó, como reconstituído com a adição de água.

A análise descritiva foi feita de forma consensual, segundo a ISO 13299:2016, por equipe de cinco avaliadores do LAFISE-CCQA/ITAL e CETEA/ITAL, previamente selecionados quanto à acuidade sensorial, a qual levantou os atributos de aroma dos produtos em pó (antes do preparo), aroma e sabor dos produtos reconstituídos. Os resultados foram registrados em uma escala de 0 a 10 quantificando a intensidade das características. Nesta escala, o valor 0 correspondeu a inexistente ou extremamente fraco, o valor 5, a moderado e o valor 10, a extremamente forte.

4.2.3. Teste com consumidores para a definição da concentração de microcápsulas de ômega 3 adicionadas ao leite em pó integral

Após a seleção do fornecedor de microcápsulas de ômega 3, foram empregados testes afetivos com consumidores, segundo ISO 11136:2014, para definição da concentração de ácidos graxos EPA e DHA adicionados ao leite em pó integral.

A legislação brasileira RDC 54/2012 determina que o produto contenha um mínimo de 40 mg da soma de EPA e DHA, por 100 g ou 100 mL em pratos preparados, conforme o caso (BRASIL, 2012), para que o mesmo seja considerado “fonte de ômega 3”.

Os seguintes produtos foram avaliados em três diferentes amostras:

- Produto fonte de ômega 3 (com mínimo de 40 mg da somatória de EPA e DHA por 100 mL do produto pronto para consumo),

- Produto contém ômega 3 (com mínimo de 20 mg da somatória de EPA e DHA por 100 mL do produto pronto para consumo),

- Produto contém ômega 3 (com mínimo de 9,5 mg da somatória de EPA e DHA por 100 mL do produto pronto para consumo).

Uma quarta amostra de leite em pó integral sem adição de microcápsulas de ômega 3 também foi fornecida aos consumidores.

Tanto os produtos em pó quanto os produtos reconstituídos foram avaliados. O produto reconstituído foi oferecido em copos plásticos descartáveis de 80 mL.

Um total de 67 consumidores de leite foram selecionados sem restrições quanto ao sexo, idade e frequência de consumo, das classes sociais A/B/C, segundo o Critério Padrão de Classificação Econômica Brasil 2015 (ABEP, 2015).

As amostras codificadas com algarismos de três dígitos e aleatorizadas foram apresentadas aos consumidores para avaliarem o quanto gostam ou desgostam de cada uma delas. O teste foi conduzido em cabines individuais equipadas com o sistema computadorizado Compusense Five versão 5.6 (Compusense Inc., Guelph, Ontario, Canada) para coleta dos dados. Os consumidores utilizaram a escala hedônica (MEILGAARD; CARR; CIVILLE, 2006) de 9 pontos (onde 9 = gostei muitíssimo, 5 = não gostei nem desgostei e 1 = desgostei muitíssimo) para classificar as amostras.

Além do teste afetivo, foi aplicada a avaliação descritiva CATA (Check All That Apply) (MEYNER; CASTURA, 2014), a qual solicita aos consumidores que escolhessem em uma lista de 21 descritores (Tabela 4.1), quais destes estavam presentes e caracterizavam o produto.

Tabela 4.1. Descritores utilizados na avaliação descritiva CATA

- | | | |
|---|--|---|
| <input type="checkbox"/> Amargo | <input type="checkbox"/> Fica um sabor agradável na boca | <input type="checkbox"/> Sabor de leite |
| <input type="checkbox"/> Doçura na medida certa | <input type="checkbox"/> Fica um sabor estranho na boca | <input type="checkbox"/> cozido/fervido |
| <input type="checkbox"/> Muito doce | <input type="checkbox"/> Aroma estranho | <input type="checkbox"/> Aguado |
| <input type="checkbox"/> Pouco doce | <input type="checkbox"/> Aroma característico de leite em pó | <input type="checkbox"/> Sabor forte |
| <input type="checkbox"/> Sabor estranho | <input type="checkbox"/> Aroma de leite velho / oxidado | <input type="checkbox"/> Sabor fraco |
| <input type="checkbox"/> Sabor característico de leite em pó | <input type="checkbox"/> Sabor caramelizado | <input type="checkbox"/> Azedo |
| <input type="checkbox"/> Sabor característico de leite fresco | <input type="checkbox"/> Um pouco Salgado | <input type="checkbox"/> Gorduroso |

Por último, foi empregado o teste de ordenação quanto à preferência de acordo com a ISO 11136:2014 (MEILGAARD et al., 2006), onde os provadores ordenaram as amostras segundo suas preferências.

Os dados relativos às escalas hedônicas foram submetidos à análise estatística de variância e teste de Tukey para comparação de médias. Os dados relativos ao teste de ordenação foram submetidos aos testes de Friedman e Fisher e os dados coletados pelo CATA foram avaliados por teste de Cochran. A análise de penalidades foi aplicada aos dados relativos à aceitabilidade de modo geral e à avaliação CATA. Esta análise permitiu a comparação das notas de aceitabilidade dadas pelo grupo que percebeu a presença versus a nota dada pelo grupo que não percebeu o atributo da lista da avaliação CATA. O programa XLSTAT versão 18.03.35937 (Addinsoft, EUA) foi utilizado para as análises estatísticas.

4.2.4. Preparo e acondicionamento das amostras

Após a definição da concentração de EPA e DHA, o produto foi formulado com 96,9% de leite em pó integral e 3,1% de microcápsulas de ômega 3.

O produto acondicionado nas embalagens foi armazenado nas seguintes condições de temperatura e umidade relativa (UR):

- 34 ± 1 °C e $83 \pm 5\%$ de UR e;
- 43 ± 1 °C e UR variável não controlada, porém constantemente monitorada, apresentando variação de 16 a 57,8%.

4.2.5. Análises microbiológicas

Amostras do produto leite em pó enriquecido com ômega 3 foram submetidas a análises microbiológicas logo após a formulação do produto (tempo zero) e ao final do estudo (15ª semana).

Após preparo e diluição das amostras (DOWNES; ITO, 2001), foram determinados os microrganismos aeróbios mesófilos (LAIRD et. al, 2004), Coliformes a 30 °C (ISO 4831:2006), Coliformes a 45 °C (ISO 7251:2005). A quantificação de estafilococos coagulase positiva (HENNING; FLOWERS; REISER; RYSER, 2004) e a detecção de *Salmonella spp* (presença/ ausência em 25 g, ISO 6785/ IDF 93:2001) também foram realizadas.

4.2.6. Avaliação sensorial do produto durante estudo de estabilidade

4.2.6.1. Perfil Livre

Foram recrutados 19 avaliadores previamente selecionados quanto a acuidade sensorial segundo a ISO 8586:2012, que costumam consumir leite e apresentaram disponibilidade de tempo no período de realização do estudo de estabilidade.

Para o desenvolvimento da terminologia descritiva do Perfil Livre, amostras de leite em pó integral e de leite reconstituído, similares as que seriam provadas ao longo do estudo, foram apresentadas aos avaliadores. Os avaliadores tiveram liberdade para criarem suas próprias listas de descritores para os atributos de aspecto e aroma do pó e aspecto, aroma, sensação na boca e sabor do leite reconstituído.

A partir da lista gerada por cada avaliador, foram elaboradas as fichas individuais de avaliação, às quais foram associadas uma escala de intensidade não-estruturada de 9 cm.

Ao início do estudo foram analisadas 4 amostras de cada embalagem. A partir da 3ª semana, até um total de 15 semanas, os avaliadores analisaram 8 amostras por sessão, sendo que cada amostra representava um tipo de embalagem (BOPP/PP, PETmet/PEBD, lata metálica e lata multifoliada) e uma condição de estocagem (34 °C/ 83% de UR, 43 °C). A análise de amostras com percentual de rejeição maior do que 55% em um período não foram continuadas nos períodos seguintes.

Os resultados de cada provador foram alocados em uma matriz (atributos nas colunas e amostras nas linhas) e foram analisadas por Análise Procrustes Generalizada com o auxílio do programa XLSTAT versão 18.03.35937 (Addinsoft, EUA).

4.2.6.2. Qualidade Global

Foi realizada calibração dos avaliadores para uso coerente da escala de avaliação da qualidade global de leite em pó adicionado de microcápsulas de ômega 3. A ficha empregada na avaliação incluía, além desta escala de avaliação da qualidade global de leite em pó, a questão se este avaliador consumiria ou não o produto. Durante o estudo de estabilidade, as amostras foram analisadas no tempo inicial, com 3, 6, 9, 12 e 15 semanas.

Os dados da escala de qualidade global obtidos da avaliação sensorial foram examinados por análise de variância (ANOVA) e teste de média de Tukey e Análise de agrupamentos hierárquicos aglomerativos (AHC) com uso do programa XLSTAT versão 18.03.35937 (Addinsoft, EUA).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Análise Descritiva para a seleção de fornecedores de microcápsulas de ômega 3

O produto formulado com leite em pó integral e microcápsulas de ômega 3 do fornecedor A apresentou maior similaridade de notas de caracteres às atribuídas ao leite em pó integral sem adição de microcápsulas (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Notas de caracteres após consenso

Atributos		Amostras		
		Leite em pó integral	Produto formulado Fornecedor A	Produto formulado Fornecedor B
Aroma do produto em pó	Característico de leite em pó	8	8-9	7-8
	Peixe	0	0	0
Aroma do produto reconstituído	Característico de leite em pó reconstituído	8	8	6
	Peixe	0	0	0
Sabor do produto reconstituído	Característico de leite em pó reconstituído	9	8-9	6
	Peixe	0	0	5

* Valor 0 correspondeu a inexistente ou extremamente fraco, o valor 5, a moderado e o valor 10, a extremamente forte

O produto formulado com microcápsulas do fornecedor B apresentou moderado sabor “peixe” (5) no produto reconstituído, enquanto que essa característica não foi constatada no produto formulado com microcápsulas do fornecedor A, o que fez com que as microcápsulas de ômega 3 do fornecedor A fossem as selecionadas para compor o produto.

Após a definição do fornecedor das microcápsulas, testes afetivos com consumidores foram realizados para validação da concentração de ácidos graxos EPA e DHA adicionados ao leite em pó integral.

4.3.2. Teste com consumidor para a definição da concentração de microcápsulas de ômega 3 adicionadas ao leite em pó integral

Do total de consumidores de leite em geral que participaram deste estudo, 16 homens e 51 mulheres, avaliaram as amostras. As características quanto à faixa etária, classe social e frequência de consumo de leite e tipo de leite consumido, são apresentadas nas Figuras 4.1 e 4.2.

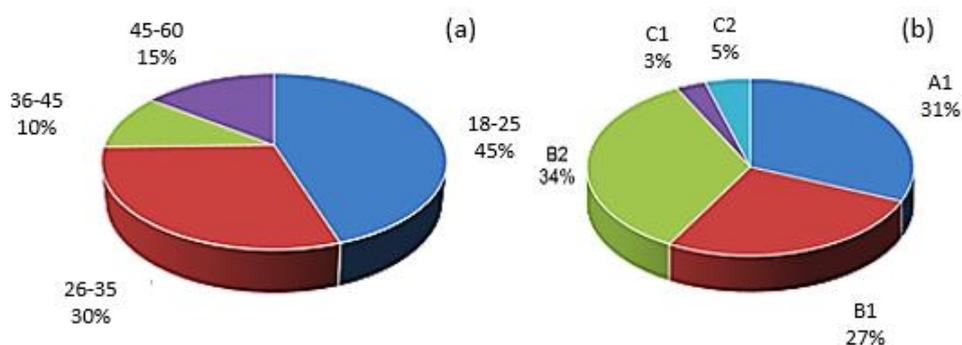


Figura 4.1. Faixa etária (a) e classe social (b) do grupo de consumidores recrutado para avaliação das amostras

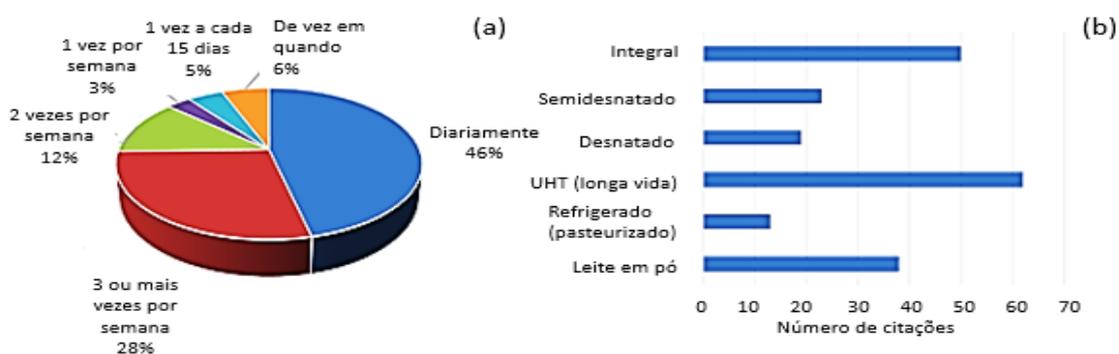


Figura 4.2. Frequência de consumo de leite (a) e tipo de leite consumido (b).

Os resultados médios e as porcentagens de aceitação (notas de 6 a 9), indiferença (nota 5) e rejeição (nota 1 a 4) obtidos na avaliação da aceitabilidade do aroma, sabor e aceitabilidade de modo geral são apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Resultados médios obtidos na avaliação da aceitabilidade do leite e porcentagens de aceitação, indiferença e rejeição.

	Leite em pó	Produto "fonte de ômega 3" (40mg/100mL)	Produto "contém ômega 3" (20mg/100mL)	Produto "contém ômega 3" (9,5mg/100mL)
Aroma ¹	7,3 (1,1) a	7,3 (1,1) a	7,7 (0,8) a	7,6 (1,1) a
Rejeição (%)	0,0	1,5	0,0	1,5
Indiferença (%)	7,5	4,5	0,0	3,0
Aceitação (%)	92,5	94,0	100,0	95,5
Sabor ¹	7,0 (1,1) a	6,2 (1,8) b	7,4 (1,2) a	6,9 (1,7) a
Rejeição (%)	3,0	20,9	3,0	10,4
Indiferença (%)	1,5	6,0	3,0	1,5
Aceitação (%)	95,5	73,1	94,0	88,1
Modo geral ¹	6,9 (1,3) ab	6,3 (1,7) b	7,4 (1,2) a	6,9 (1,7) ab
Rejeição (%)	9,0	19,4	3,0	9,0
Indiferença (%)	0,0	3,0	3,0	3,0
Aceitação (%)	91,0	77,6	94,0	88,1
Ordenação ²	162 A	201 B	151 A	156 A

¹ Resultados expressos como média (desvio-padrão) de 67 avaliações. Teste de Tukey - médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

² Resultados expressos como a somatória da classificação dada por cada uma das 67 avaliações. Teste de Fisher - médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

Todas as amostras obtiveram médias entre "gostei" e "gostei muito" na escala utilizada quanto aos atributos avaliados, com exceção do produto "fonte de ômega 3" (40 mg/ 100 mL), com média próxima ao que corresponde a "gostei pouco" quanto ao sabor e à aceitabilidade de modo geral. A aceitação de todas as amostras foi superior a 85% para todos atributos, exceto para a amostra "fonte de ômega 3" (40 mg/ 100 mL), que apresentou aceitação de 77,6%. No teste de ordenação, a amostra "fonte de ômega 3" (40 mg/ 100 mL) foi considerada menos preferida que as demais.

A maior aceitabilidade da amostra "contém ômega 3" na concentração de 20 mg/100 mL para todos os atributos avaliados, inclusive quando comparados à amostra de leite em pó integral sem adição de microcápsulas, permite concluir que

os consumidores foram receptivos ao produto adicionado de microcápsulas de ômega 3.

Quanto aos termos da análise CATA que foram mais citados, todas as amostras foram caracterizadas por mais de 40% dos consumidores como “características de leite em pó” quanto ao aroma e ao sabor. A doçura das três amostras com adição microcápsulas de ômega 3 foram citadas como “na medida certa” e a amostra de leite em pó sem adição de partícula foi citada como “pouco doce” por mais de 30% dos consumidores.

Pela análise de penalidades dos dados da amostra “fonte de ômega 3” (40 mg/ 100 mL), observa-se que o impacto positivo no aumento da aceitabilidade de modo geral foi significativo quando o produto foi considerado com “aroma característico”, “sabor característico” e “doce na medida certa” por 50,8%, 43,3% e 32,8% dos consumidores, respectivamente, com aumento na média de aceitabilidade de modo geral em mais de 1,4 pontos. Porém, observa-se também que, o impacto negativo no decréscimo da aceitabilidade de modo geral foi significativo quando o produto foi considerado com “sabor estranho na boca” por 28,4% dos consumidores, com diminuição na média de aceitabilidade de modo geral em mais de 2,2 pontos.

Embora o produto “fonte de ômega” tenha recebido a pior avaliação no teste de aceitabilidade, foi decidido seguir com esta formulação para o estudo de estabilidade em diferentes embalagens e condições de estocagem. A diferença entre as notas da avaliação de “modo geral” entre as amostras do produto “fonte de ômega 3” e leite em pó integral foi baixa (6,3 e 6,9, respectivamente), ainda que estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Vale ressaltar que os consumidores não estavam habituados ao produto “fonte de ômega 3”, já que não existem alimentos similares comercialmente disponíveis e, portanto, o resultado obtido era esperado.

4.3.3. Análises microbiológicas

Após processamento das amostras para a realização do estudo de estabilidade por 15 semanas, a análise microbiológica em tempo zero foi realizada afim de garantir a segurança do alimento que seria servido aos avaliadores. (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Resultados das análises microbiológicas das amostras em tempo zero e na 15ª semana de armazenagem, nas diferentes condições de estocagem

Tempo/ Condição de estocagem	Amostra	Microrganismos				
		Aeróbios mesófilos (UFC/ g) ^a	Coliformes a 30 °C (NMP/ g) ^b	Coliformes a 45 °C (NMP/g)	Estafilococos coag. positiva (UFC/ g)	<i>Salmonella</i> <i>spp</i> (pres/aus)
Tempo zero/ ambiente	PETmet/PEBD	2,0 x 10 ²	< 3 ^c	< 3 ^c	< 10 ^c	Ausente
	BOPP/PP	1,2 x 10 ²	< 3 ^c	< 3 ^c	< 10 ^c	Ausente
	Lata metálica	1,2 x 10 ²	< 3 ^c	< 3 ^c	< 10 ^c	Ausente
	Lata multif.	2,0 x 10 ²	< 3 ^c	< 3 ^c	< 10 ^c	Ausente
15 semanas/ 34 °C/ 83% de UR	PETmet/PEBD	2,0 x 10 ²	< 3 ^c	< 3 ^c	< 10 ^c	Ausente
	BOPP/PP	3,0 x 10 ²	< 3 ^c	< 3 ^c	< 10 ^c	Ausente
	Lata metálica	1,6 x 10 ²	< 3 ^c	< 3 ^c	< 10 ^c	Ausente
	Lata multif.	1,5 x 10 ²	< 3 ^c	< 3 ^c	< 10 ^c	Ausente
15 semanas/ 43 °C	PETmet/PEBD	1,3 x 10 ²	< 3 ^c	< 3 ^c	< 10 ^c	Ausente
	BOPP/PP	9,0 x 10	< 3 ^c	< 3 ^c	< 10 ^c	Ausente
	Lata metálica	8,0 x 10	< 3 ^c	< 3 ^c	< 10 ^c	Ausente
	Lata multif.	2,0 x 10 ²	< 3 ^c	< 3 ^c	< 10 ^c	Ausente

^a UFC/ g - Unidade formadora de colônias por grama da amostra

^b NMP/ g - Número mais provável por grama da amostra

^c Valor estimado, abaixo do limite de detecção do método

Apenas a amostra em BOPP/PP a 34 °C/ 83% de UR apresentou aumento na contagem de aeróbios mesófilos na 15ª semana, possivelmente em função das condições de temperatura e umidade da câmara de estocagem e pela alta permeabilidade ao vapor d'água e oxigênio da embalagem, que favoreceram o crescimento destes microrganismos. Ainda assim, todas as amostras demonstraram qualidade microbiológica satisfatória e apropriada ao consumo no início (tempo zero) e final (15ª semana) do estudo segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite em Pó (BRASIL, 1997).

4.3.4. Teste com consumidor para a definição da concentração de microcápsulas de ômega 3 adicionadas ao leite em pó integral

Quanto a avaliação sensorial realizada durante o estudo de estabilidade, na nona semana de estocagem a 34 °C/ 83% de UR, o produto em BOPP/PP apresentou redução significativa de qualidade global em relação aos tempos anteriormente avaliados (Figura 4.3a), obteve nota 3,0, inferior ao que corresponde a “regular” na escala utilizada, e demonstrou 95% de rejeição.

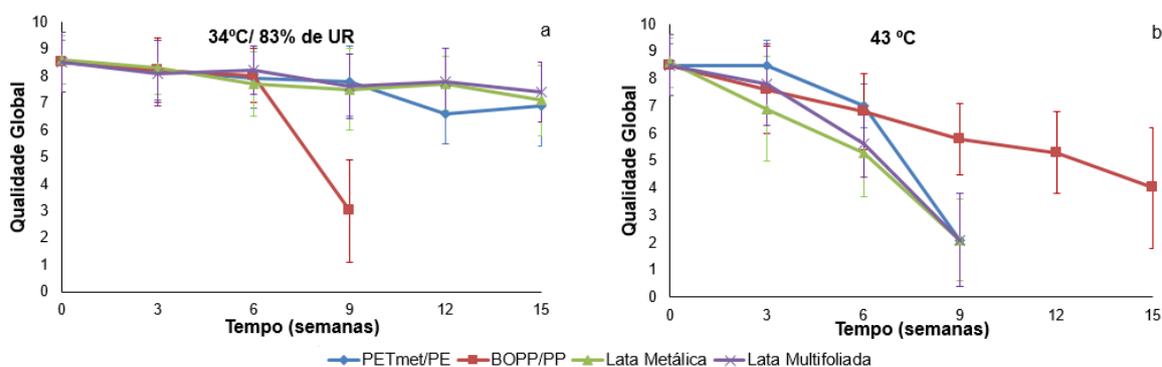


Figura 4.3. Qualidade global avaliada sensorialmente ao longo do tempo nas condições de estocagem de 34 °C/ 83% de UR (a) e 43 °C (b)

A embalagem BOPP/PP confere baixa barreira ao vapor d’água e, conforme descrito na literatura, a temperatura de transição vítrea (T_g) da lactose é reduzida quando o material amorfo é exposto à umidade relativa elevada que permita a incorporação de água (CARPIN et al., 2016).

Sendo a cristalização da lactose um evento caracterizado como “tudo ou nada” (CLARK et al., 2016), acredita-se que o mesmo tenha ocorrido para o produto em BOPP/PP (a 34 °C/ 83% de UR) em algum momento entre a sexta e nona semana de estocagem o que justifica a expressiva redução de qualidade global (de 8,0 para 3,0).

Neste âmbito, a cristalização da lactose associada à contínua incorporação de água ao produto, pode ter favorecido o aumento de A_w na amostra em BOPP/PP e, conseqüentemente, formação de caking, reduzindo a solubilidade do alimento durante a reconstituição.

Na mesma condição de estocagem, os produtos nas latas metálica e multifoliada obtiveram médias “entre bom e muito bom” (variando de 7,1 a 8,6) na escala utilizada em todas as avaliações até 15 semanas. O produto em embalagem PETmet/PEBD obteve médias “entre bom e muito bom” (variando de 7,8 a 8,5) na escala utilizada do início até 9 semanas, porém, a partir da décima segunda semana, a média do produto foi ligeiramente abaixo do que corresponde a “bom” (variando de 6,6 a 6,9) na escala utilizada e apresentou perda de qualidade significativa em relação ao início do estudo.

A 43 °C, os produtos nas embalagens PETmet/PEBD, lata metálica e lata multifoliada avaliados com 9 semanas de estocagem apresentaram além de perda significativa de qualidade global, uma nota inferior a “regular” (2,1) na escala utilizada, bem como uma rejeição de 100% dos provadores. Já o produto na embalagem BOPP/PP obteve notas correspondentes a “entre regular e bom” e “regular” e rejeição de 31,6 e 52,6% nas avaliações com 9 e 12 semanas, respectivamente. Ao final o estudo, 73,7% dos provadores não consumiriam mais o produto em BOPP/PP, sendo a nota correspondente a “ruim”.

Assim como observado para o produto em BOPP/PP a 34 °C/ 83% de UR, a perda de qualidade global dos produtos nas latas a 43 °C também pode ser atribuída ao fenômeno de cristalização da lactose. A 43 °C, a transição vítrea da lactose fez com que a água ligada à matriz amorfa do açúcar fosse liberada, favorecendo o escurecimento não enzimático e resultando em um produto de baixa solubilidade e alta rejeição dos avaliadores. Thomsen et al. (2005) também evidenciaram aumento de atividade de água em leite em pó acondicionado em frascos de vidro hermeticamente fechados e estocados a temperatura de 45 °C por 147 dias. Os autores atribuíram o aumento de atividade de água à cristalização da lactose.

A avaliação dos conjuntos de resultados de cada condição de estocagem com uso da análise de agrupamentos hierárquicos aglomerativos (AHC) por

dissimilaridade com uso da distância Euclidiana e método Ward resultou nos dendogramas apresentado nas Figuras 4.4 e 4.5, nos quais observa-se a formação de 4 agrupamentos.

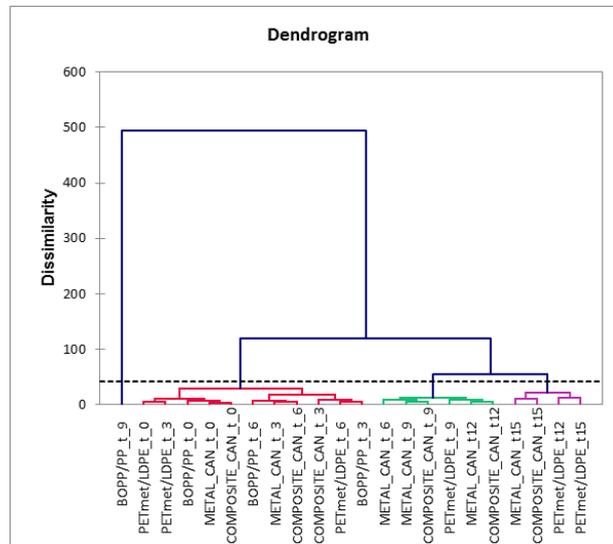


Figura 4.4. Dendograma resultante da análise de agrupamentos hierárquicos aglomerativos (AHC) por dissimilaridade para a condição de estocagem a 34 °C/ 83% de UR

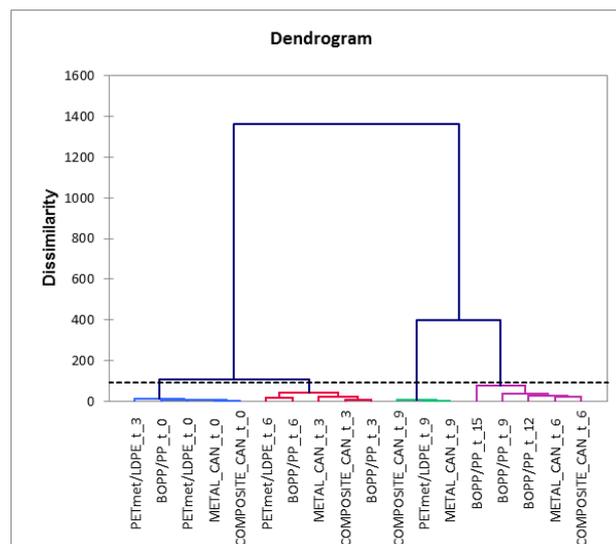


Figura 4.5. Dendograma resultante da análise de agrupamentos hierárquicos aglomerativos (AHC) por dissimilaridade para a condição de estocagem a 43 °C

A 34 °C/ 83% de UR, a amostra em BOPP/PP na 9ª semana não se agrupou às demais amostras e representou o pior desempenho nesta condição de armazenagem (Figura 4.4). O grupo seguinte, representado pela cor vermelha, foi formado por produtos que obtiveram melhor desempenho, com médias de qualidade “entre bom e muito bom”. O grupo representado pela cor verde obteve bom desempenho, com médias ligeiramente acima ao que corresponde a “bom”. Já o grupo representado pela cor púrpura foi composto por amostras cujas médias correspondem a “bom”. Com exceção da amostra em BOPP/PP que obteve 94,7% de rejeição na 9ª semana, todas as demais amostras obtiveram um máximo de rejeição de 5,3% até o final do estudo.

A 43 °C, o grupo representado pela cor azul obteve desempenho superior às demais amostras desta mesma condição de estocagem, apresentando médias “entre bom e muito bom”, e nenhuma amostra foi rejeitada. O grupo representado pela cor vermelha apresentou média correspondente a “bom” e rejeição variando de 5,3 a 15,8%, enquanto que as amostras agrupadas pela cor púrpura, apresentaram médias correspondentes a “regular” e rejeição acima de 31,6%. O pior desempenho foi observado nas amostras agrupadas em cor verde, cujas médias demonstraram valores entre “ruim e muito ruim” e 100% de rejeição.

A análise dos resultados de Perfil Livre demonstrou que a variância explicada em duas dimensões foi de 70,37% nas amostras estocadas a 34 °C/ 83% de UR (Figura 4.5, a e b) e 81,74% nas amostras estocadas a 43 °C (Figura 4.6, a e b). Outros trabalhos que utilizaram a técnica de Perfil Livre para avaliação sensorial de alimentos demonstraram a necessidade de mais dimensões para explicação obtenção de uma configuração de consenso. Em um trabalho realizado por Richter et al. (2010), apenas 38% da variabilidade observada foi explicada por Perfil Livre. Vit, Deliza e Pérez (2011) aplicaram a técnica para avaliação sensorial de mel e 64,2% das explicações foram atribuídas ao total de duas dimensões. Desta forma, os percentuais de 70,37% e 81,74% de explicações obtidas em duas dimensões, foram considerados satisfatórios.

O máximo de atributos diferentes descritos pelos analistas para o produto em pó foram: 5 para aspecto (A1 a A5) e 7 para aroma (B1 a B7). Para a bebida reconstituída, o máximo de atributos diferentes descritos pelos analistas foram: 6

para aspecto (C1 a C6), 7 para aroma (D1 a D7), 6 para sensação na boca (E1 a E7) e 13 para sabor (F1 a F13). Na Tabela 4.5 os atributos com alta correlação ($R^2 > 0,8$ ou $R^2 < -0,8$) na primeira dimensão foram enumerados, correspondendo à explicação da maior variabilidade observada.

Tabela 4.5. Atributos de maior correlação ($R^2 > 0,8$ ou $R^2 < -0,8$) nas condições de estocagem 34 °C/ 83% de UR e 43 °C

Atributo	Condição de estocagem		
	34 °C/ 83% de UR	43 °C	
	Primeira dimensão	Primeira dimensão	Segunda dimensão
Aspecto do pó (A)	A1: Cor (-0,86) A5: partículas laranjas (-0,85)	A1: Cor (-0,97) A4: característico (-0,95) A5: partículas laranjas (-0,88)	-
Aroma do pó (B)	-	B1: característico (-0,95) B2: doce (-0,92) B3: velho, ranço (0,86) B5: estranho (0,81) B6: intenso (0,87)	-
Aspecto da bebida reconstituída (C)	C1: cor (-0,87) C2: dissolução (-0,88) C4: separação em fases (-0,94)	C1: cor (0,97) C2: dissolução (0,93) C4: separação em fases (0,96) C5: característico (-0,93) C6: espuma, bolhas (0,82)	-
Aroma da bebida reconstituída (D)	D1: característico (0,84)	D1: característico (-0,94) D3: doce (0,84)	-
Sensação na boca da bebida reconstituída (E)	E1: encorpado (0,81) E3: sensação de pó (-0,92) E6: grumos (-0,94)	E1: encorpado (-0,89) E3: sensação de pó (0,90) E6: grumos (0,92)	-
Sabor da bebida reconstituída (F)	F9: estranho (-0,84)	F1: característico (-0,97) F2: velho (0,94) F5: leite integral (-0,90)	F9: estranho (-0,91) F12: sabor residual (-0,95)

O valor entre parênteses representa R^2

A metodologia de Perfil Livre permite verificar as semelhanças entre as características de cada amostra através da proximidade entre as mesmas nas dimensões analisadas, além de correlacionar os atributos com as referidas amostras observando a configuração de consenso nas dimensões de maior explicação com os atributos de alta correlação positiva e negativa (MARCELLINI, 2005)

Nos gráficos demonstrados na Figura 4.6 (a e b), referentes às amostras estocadas a 34 °C/ 83% de UR, é possível observar que a amostra em BOPP/PP na 9ª semana de armazenagem se difere de todas as demais. Este resultado condiz

com a reprovação dessa amostra neste período de avaliação, quando a mesma obteve nota de qualidade global 3,0 e 94,7% de rejeição. Os atributos de alta correlação ($R^2 > 0,8$ ou $R^2 < -0,8$) que definiram essa amostra foram cor do pó, cor, dissolução e separação de fases do leite reconstituído, sensação na boca de pó e grumos do leite reconstituído.

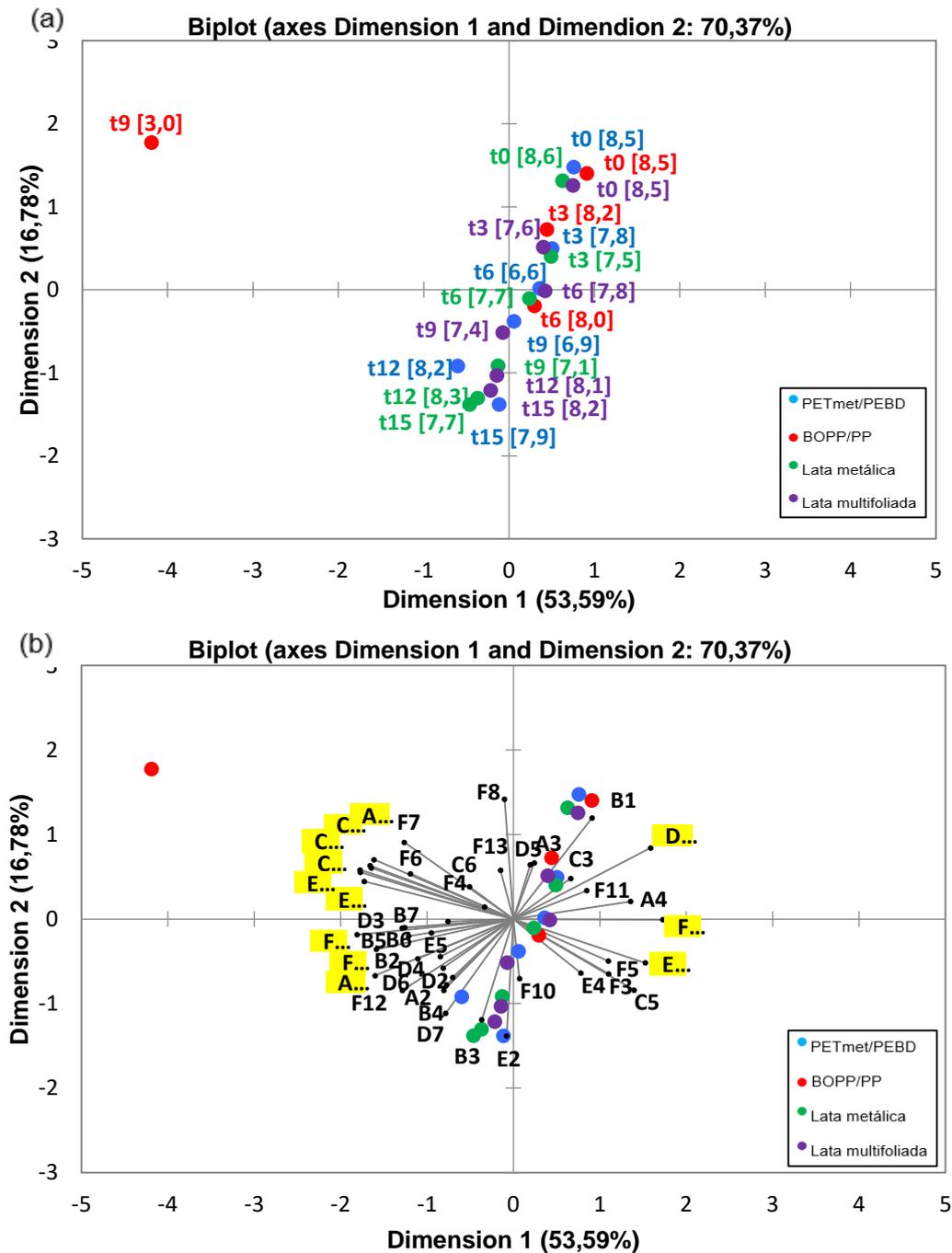


Figura 4.6. Configuração em duas dimensões do consenso de análises sensoriais de Perfil Livre das amostras de leite e pó enriquecido com ômega 3. (a) a letra “t” seguida de número

significa o tempo em que a análise foi realizada (zero, 3 semanas, 6 semanas...). O valor entre colchetes representa a nota de qualidade global (média) obtida pela amostra no respectivo tempo. (b) letras representam aspecto (A) e aroma (B) do pó; aspecto (C), aroma (D), sensação na boca (E) e sabor do leite reconstituído (F). Números diferentes sucedendo as letras representam descritivos diferentes. Descritivos destacados em amarelo apresentam $R^2 > 0,8$ ou $R^2 < -0,8$ na primeira dimensão. Condição de estocagem 34 °C/ 83% de UR.

Nesta condição de estocagem, as amostras em tempo zero, até a terceira ou sexta semanas, apresentaram baixa dispersão na dimensão 1 que explica 53,59% dos resultados. A dimensão 2 demonstra uma maior dispersão das amostras, contudo, a mesma explica apenas 16,78% dos resultados e não houve nenhum atributo de alta correlação nesta dimensão ($R^2 > 0,8$ ou $R^2 < -0,8$), desta forma, essa dispersão das amostras na dimensão 2 não foi considerada relevante para diferenciação das amostras.

As amostras estocadas a 43 °C, representadas nos gráficos da Figura 4.7 (a e b) demonstraram 72,50% de explicações na dimensão 1. Embora a segunda dimensão tenha representado apenas 9,24% das explicações, os atributos de sabor do leite reconstituído, estranho e residual tiveram alta correlação ($R^2 > 0,8$ ou $R^2 < -0,8$) e foram atribuídos principalmente às amostras em BOPP/PP na 9^a, 12^a e 15^a semanas de estocagem e as amostras nas latas metálica e multifoliada na 6^a semana de estocagem. Essas amostras representam o mesmo agrupamento do dendograma representado na Figura 4.4, justificando a similaridade observada em Perfil Livre.

Nesta mesma condição de estocagem, os atributos melhor correlacionados ($R^2 > 0,8$ ou $R^2 < -0,8$) aos produtos nas latas metálica e multifoliada e em PETmet/PEBD na 9^a semana de estocagem, quando essas amostras apresentaram 100% de rejeição dos avaliadores, foram: cor do produto em pó e dissolução, separação em fases e formação de bolhas, espuma na bebida reconstituída.

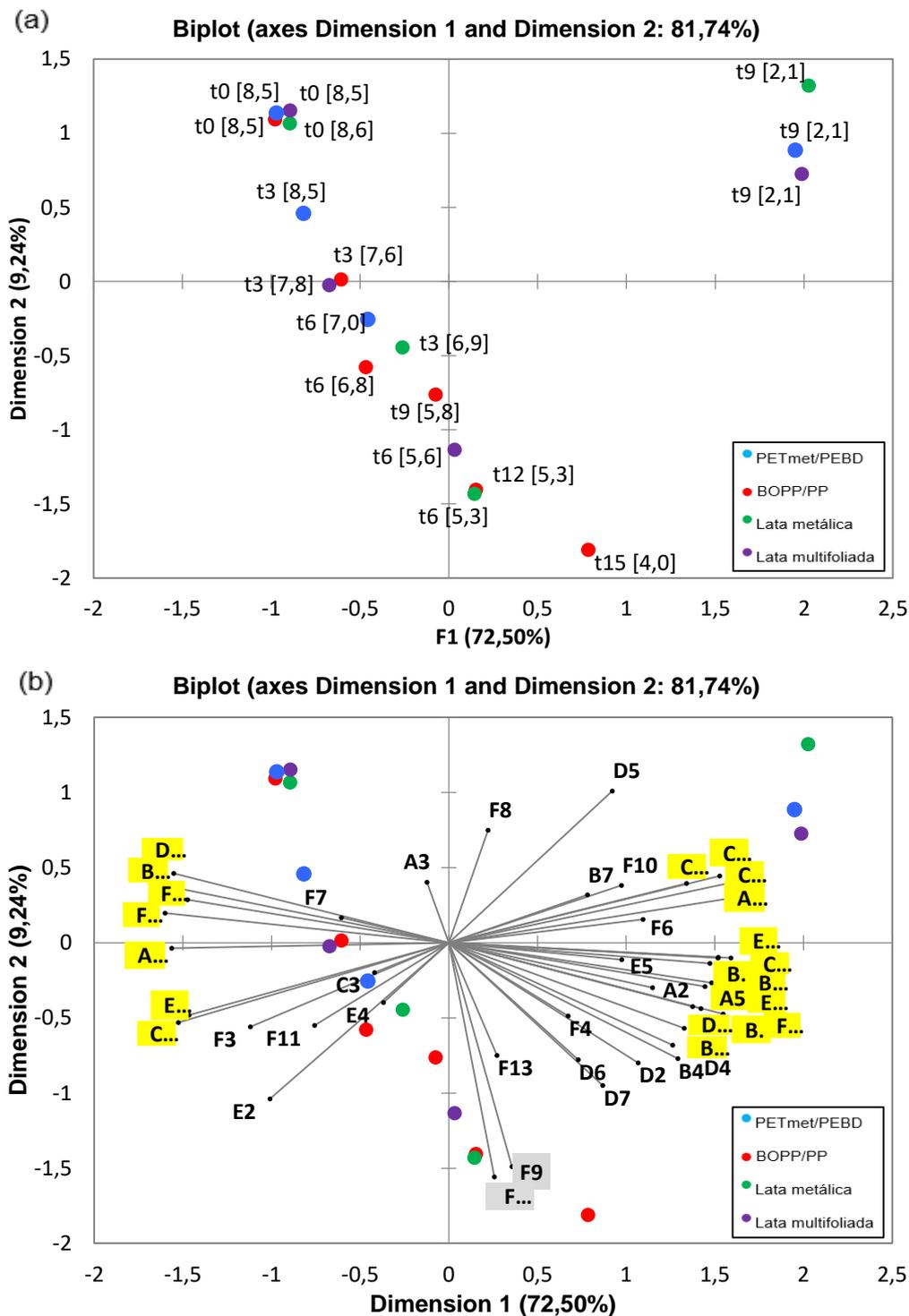


Figura 4.7. Configuração em duas dimensões do consenso de análises sensoriais de Perfil Livre das amostras de leite e pó enriquecido com ômega 3. (a) a letra “t” seguida de número significa o tempo em que a análise foi realizada (zero, 3 semanas, 6 semanas...). O valor entre colchetes representa a nota de qualidade global (média) obtida pela amostra no respectivo tempo. (b) letras representam aspecto (A) e aroma (B) do pó; aspecto (C), aroma (D), sensação na boca (E) e sabor do leite reconstituído (F). Números diferentes sucedendo as letras representam descritivos diferentes. Descritivos destacados em amarelo apresentam $R^2 > 0,8$ ou $R^2 < -0,8$ na primeira dimensão. Descritivos destacados em cinza apresentam $R^2 > 0,8$ ou $R^2 < -0,8$ na segunda dimensão. Condição de estocagem 43 °C.

Ainda que algumas amostras não tenham sido avaliadas sensorialmente até a 15ª semana de estocagem devido ao alto percentual de rejeição em semanas anteriores, os produtos foram reconstituídos ao final do estudo a partir de amostras das 4 embalagens armazenadas a 34 °C/ 83% de UR (Figura 4.8A) e das 4 embalagens a 43 °C (Figura 4.8B).



Figura 4.8. Amostras dos produtos reconstituídos após 15 semanas de armazenagem a 34 °C/ 83% de UR (A) e 43 °C (B), onde 1 = amostra em lata multifoliada, 2 = amostra em lata metálica, 3 = amostra em PETmet/PEBD e 4 = amostra em BOPP/PP.

A amostra em BOPP/PP (Figura 4.8A-4) a 34 °C/ 83% de UR e as amostras em latas multifoliada (Figura 4.8B-1) e metálica (Figura 4.8B-2) a 43 °C apresentaram coloração escurecida e separação de fases, correspondendo aos demais resultados obtidos.

A 43 °C, a amostra em PETmet/PEBD (Figura 4.8B-3) não condiz com os resultados sensoriais obtidos (amostra rejeitada na 9ª semana de estocagem, com nota de qualidade global igual a 2,1), visto que a amostra representada na Figura

4.8B-3 não apresentava diluição prejudicada, separação de fases ou coloração escura.

A amostra analisada sensorialmente na 9ª semana de estocagem representava um “outlier”. Infelizmente este desvio não identificado a tempo de uma ação corretiva (repetição da análise com amostra que melhor representasse o lote do estudo).

4.4. CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que o enriquecimento de leite em pó integral com microcápsulas de ômega 3 é sensorialmente aceito por consumidores, contudo, em concentrações limitadas. O produto leite em pó enriquecido com ômega 3 e estocado em temperatura moderada e alta umidade (34 °C/ 83% de UR) deve ser acondicionado em embalagens que ofereçam barreira ao vapor d'água, caso contrário, o mesmo apresentará rejeição sensorial em função do escurecimento não enzimático e separação de fases que podem ocorrer, assim como o observado para o produto em BOPP/PP. Em temperatura elevada (43 °C), mesmo o produto em embalagens com alta barreira ao vapor d'água e oxigênio (latas metálica e multifoliada) poderá deteriorar, visto que o aumento de temperatura favorece o fenômeno de cristalização da lactose liberando água para que o escurecimento não enzimático ocorra, levando à rejeição sensorial do produto. O uso da metodologia Perfil Livre em combinação com a avaliação da Qualidade Global e o questionamento se o avaliador consumiria ou não o produto se mostrou eficiente em avaliar o ponto de corte nos estudos de estabilidade.

4.5. REFERÊNCIAS

ABEP. Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa. Critério de Classificação Econômica Brasil. Disponível em: <<http://www.abep.org/criterio-brasil>>. Acesso em 09 abril 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO 5492**:. Análise sensorial - Vocabulário. 2014. 25p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Gabinete do Ministro. Portaria nº 369, de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de identidade e qualidade de leite em pó. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção 1, p. 19699. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7896>>. Acesso em: 24 dezembro 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012. Regulamento Técnico sobre informação nutricional complementar. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/%2033880/2568070/rdc0054_12_11_2012.pdf/c5ac23fd-974e-4f2c-9fbc-48f7e0a31864>. Acesso em: 11 abr. 2018.

CARPIN, M.; BERTELSEN, H.; BECH, J. K.; JEANTET, R.; RISBO, J.; SCHUCK, P. Caking of lactose: a critical review. **Trend in Food Science and Technology**, v. 53, p. 1-12, 2016.

CLARK, Z.; PATERSON, A. H. J.; JOE, R.; MCLEOD, J. S. Amorphous lactose crystallisation kinetics. **International Dairy Journal**, v. 56, p. 22-28, 2016.

DECKELBAUM, R. J.; TORREJON, C. The omega-3 fatty acid nutritional landscape: Health benefits and sources. **Journal of Nutrition**, v. 142, n. 3, p. 587-591, 2012.

DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th. ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, 2001.

HENNING, D. R.; FLOWERS, R.; REISER, R.; RYSER, E. T. Pathogens in milk and milk products. In: WEHR, H. M.; FRANK, J. F. (Ed.). **Standard methods for the examination of dairy products**. 17th ed. MARSHALL, R. T. (Ed.). Washington, D.C.: American Public Health Association, 2004. p.103-152.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION/ INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **ISO 6785 /IDF 93**: milk and milk products: detection of *Salmonella* spp. Switzerland, 2001.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 4831**: microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection and enumeration of coliforms: most probable number technique. Switzerland, 2006.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 7251**: Microbiology of food and animal stuffs: horizontal method for the detection and

enumeration of presumptive *Escherichia coli*: most probable number technique. Switzerland, 2005.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 8586**: sensory analysis: general guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors. Switzerland, 2012.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11136**: sensory analysis: methodology: general guidance for conducting hedonic tests with consumers in a controlled area. Switzerland, 2014.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 13299**: sensory analysis: methodology: general guidance for establishing a sensory profile. Switzerland, 2016.

KARR, J. E. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cognition throughout the lifespan: a review. **Nutritional Neuroscience**, v. 14, n. 5, p. 216-225, 2011.

KAUSHIK, P.; DOWLINGA, K.; BARROWB C. J.; ADHIKARIC, B. Microencapsulation of omega-3 fatty acids: a review of microencapsulation and characterization methods. **Journal of Functional Foods**, v.19, p. 868-881, 2015.

KOLANOWSKI, W.; JAWORSKA, D.; WEIXBRODT, J. Importance of instrumental and sensory analysis in the assessment of oxidative deterioration of omega-3 LC PUFA-rich foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 181-191, 2007.

LAIRD, D. T.; AMBREL-LENALZ, S. A.; SHER, F. M. GRAHAM, T. E.; REDDY, R. Microbiological count methods. In: WEHR, H. M.; FRANK, J. F. (Ed.). Standard methods for the examination of dairy products. 17th ed. Washington: APHA, 2004. p.153-186.

LET, M. B.; JACOBSEN, C.; FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. Oxidative flavour deterioration of fish oil enriched milk. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, p. 518-528, 2003.

LUCHTMAN, D. W.; SONG, C. Cognitive enhancement by omega-3 fatty acids from childhood to old age: findings from animal and clinical studies. **Neuropharmacology**, v. 64, p. 550-565, 2013.

MARCELLINI, P. S. **Caracterização sensorial por perfil livre e análise tempo-intensidade de suco de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) reconstituído e adoçado com diferentes edulcorantes**. 2005. 100 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. 4th edition, Boca Raton : CRC Press, 2006, 448p.

MEYNER, M.; CASTURA, J. C. Check-all-that-apply questions. In: VARELA, P.; ARES, G. (Ed.). **Novel techniques in sensory characterization and consumer profiling**. Boca Ratón, FL: CRC Press, 2014. chapter 11. 36 p.

RICHTER, V. B. et al. Proposing a ranking descriptive sensory method. **Food Quality and Preference**, v. 2, n. 6, p. 611-620, 2010.

RUXTON, C. H. et al. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. **J. Hum. Nutr. Diet**, v. 17, n. 5, p. 449-59, 2004.

SHIBY, V. K.; MISHRA, H. N. Fermented milks and milk products as functional foods: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 5, p. 482-496, 2013.

SWANSON, D. et al. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. **Advances in Nutrition**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2012.

THOMSEN, M. K.; LAURIDSEN, L.; SKIBSTED, L. H.; RISBO, J. Temperature effect on lactose crystallization, maillard reactions, and lipid oxidation in whole milk powder. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7082-7090, 2005.

VIT, P.; DELIZA, R.; PÉREZ, A. How a Huottuja (Piaroa) community perceives genuine and false honey from the Venezuelan Amazon, by free-choice profile sensory method. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 5, p. 786-792, 2011.

WILLIAMS, A. A.; LANGRON, S. P. The use of free-choice for the evaluation of commercial ports. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 35, p. 558-568, 1984.

YASHODHARA, B. M. et al. Omega-3 fatty acids: a comprehensive review of their role in health and disease. **Postgraduate Medical Journal**, v. 85, n. 1000, p. 84-90, 2009.

CONCLUSÕES

A metodologia proposta no segundo capítulo deste estudo permitiu obter uma mistura de qualidade satisfatória entre leite em pó integral e microcápsulas de ômega 3, sendo o desvio padrão dos componentes minoritários (EPA e DHA) próximo a zero.

O estudo de estabilidade do produto leite em pó integral enriquecido com ômega 3 em diferentes embalagens, armazenado em condições aceleradas de temperatura e umidade relativa demonstrou que, a 43 °C, a cristalização da lactose foi o principal fenômeno de degradação do produto em embalagens herméticas e impermeáveis ao vapor d'água e oxigênio (latas metálica e multifoliada). A água liberada pela cristalização da lactose favoreceu o aumento de A_w e, conseqüentemente, o escurecimento não enzimático (valor b^*). Na nona semana de estocagem, o produto nas latas (metálica e multifoliada) foi 100% rejeitado pelos provadores e onde o produto em pó foi caracterizado pela intensidade de cor enquanto que a bebida reconstituída caracterizou-se pela dissolução, separação em fases e formação de bolhas e espuma.

A degradação deste açúcar também foi relacionada ao aumento de umidade e A_w na embalagem BOPP/PP em virtude da alta TPVA, principalmente na condição de estocagem em alta umidade relativa (34 °C/ 83% de UR). A rugosidade de superfície (observada em MEV) das amostras em BOPP/PP (34 °C/ 83% de UR) e nas latas metálica e multifoliada (43 °C) deixam claro a ocorrência da formação dos cristais de lactose sob a superfície do leite em pó integral. Os atributos sensoriais que definiram o produto em BOPP/PP, rejeitado por 94,7% dos provadores na nona semana de estocagem a 34 °C/ 83% de UR, foram cor do pó; cor, dissolução e separação de fases do leite reconstituído; sensação na boca de pó e grumos do leite reconstituído.

A diferença entre as condições de estocagem também foi relevante na ocorrência da oxidação lipídica, visto que, a 43 °C, um maior consumo de oxigênio foi observado. As embalagens flexíveis eram permeáveis ao oxigênio (sendo a TPO_2 da embalagem BOPP/PP cerca de 1000 vezes maior que a da embalagem

PETmet/PEBD) de forma que a permeação do oxigênio através do material das embalagens causou a manutenção de teores mais elevados do que aqueles observados para o espaço livre das latas metálica e multifoliada.

Em ambas condições de armazenagem e em todas as amostras avaliadas, o ácido graxo ALA, presente principalmente no leite em pó, foi reduzido a valores próximos a limites não detectáveis a partir da terceira semana de estocagem, enquanto que os teores de EPA e DHA, ácidos graxos microencapsulados, mantiveram níveis satisfatórios ao longo do estudo para que o produto mantivesse a propriedade funcional “fonte de ômega 3”, demonstrando que a microencapsulação exerceu efeito protetor sobre os ácidos graxos provenientes de óleo de peixe.

ANEXOS

ANEXO 1. APROVAÇÃO DO PROTOCOLO DE PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FACULDADE DE JAGUARIÚNA (FAJ).

FACULDADE DE JAGUARIÚNA 

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência da embalagem na estabilidade de leite em pó adicionado de ômega 3 microencapsulado

Pesquisador: Fiorella B. H. Dantas

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 57815416.3.0000.5409

Instituição Proponente: SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO

Patrocinador Principal: SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.638.365

Apresentação do Projeto:

A demanda por alimentos saudáveis tem motivado o desenvolvimento de produtos com alegações funcionais que visam fornecer benefício extra aos consumidores. O leite é considerado um alimento completo e faz parte da dieta base de crianças e muitos adultos. O leite em pó é um dos principais produtos lácteos exportados e possibilita escoar produções excedentes para mercados importadores, ou mesmo para consumo interno. O consumo

de alimentos fonte de ômega 3 vem sendo recomendado pela comprovação dos diversos benefícios à saúde de seus consumidores, tais como prevenção de doenças cardíacas e vasculares bem como desenvolvimento saudável do feto e recém-nascido. Este projeto tem por objetivo estudar a influência do material de embalagem utilizado no acondicionamento de leite em pó adicionado de ômega 3 microencapsulado visando a manutenção do valor nutricional desse alimento ao longo de sua vida útil. Para isso, serão utilizadas partículas encapsuladas comercialmente disponíveis. O leite em pó adicionado de ômega 3 microencapsulado será acondicionado em quatro tipos de embalagens diferentes: lata metálica de três peças, lata multifolhada, embalagem plástica flexível barreira e embalagem plástica flexível não barreira. Os produtos acondicionados nas embalagens serão colocados em câmaras de estocagem a 23 °C/sem controle de umidade relativa, 25 °C/75% UR, 35 °C/90% UR e 40 °C/sem controle de umidade

Endereço: Rua Amazonas, 504
Bairro: Jardim dom Bosco **CEP:** 13.820-000
UF: SP **Município:** JAGUARIUNA
Telefone: (19)3837-8800 **Fax:** (19)3837-8500 **E-mail:** comite.etica@faj.br

ANEXO1. Continuação

FACULDADE DE JAGUARIÚNA



Continuação do Parecer: 1.636.365

relativa, sendo que nas condições de temperatura acelerada (35 °C/90% UR e 40 °C/sem controle de umidade) o produto será acompanhado pelo período de 3 meses e nas condições 23 °C/sem controle de umidade e 25 °C/75% UR o produto será acompanhado pelo período de 1 ano. Ao final espera-se dispor de um produto com apelo benéfico à saúde que apresente manutenção das suas características desejáveis pelo período de 12 meses numa embalagem especificada adequadamente.

Hipótese: A vida útil do produto acondicionado em lata metálica, lata multifolhada e embalagens plásticas flexíveis será determinada por análises periódicas dos produtos estocadas sob diferentes condições temperatura e umidade. A avaliação visual das embalagens será realizada tanto na face externa como na face interna, objetivando a verificação da ocorrência de corrosão ou outra alteração que porventura venha a ocorrer durante período de estocagem. A atividade de água dos produtos será determinada em um higrômetro baseado em psicrometria de marca Decagon – Aqualab, com resolução de 0,001Aa, sob uma temperatura de 25,0 +/- 0,3 °C (DECAGON, s.d.) e a umidade será determinada através da secagem do produto misturado a areia tratada em estufa com circulação forçada de ar (Brasil, 2006). A molhabilidade das amostras no tempo inicial (T0) e durante a estocagem será avaliada pelo método citado por AZEVEDO et al (2011), sendo considerada como o tempo necessário para que 2,0 g de pó depositado na superfície do líquido estejam completamente umedecidos em 400 ml de água destilada a 25 °C. As análises serão feitas com 10 repetições. Os parâmetros de cor (L*, a*, b*) para as amostras no tempo inicial (T0) e durante a estocagem serão medidos utilizando-se colorímetro (Konica Minolta, modelo CR- 410, Japão), com adaptador para materiais granulares e em pó (CR-A50). As análises serão feitas com 10 repetições (AZEVEDO et al., 2011). A análise de insolubilidade será realizada para as amostras no tempo inicial (T0) e durante a estocagem, segundo Vissoto et al. (2006). As análises serão realizadas em triplicata.

O perfil de ácidos graxos será avaliado por cromatografia gasosa. O ativo será extraído das micropartículas e será realizada a caracterização do ômega-3 em relação à sua composição em ácidos graxos, utilizando-se a técnica de cromatografia gasosa, após obtenção dos ésteres metílicos da amostra. Os principais componentes de interesse a serem quantificados são ácidos docosaexaenóico (DHA, C22:6) e eicosapentaenóico (EPA C20:5) (FIRESTONE, 2014). Serão conduzidas análises microbiológicas no produto referentes à Contagem total de mesófilos, Coliformes a 30°C, Coliformes a 45°C, Estafilococos coagulase positiva e Salmonella sp. O teor de oxigênio do espaço livre das embalagens será quantificado em cromatógrafo a gás Agilent, modelo 7890 e os resultados serão analisados pelo programa Chemstation/ Agilent, versão B

Endereço: Rua Amazonas, 504
Bairro: Jardim dom Bosco CEP: 13.820-000
UF: SP Município: JAGUARIUNA
Telefone: (19)3837-8800 Fax: (19)3837-8500 E-mail: comite.etica@faj.br

Página 02 de 05

ANEXO 1. Continuação

FACULDADE DE JAGUARIÚNA



Continuação do Parecer: 1.636.365

03.01, com base em curvas-padrão feitas com gases de calibração. A coleta desse gás será realizada através de um septo colado na tampa da embalagem utilizando-se uma seringa hermética. A análise sensorial será realizada com base na ISO 8586 e método a ser empregado será o de Perfil Livre de maneira a levantar o maior número possível de atributos com relação à aparência, aroma e sabor dos produtos. Os dados do Perfil Livre serão analisados por Análise Procrustes Generalizada com uso do programa XLSTAT.

Objetivo da Pesquisa:

O presente estudo tem por objetivo avaliar a influência do material de embalagem utilizado no acondicionamento de leite em pó adicionado de ômega 3 microencapsulado visando a manutenção do valor nutricional desse alimento ao longo de sua vida útil.

Os objetivos secundários serão:

- Incorporar ômega 3 em leite em pó acondicionado em diferentes sistemas de embalagem sem inertização;
- Avaliar os efeitos da temperatura e da umidade na estocagem do produto in natura e acondicionado em lata metálica, lata multifolhada e embalagem plástica flexível;
- Avaliar o efeito combinado da macroproteção (influência do material de embalagem) e da microproteção (microencapsulação) na manutenção da qualidade global do produto fortificado e no conteúdo de ômega 3;
- Avaliar a qualidade e a estabilidade dos ácidos graxos EPA e DHA nas condições de estocagem do produto nos diferentes materiais de embalagem.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O produto leite em pó adicionado de ômega 3 microencapsulado será elaborado em condições adequadas de higiene e de segurança, com matérias-primas de qualidade.

As porções de leite em pó adicionado de ômega 3 microencapsulado que serão oferecidas em cada sessão de análise sensorial respeitam os limites estabelecidos na RDC 54/2012 que regulamenta as informações nutricionais complementares e declarações de propriedades funcionais para atribuição de alimentos "fonte" de ômega 3 e no Informe Técnico 63/2014 que esclarece os limites para utilização de ômega 3 em alimentos, ambos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Uma vez que, segundo o Guia sobre Controle de Alergênicos nº 05/2016 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, leite e peixe são considerados alimentos alergênicos e, sendo o ômega 3 um ácido graxo poliinsaturado presente em óleo de peixe, todos os provadores selecionados estarão cientes da composição do produto bem como de seu potencial alergênico e

Endereço: Rua Amazonas, 504
Bairro: Jardim dom Bosco CEP: 13.820-000
UF: SP Município: JAGUARIUNA
Telefone: (19)3837-8800 Fax: (19)3837-8500 E-mail: comite.etica@faj.br

Página 05 de 05

ANEXO 1. Continuação

FACULDADE DE JAGUARIÚNA



Continuação do Parecer: 1.636.365

não serão aceitos provadores que apresentem intolerância prévia aos ingredientes da formulação (leite e ômega 3/ peixe).

Benefícios: Dada a periodicidade em que as análises sensoriais serão realizadas, não é possível comprovar benefícios aos provadores que irão consumir o produto durante o período da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

ANÁLISE SENSORIAL: será empregado o método de Perfil Livre através do qual o levantamento de atributos será realizado pelo método de rede com uso de duas amostras distintas, de maneira a levantar o maior número possível de atributos com relação à aparência, aroma e sabor dos produtos. Os dados do Perfil Livre serão analisados por Análise Procrustes Generalizada com uso do programa XLSTAT. Esta análise será realizada no Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos do ITAL.

Os dados de análise sensorial "Perfil Livre" serão analisados por Análise Procrustes Generalizada com uso do programa XLSTAT.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos obrigatórios foram devidamente apresentados e aprovados pelo CEP - FAJ conforme descritos abaixo:

- Folha de rosto;
- Projeto completo;
- Orçamento e cronograma do projeto;
- Termo de consentimento livre e esclarecido;
- Termo de outorga e aceitação de auxílios;
- Declaração da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo assinado pelo diretor técnico do ITAL assegurando o custeio da execução deste projeto.

Recomendações:

Sempre submeter o currículo lattes do pesquisador responsável.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O estudo foi aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Amazonas, 504
Bairro: Jardim dom Bosco CEP: 13.820-000
UF: SP Município: JAGUARIUNA
Telefone: (19)3837-8800 Fax: (19)3837-8500 E-mail: comite.etica@faj.br

ANEXO 1. Continuação

FACULDADE DE JAGUARIÚNA



Continuação do Parecer: 1.636.365

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_753984.pdf	07/07/2016 16:46:20		Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_Comite.pdf	07/07/2016 15:55:39	Sylvia Salioni Camrago Novaes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	07/07/2016 15:50:31	Sylvia Salioni Camrago Novaes	Aceito
Outros	termo_de_outorga_processo_2015_129_55_0_assinado.pdf	07/07/2016 15:45:21	Sylvia Salioni Camrago Novaes	Aceito
Declaração do Patrocinador	Declaracao_Assis.pdf	07/07/2016 15:39:28	Sylvia Salioni Camrago Novaes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_FAPESP_Fiorella.pdf	07/07/2016 15:22:41	Sylvia Salioni Camrago Novaes	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JAGUARIUNA, 14 de Julho de 2016

Assinado por:

Elisandra Villela Gasparetto Sé
(Coordenador)

Endereço: Rua Amazonas, 504
Bairro: Jardim dom Bosco CEP: 13.820-000
UF: SP Município: JAGUARIUNA
Telefone: (19)3837-8800 Fax: (19)3837-8500 E-mail: comite.etica@faj.br

Página 05 de 05

ANEXO 2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISA COM SERES HUMANOS

PROJETO DE MESTRADO: Influência da Embalagem na Estabilidade de Leite em Pó Adicionado de Ômega 3 Microencapsulado

RESPONSÁVEL PELA PESQUISA: Fiorella Balardin Hellmeister Dantas

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: Esta pesquisa tem por objetivo avaliar a qualidade sensorial de leite reconstituído a partir de leite em pó adicionado de ômega 3 microencapsulado, quanto à atributos sensoriais que determinam a qualidade do produto.

PROCEDIMENTO: para a avaliação do leite reconstituído a partir de leite em pó adicionado de ômega 3 microencapsulado você será treinado. Nesse treinamento, você vai se familiarizar com os atributos que serão avaliados no teste sensorial.

Após o treinamento, você iniciará o teste sensorial baseado nos atributos treinados. As amostras serão codificadas com números de três dígitos. Você deverá experimentar as amostras e responder ao questionário que será entregue no início do teste.

Os participantes não terão benefícios diretos com a avaliação sensorial, no entanto, estarão contribuindo com uma pesquisa científica que tem como objetivo avaliar as características que determinam a vida útil do leite em pó adicionado de ômega 3 microencapsulado.

Caso apresente alergia a algum dos ingredientes da formulação, você deverá informar imediatamente ao responsável pela pesquisa e não poderá participar da mesma.

Você é livre para se recusar a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. Sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou constrangimento. Os pesquisadores asseguram que seus dados de identidade serão tratados de forma confidencial e sigilosa. A participação no estudo não acarretará custos e não será disponível nenhuma compensação financeira.

Eu,....., declaro que li as informações contidas neste documento, fui devidamente informado(a) pelo pesquisador dos procedimentos que serão utilizados. Declaro também que recebi uma cópia deste documento e que tive oportunidade de ler e esclarecer minhas dúvidas.

_____ RG: _____ Data ____ / ____ / ____

Assinatura do Participante

Fiorella Balardin Hellmeister Dantas – Pesquisadora - ITAL
Contato: Fone: (19) 3743-1914 e-mail: fiorella@ital.sp.gov.br
Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL: Fone: (19) 3743-1700 / Fax (19) 3743-1799 e-mail: ital@ital.sp.gov.br
Av. Brasil, 2880, Campinas, SP – CEP: 13070-178 Caixa Postal 139.