

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E  
DERIVADOS**

**JÚLIA D'ALMEIDA FRANCISQUINI**

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE INDICADORES FÍSICO-QUÍMICOS,  
TECNOLÓGICOS E DE TRATAMENTO TÉRMICO EM DOCES DE LEITE**

**Juiz de Fora  
2016**

**JÚLIA D'ALMEIDA FRANCISQUINI**

**Caracterização e avaliação de indicadores físico-químicos, tecnológicos e de  
tratamento térmico em doces de leite**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Fonseca da Silva**

**Coorientador: Prof. Dr. Ítalo Tuler Perrone**

**Juiz de Fora**

**2016**

Francisquini, Júlia d'Almeida.

Caracterização e avaliação de indicadores físico-químicos, tecnológicos e de tratamento térmico em doces de leite / Júlia d'Almeida Francisquini. -- 2016.

101 p.

Orientador: Paulo Henrique Fonseca da Silva

Coorientador: Ítalo Tuler Perrone

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2016.

1. 5-hidroximetilfurfural. 2. Reação de Maillard. 3. Leite. I. da Silva, Paulo Henrique Fonseca, orient. II. Perrone, Ítalo Tuler, coorient. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

Sozinha não teria conseguido chegar até aqui, por isso é necessário reconhecer e agradecer a todas as pessoas que me deram total apoio e amizade durante mais esta vitória.

Aos meus pais, Ana e Júlio e à minha irmã Ana Carolina, as minhas maiores fonte de inspirações e meu conforto, por serem meu porto seguro e por não medirem esforços para ver minha felicidade e meu sucesso.

Agradeço pela minha avó Mariinha que formou junto ao meu falecido avô Marcelo uma família unida e cheia de alegria, me ensinando que mesmo diante de tantas dificuldades quando temos uns aos outros somos muito mais forte do que imaginamos.

Ao Guilherme, meu companheiro dos bons e maus momentos, das presenças e ausências, dos sorrisos e das lágrimas, das felicidades e dos emburramentos, o melhor e maior cúmplice que poderia ter em todas as horas, te amo.

Aos meus amigos do ballet, em especial Clarinha, que sempre torceram por mim no palco e na vida. Aos meus amigos da nutrição, principalmente Felipe, os quais dividiram as mesmas incertezas de ser recém-formados e as mesmas dificuldades de ter que correr atrás daquilo que desejamos ser.

Agradeço também à turma do Mestrado, em meio de tantos estudos e estatística sempre tínhamos um tempinho para umas boas risadas. E ao meu fiel amigo Jansen Kelis, que não mediu esforços para me ajudar, até mesmo na beira do tacho, apesar de todas as suas tarefas e compromissos.

Aos amigos incríveis que fiz durante minha passagem no Labs. Ao quarteto Arícia, Le, Tati, Vanessa o meu muito obrigada, por fazerem de nossos poucos momentos juntos algo tão valiosos que valem até mais do que uma presença diária. Às bolsistas de Iniciação Científica, Paulinha, Brenda e Talitha, que me aturaram com tanto stress e desespero, este trabalho também é de vocês, grata por acompanharem as análises e por terem sido tão esforçadas e dedicadas.

Leandra e João Pablo, os Técnicos do Laboratório de Composição de Alimentos do Departamento de nutrição, eu não tenho palavras para agradecer tudo o que fizeram por mim durante todos estes anos. Vocês são espelhos para minha vida, quando crescer quero ter um pouquinho da eficiência e capacidade profissional

que vocês tem. Muito obrigada por me ensinarem a ser uma profissional melhor e por me ajudarem a encontrar o meu caminho dentro da nutrição.

Pela oportunidade que Deus me deu de amadurecer profissionalmente durante minha estada como Professora Substituta no Departamento de Parasitologia. Profs. Dras. Elaine Coimbra, Florence Rosa, Clarice Abramo, Prof. Dr. Pedro Paulo e Ivone Bertante por sempre terem uma palavra de incentivo, pelo imenso carinho e por todos os ensinamentos e lições que levarei para toda minha vida.

Sabia que chegaria nesta parte seria difícil, com lágrimas nos olhos agradeço tudo que o Prof. Dr. Paulo Henrique Fonseca da Silva fez por mim. Foram praticamente sete anos, sete anos de amizade, de crescimento, amadurecimento, viagens, congressos, risadas, broncas. Digo com convicção que tudo o que sou e tudo o que consegui profissionalmente ele me ajudou e sempre esteve do meu lado. Hoje nos despedimos como aluna-orientador, mas com a certeza de que fizemos um trabalho brilhante juntos em meio de todas as dificuldades, desde a lavagem das primeiras vidrarias do Labs até este título de mestre.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Ítalo Tuler Perrone, por passar parte de sua experiência profissional, por abrir as portas de seu local de trabalho e pelas sugestões e colaboração para o aperfeiçoamento da dissertação.

Aos membros da banca, que tão prontamente atenderam ao convite de fazer parte deste momento tão importante da minha carreira acadêmica. À Prof. Dra. Deborah Bastos por sempre estar disposta a nos ajudar durante todo o mestrado, ao Prof. Dr. Marco Antonio Furtado por dividir seus ensinamentos, ao Prof. Dr. Renato Nunes por ter acompanhado meu crescimento profissional e pessoal desde o início da graduação.

Prof. Dr. Antônio Fernandes de Carvalho abriu as portas do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV – Plataforma Inovaleite permitindo a elaboração dos doces de leite experimentais o que foi fundamental para os resultados aqui apresentados.

Ao Prof. Dr. Virgílio de Carvalho dos Anjos, Prof. Dra. Maria José Velenzuela Bell e à Dra. Marta Fonseca Martins pela gentileza que sempre tiveram comigo e pelo apoio durante minha permanência no programa.

Agradeço também ao Programa do Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, ao Departamento de Nutrição e à Universidade Federal de Viçosa pelo apoio e financiamento.

Por último e mais importante agradeço a Deus pela fé que ele cultivava em meu coração e pelo dom mais precioso que ele poderia ter me dado, a vida. Uma nova fase se concretiza e tenho certeza de que muitos desafios e novas experiências estão por vir, peço a ele que abençoe minha trajetória e me leve para um caminho de ética e profissionalismo.

Desta forma, acredito que gratidão é o que posso oferecer neste momento a todos vocês que estiveram comigo. Esta palavra significa um sentimento de reconhecimento, uma emoção por saber que uma pessoa fez uma boa ação, um auxílio, em favor de outra é uma espécie de dívida; é querer agradecer a outra pessoa por ter feito algo muito benéfico para ela. Gratidão ocorre sempre que alguém faz algo que o outro gostaria que acontecesse, sem esperar nada mais em troca e isto faz com que a pessoa que fez a ação se sinta feliz e a que recebeu também.

Pois ele ordenou aos seus anjos que guardem você  
em seus caminhos. E eles te levarão nas mãos  
para que seu pé não tropece em uma pedra.

*Salmo, 91:11-12*

Concentre-se em bater seus próprios recordes todos os dias. O sucesso  
é uma batalha travada entre você e você mesma.

*Autor desconhecido*

## RESUMO

O doce de leite (DL) é tradicionalmente obtido pela concentração por calor do leite acrescido de açúcar e tem expressiva produção e comercialização na América Latina. A padronização das características deste produto e a adequação ao preconizado pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Doce de Leite (RTIQDL) tornam-se dificultados pela diversidade cultural, mudanças tecnológicas e distintos ingredientes usados na fabricação. Este alimento tem aroma, sabor e cor característicos principalmente em decorrência da reação de Maillard (RM) desencadeada durante o aquecimento. O trabalho objetivou verificar a qualidade e uniformidade por meio da análise físico-química e composicional de produtos comercializados na cidade de Juiz de Fora – Minas Gerais (MG) e em doces de leite fabricados experimentalmente. O trabalho buscou determinar o índice de 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) nos doces de leite comerciais e ao longo da fabricação dos doces de leite experimentais, com o intuito de entender como diferentes formulações influenciam na formação deste indicador. Nove diferentes marcas comerciais e doze formulações experimentais foram submetidas às determinações de umidade, lipídeos, proteínas, cinzas, carboidratos, atividade de água ( $A_w$ ) e teor de sólidos solúveis. Foi realizada a determinação de HMF livre e HMF total por espectrofotometria a 443 nm usando ácido tiobarbitúrico. A estatística descritiva dos resultados obtidos para os atributos físico-químicos, composicionais e dos índices de HMF livre e HMF total dos doces comerciais demonstraram elevada variabilidade entre as amostras, com despadronização e não cumprimento integral da legislação vigente. Em relação às amostras experimentais, a estatística descritiva revelou baixa variabilidade para os atributos físico-químicos e composicionais indicando maior aderência aos limites estabelecidos pelo RTIQDL. A análise dos resultados de HMF para os doces experimentais mostrou elevação dos índices de HMF livre e HMF total ao longo da fabricação. Concluiu-se que a adição de glicose e o uso de maiores concentrações de bicarbonato de sódio foram fatores determinantes para o aumento do índice de HMF. Os resultados deste trabalho ampliam o conhecimento científico sobre doce de leite favorecendo as indústrias de laticínios e a comunidade científica, além de evidenciar a importância da padronização e do controle durante a fabricação do doce de leite.

**Palavras chave:** 5-hidroxiacetilfurfural. Reação de Maillard. Leite.

## ABSTRACT

The “dulce de leche” (DL) is traditionally obtained by concentrating heat milk plus sugar and has significant production and commercialization in Latin America. The standardization of the characteristics of this product and the adequacy recommended by the Technical Regulation Identity and Quality of “Dulce de Leche” become hampered by cultural diversity, technological changes, and different ingredients used in manufacturing. This food has characteristic flavor, aroma and color mainly due to the Maillard Reaction (MR) triggered during heating. This study aimed to verify the quality and uniformity through physical-chemical and compositional analysis of the products marketed in the city of Juiz de Fora - Minas Gerais (MG) and in DL manufactured experimentally. In addition, the study sought to determine the 5-hydroxymethylfurfural content (HMF) in commercial DL and along the manufacture of experimental DL in order to understand how different formulations influence the formation of this index. Nine different trademarks and twelve experimental formulations were submitted to determination of moisture, lipid, protein, ash, carbohydrates, water activity ( $A_w$ ) and soluble solids. It was held the determination of free HMF and total HMF by spectrophotometry at 443 nm using thiobarbituric acid. The descriptive statistic of the results for the physico-chemical and compositional properties, and the free HMF and total HMF index of the comercial DL show high variability between samples with non standardization and not complete compliance with current legislation. Regarding the experimental samples, the descriptive statistic found low variability for the physical-chemical and compositional attributes indicating greater cohesion with the limits established by Technical Regulation Identity and Quality of “Dulce de Leche”. The analysis of the results of HMF for the experimental dulces showed elevated levels of free HMF and total HMF along the manufacturing. It is concluded that the addition of glucose and the use of higher concentrations of sodium bicarbonate were decisive factors for increasing the index of HMF. The results of this study expand scientific knowledge about dulce de leche favoring the dairy industry and the scientific community, as well as highlight the importance of standardization and control during the manufacture of “dulce de leche”.

**Key words:** 5-hydroxymethylfurfural. Maillard reaction. Milk.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Principais etapas da reação de Maillard em alimentos, adaptado pelo autor a partir dos trabalhos de Ames (1998), Bastos <i>et al.</i> (2012), McSweeney e Fox (2009), Martins <i>et al.</i> (2001).....	22
<b>Figura 2.</b> Resumo esquemático das etapas da reação de Maillard destacando o HMF, adaptado pelo autor a partir dos trabalhos de Van Boekel (1998), Fennema <i>et al.</i> (2010), Perrone <i>et al.</i> (2011a), Nursten (2005), Fox (1998), elaborado pelo autor. ....	25
<b>Figura 3.</b> Fórmulas estruturais do 5-hidroximetilfurfural, NCBI (2005).....	26
<b>Figura 4.</b> Fluxograma da fabricação experimental de doce de leite na UFV, elaborado pelo autor. ....	37
<b>Figura 5.</b> Delineamento experimental do trabalho, elaborado pelo autor. ....	39
<b>Figura 6.</b> Geometrização do processo de produção de doce de leite retirado de Perrone <i>et al.</i> (2011). ....	40
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática da técnica analítica usada para determinação de 5-hidroximetilfurfural por espectrofotometria, elaborado pelo autor.....	43
<b>Figura 8.</b> Resumo das análises físico-química, composicionais e de indicadores de tratamento térmico determinadas para os doces de leite comerciais e experimentais, elaborado pelo autor. ....	45
<b>Figura 9.</b> Curva padrão 5-hidroximetilfurfural, elaborado pelo autor.....	46
<b>Figura 10.</b> Evolução do índice de HMF livre nos diferentes tempos ao longo do tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor. ....	63
<b>Figura 11.</b> Evolução do índice de HMF livre nos diferentes tratamentos ao longo do tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor. ....	65
<b>Figura 12.</b> Regressão polinomial do comportamento do índice de HMF livre, no tratamento 1, nos doces de leite experimentais durante o tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor. ....	66
<b>Figura 13.</b> Regressão polinomial do comportamento do índice de HMF livre, no tratamento 2, nos doces de leite experimentais durante o tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor. ....	67

<b>Figura 14.</b> Regressão polinomial do comportamento do índice de HMF livre, no tratamento 3, nos doces de leite experimentais durante o tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor. ....	67
<b>Figura 15.</b> Regressão polinomial do comportamento do índice de HMF livre, no tratamento 4, nos doces de leite experimentais durante o tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor. ....	68
<b>Figura 16.</b> Evolução do índice de HMF total nos diferentes tempos ao longo do tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor. ....	71
<b>Figura 17.</b> Evolução do índice de HMF total nos diferentes tratamentos ao longo do tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor. ....	73
<b>Figura 18.</b> Regressão polinomial do comportamento da média geral do teor de sólidos solúveis durante a fabricação dos doces de leite experimentais durante o tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor. ....	77
<b>Figura 19.</b> Regressão polinomial do comportamento do teor de sólidos solúveis, no tratamento 1, nos doces de leite experimentais durante o tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor. ....	79
<b>Figura 20.</b> Regressão polinomial do comportamento do teor de sólidos solúveis, no tratamento 2, nos doces de leite experimentais durante o tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor. ....	79
<b>Figura 21.</b> Regressão polinomial do comportamento do teor de sólidos solúveis, no tratamento 3, nos doces de leite experimentais durante o tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor. ....	80
<b>Figura 22.</b> Regressão polinomial do comportamento do teor de sólidos solúveis, no tratamento 4, nos doces de leite experimentais durante o tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor. ....	80
<b>Figura 23.</b> Taxa de massa de água evaporada (kg) em função do tempo de fabricação do doce de leite partindo-se de 18,02 kg de calda, elaborado pelo autor. ....	81
<b>Figura 24.</b> Percentual de água evaporada em função do tempo de fabricação do doce de leite partindo-se de 18,02 kg de calda, elaborado pelo autor. ....	82

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Propriedades físicas, químicas e experimentais do 5-hidroximetilfurfural.	26
<b>Tabela 2.</b> Análise estatística descritiva dos atributos físico-químicos e composicionais de nove diferentes marcas de doces de leite comerciais .....	47
<b>Tabela 3.</b> Requisitos físico-químicos obrigatórios para doce de leite de acordo com Brasil (1997).....	48
<b>Tabela 4.</b> Análise estatística descritiva do índice de HMF livre e de HMF total dos doces de leite comerciais .....	53
<b>Tabela 5.</b> Análise estatística descritiva dos atributos físico-químicos e composicionais dos doces de leite experimentais.....	55
<b>Tabela 6.</b> Análise estatística descritiva do índice de HMF livre dos doces de leite experimentais ao longo da fabricação.....	58
<b>Tabela 7.</b> Índice médio de HMF livre em $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ , nos diferentes tratamentos, para os doces de leite experimentais ao longo da fabricação .....	60
<b>Tabela 8.</b> Índice médio de HMF livre em $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ , nos diferentes tempos, para os doces de leite experimentais ao longo da fabricação.....	64
<b>Tabela 9.</b> Análise estatística descritiva do índice de HMF total dos doces de leite experimentais.....	69
<b>Tabela 10.</b> Índice médio de HMF total em $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ , nos diferentes tempos, para os doces de leite experimentais.....	72
<b>Tabela 11.</b> Análise estatística descritiva do teor de sólidos solúveis dos doces de leite experimentais .....	75
<b>Tabela 12.</b> Índice médio do teor de sólidos solúveis em °Brix, nos diferentes tempos, para os doces de leite experimentais .....	76
<b>Tabela 13.</b> Comparação das médias encontradas para os atributos composicionais, nutricionais e dos indicadores do tratamento térmico nos DL comerciais e nos DL experimentais.....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs - produtos finais de glicação avançada;  
ALICEWeb - Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior via Internet;  
ANOVA – Análise de Variância;  
Aw - atividade de água;  
CLA - ácido linoléico conjugado;  
DL - doce de leite;  
EUA – Estados Unidos da América;  
HMF - 5-hidroxiacetilfurfural;  
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;  
IN 62 - Instrução Normativa nº 62;  
INDI - Instituto de Desenvolvimento Integrado de Minas Gerais;  
IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada;  
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;  
MDCI – Ministério do Desenvolvimento, Indústria, e Comércio Exterior;  
MG - Minas Gerais;  
NCBI - Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia;  
PPO – Polifenol oxidase;  
PIA - Pesquisa Industrial Anual;  
PRM – produtos da reação de Maillard;  
PRV - pressão de vapor relativa;  
RM – reação de Maillard;  
RN – Rio Grande do Norte;  
RTIQDL - Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Doce de Leite;  
TBA – ácido tiobarbitúrico;  
TCA – ácido tricloroacético;  
UFJF- Universidade Federal de Juiz de Fora;  
UFV – Universidade Federal de Viçosa;  
UHT – *Ultra high temperature*;

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - percentual;

$\text{g.100g}^{-1}$  – gramas de soluto por 100 gramas de solução ou de amostra;

$\text{kcal.100g}^{-1}$  – quilocalorias por 100 gramas de alimento;

h - hora (unidade de medida de tempo);

min – minutos (unidade de medida de tempo);

$^{\circ}\text{C}$  – graus Celsius (unidade de temperatura);

L – litros (unidade de medida de volume);

kg - quilograma (unidade de medida de massa);

pH – potencial hidrogeniônico;

$\text{g.mol}^{-1}$  – gramas por mol;

$\text{g.mL}^{-1}$  – gramas por mililitro;

mmHg – milímetros de mercúrio;

mg – miligrama (unidade de medida de massa);

$^{\circ}\text{Brix}$  – graus Brix (percentual de sólidos solúveis);

P - pressão de vapor da água no alimento;

$P_o$  - pressão de vapor saturada da água;

rpm – rotações por minuto;

nm – nanômetro (unidade de comprimento);

$\mu\text{mol.kg}^{-1}$  – micromol por quilograma;

g – grama (unidade de medida de massa);

ml – mililitro – (unidade de medida de volume);

$\text{mol.L}^{-1}$  – mol por litro;

% m/v - percentual de massa de soluto em relação ao volume de solução;

$R^2$  – Coeficiente de determinação;

% (m/m) – percentual de massa de soluto em relação à massa de solução;

$\text{kg.100L}^{-1}$  – quilogramas por 100 litros;

$\mu\text{mol.L}^{-1}$  – micromol por litro;

$\mu\text{g.100 ml}^{-1}$  – micrograma por cem mililitros;

$\text{H}^+$  - íons hidrogênio;

$-\text{NH}_3^+$  - grupo amino;

$-\text{NH}_2$  – grupo amina;

$\text{mg.kg}^{-1}$  – miligrama por quilograma

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
2.1 Doce de leite .....	17
2.2 Tecnologia de fabricação do doce de leite .....	18
2.3 Reação de Maillard no alimento.....	20
2.4 Produtos da reação de Maillard (PRM).....	24
2.5 Reação de Maillard <i>in vivo</i> (glicação).....	27
2.6 Atributos composicionais e físico-químicos.....	29
2.6.1 Umidade .....	29
2.6.2 Lipídeos .....	30
2.6.3 Proteínas .....	30
2.6.4 Cinzas.....	31
2.6.5 Carboidratos .....	31
2.6.6 Teor de sólidos solúveis .....	32
2.6.7 Atividade de água .....	32
2.6.8 Amido.....	33
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
3.1 Objetivo geral.....	35
3.2 Objetivos específicos .....	35
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
4.1 Aquisição dos doces de leite comerciais.....	36
4.2 Fabricações dos doces de leite, delineamento experimental e análise estatística.....	36
4.3 Cálculo do balanço de massa .....	40
4.4 Elaboração da curva padrão para 5-hidroximetulfural .....	41
4.5 Determinação dos atributos composicionais e físico-químicos .....	41

4.5.1 Umidade .....	41
4.5.2 Lipídeos .....	41
4.5.3 Proteínas .....	42
4.5.4 Cinzas.....	42
4.5.5 Carboidratos .....	42
4.5.6 Amido.....	42
4.5.7 Atividade de água .....	42
4.5.8 Teor de sólidos solúveis .....	43
4.6 Determinação de 5-hidroximetilfurfural .....	43
4.7 Resumo das análises físico-químicas, composicionais e do indicador de tratamento térmico .....	44
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
5.1 Curva padrão 5-hidroximetilfurfural .....	46
5.2 Doces de leite comerciais .....	46
5.2.1 Atributos composicionais e físico-químicos .....	47
5.2.2 Índice de 5-hidroximetilfurfural.....	53
5.3 Doces de leite experimentais .....	54
5.3.1 Atributos composicionais e físico-químicos .....	54
5.3.2 Índice de 5- hidroximetilfurfural.....	57
5.3.2.1 HMF livre .....	58
5.3.2.2 HMF total .....	68
5.3.3 Teor de sólidos solúveis durante a fabricação.....	74
5.3.4 Correlação do índice de 5-hidroximetilfurfural e teor de sólidos solúveis. .	83
5.4 Comparação composicional, nutricional e do indicador do tratamento térmico entre doces comerciais e doces experimentais .....	84
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>7. DIREÇÃO PARA FUTUROS ESFORÇOS .....</b>	<b>89</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>91</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O doce de leite corresponde a um derivado lácteo de grande aceitação pela sua agradável característica sensorial. Nutricionalmente, apresenta alto valor energético e alta concentração de proteínas, minerais e carboidratos.

O produto alimentício em questão durante sua fabricação é exposto por longo tempo à elevada temperatura. Esta situação somada com o tipo de ingrediente utilizado na sua elaboração estimula a aceleração da velocidade da reação de Maillard e conseqüentemente aumento dos índices de 5-hidroximetilfurfural que corresponde a um dos indicadores utilizados para a verificação da intensidade do tratamento térmico.

Este tipo de doce é formulado desde fabricações artesanais até fabricações em pequenas, médias e grandes indústrias de laticínios. A qualidade da matéria prima, o tipo de formulação utilizada e os gargalos tecnológicos relacionados à falta de padronização do tempo e temperatura durante a fabricação têm dificultado a padronização entre as marcas encontradas no mercado brasileiro.

Torna-se imperioso diagnosticar, estudar e priorizar como os diferentes ingredientes, as distintas tecnologias de fabricação e a intensidade do tratamento térmico influenciam na qualidade e uniformidade dos doces de leite. Além disto, a escassez de literatura técnica e científica sobre tal produto ratifica a necessidade de maiores estudos.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo geral estudar os atributos físico-químicos, composicionais e os indicadores de tratamento térmico através do 5-hidroximetilfurfural. Dentre os objetivos específicos destaca-se: realizar processamentos experimentais de doce de leite, para testar diferentes formulações e avaliar os efeitos na formação de HMF no produto; caracterizar, com base na análise de diferentes amostras comerciais de doces de leite e de doces experimentais, os atributos físico-químicos (atividade de água, teor de sólidos solúveis e análise qualitativa de amido) e composicionais (umidade, proteínas, lipídeos, carboidratos e cinzas); avaliar os doces de leite comerciais e experimentais em relação ao 5-hidroximetilfurfural, como indicador de tratamento térmico.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Doce de leite

O doce de leite é um produto alimentício produzido em pequenas e médias indústrias de laticínios e é encontrado em grande escala na América do Sul, principalmente Brasil e Argentina sendo formulado a partir da concentração por ação de calor (DEMIATE *et al.*, 2001a; PERRONE *et al.*, 2008; VIEIRA *et al.*, 2011).

De acordo com os últimos dados da Pesquisa Industrial Anual (PIA) divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a produção de doce de leite no Brasil é de 345,19 milhões de reais, o que equivale a 0,82% do que é produzido pelo setor de laticínios no país.

Segundo o Instituto de Desenvolvimento Integrado de Minas Gerais, em 2009, 50 % da produção brasileira de doce de leite estão concentradas em Minas Gerais (INDI, 2009 *apud* COLOMBO *et al.*, 2009). Apesar da importância do doce de leite no mercado brasileiro desde 2007 o país tem mantido um saldo deficitário na balança comercial deste alimento. Argentina e Uruguai têm sido os principais fornecedores do produto para <sup>1</sup>o Brasil (MDIC, 2015).

O Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior via Internet (ALICEWeb), em 2015<sup>2</sup> determinou que do total importado pelo Brasil de doce de leite, 95,46% é de origem argentina e 4,54% uruguaia. Em relação aos países de destino do produto brasileiro, em 2015, têm destaque os Estados Unidos da América (EUA), Bolívia, Paraguai, Costa Rica, Reino Unido, Chile, Uruguai e Holanda, com contribuição de respectivamente, 56,37%, 15%, 13,92%, 9,67%, 2,62%, 0,99%, 0,81%, 0,61%.

De acordo com Brasil (1997), “entende-se por doce de leite o produto, com ou sem adição de outras substâncias alimentícias, obtido por concentração e ação do calor a pressão normal ou reduzida do leite ou leite reconstituído, com ou sem

---

<sup>1</sup>Os dados mais recentes da PIA são do ano de 2013.

<sup>2</sup> Em 2015 estão disponíveis informações até o mês de agosto.

adição de sólidos de origem láctea e/ou creme e adicionado de sacarose (parcialmente substituída ou não por monossacarídeos e/ou outros dissacarídeos)”.

Tal legislação estabelece como ingredientes obrigatórios na formulação de doce de leite o leite e/ou leite reconstituído e a sacarose indicando ainda valores mínimos e máximos para os atributos umidade, matéria gorda, teor de cinzas e proteínas.

O DL não deve conter gordura ou proteína de origem não láctea. O mesmo é obtido pela concentração do leite adicionado de açúcar, que usualmente é a sacarose. Em alguns casos pode-se substituir parte da sacarose por glicose o que confere melhora da textura, brilho, redução na formação e crescimento dos cristais de lactose e aumento da viscosidade do produto (DEMIATE *et al.*, 2001b; PERRONE, 2007).

O calor e a concentração que o doce de leite é submetido podem levar a uma série de defeitos no produto como a desestabilização das proteínas resultando na precipitação deste macronutriente. Devido a esta situação o emprego de redutores de acidez e/ou estabilizantes corresponde a uma maneira de reduzir ou evitar tal precipitação, além de auxiliar no desenvolvimento da cor do produto. Um dos redutores de acidez mais utilizados é o bicarbonato de sódio (BELLARDE, 2001; PERRONE, 2007).

As características sensoriais como *flavor* e coloração são fundamentalmente em decorrência da reação de escurecimento não-enzimático (reação de Maillard) que ocorre durante a fabricação pelo intenso tratamento térmico que o leite e açúcar sofrem. Apesar do benefício do ponto de vista sensorial, esta reação pode alterar a característica nutricional do alimento, por exemplo, reduzindo a concentração de aminoácidos essenciais como a lisina (DEMIATE *et al.*, 2001a; PERRONE *et al.*, 2008).

## **2.2 Tecnologia de fabricação do doce de leite**

Originário da América Latina, o doce de leite é um dos derivados lácteos mais fabricados no Brasil, apresenta-se em pasta ou em barra, obtendo baixo teor de água o que facilita sua conservação à temperatura ambiente (VIEIRA e JÚNIOR, 2004).

A matéria prima deste produto corresponde basicamente a leite, açúcar e redutor de acidez, sendo que a mesma deve ser de boa qualidade e de fornecedor confiável para que o produto final obtenha a característica esperada. O leite utilizado para a elaboração deste alimento deve ser seguro do ponto de vista microbiológico, apresentar estabilidade ao processamento térmico e exibir preferencialmente alto teor de sólidos (PERRONE *et al.*, 2011a; VIEIRA e JÚNIOR, 2004).

O doce de leite pode ser fabricado artesanalmente ou em tachos por batelada ou tachos de forma contínua ou em evaporadores a vácuo ou evaporadores em tacho. O tacho normalmente possui uma camisa interna em aço inox e uma camisa externa para entrada de vapor e é o trocador de calor mais empregado na fabricação deste produto (PERRONE, 2007).

O primeiro passo na tecnologia de fabricação do doce de leite corresponde à mistura entre leite, açúcar e os demais ingredientes o que vai formar uma calda a qual será submetida à desidratação. Esta calda permanecerá em constante movimento pelo auxílio de agitadores mecânicos durante todo o processo de fabricação, impedindo que o produto queime ou se deposite na parede do equipamento (PERRONE, 2007; VIEIRA e JÚNIOR, 2004).

Com o decorrer da produção do doce de leite ocorre a evaporação da água do leite, com desidratação pela pressão atmosférica ou reduzida através da troca de calor com vapor indireto. Esta concentração torna o produto mais atrativo do ponto de vista sensorial, aparência, armazenamento e transporte (PERRONE, 2007).

A fabricação total pode variar de 40 min a 4 h o que é dependente do tipo de equipamento utilizado e da quantidade de vapor injetado. O tempo é determinante nas características do produto final como a viscosidade, a cor e o sabor (PERRONE, 2007).

O ponto final do doce de leite pode ser verificado através de duas diferentes formas, uma é pela determinação do teor de sólidos solúveis (acima de 66°Brix) e a segunda corresponde à investigação subjetiva de liberação de pequena quantidade de doce em um copo de água. Após atingir o ponto, o produto final deve ser esfriado a temperatura de 75°C a 80°C e embalado ainda quente em latas ou copos até que estejam completamente cheios para evitar possíveis contaminações por microrganismos. Em geral, há um gasto de 2,5 L de leite para produzir cerca de 1 kg de doce. A conservação do produto deve ser feita em temperatura ambiente por um

período que varia entre 160 dias e 180 dias (GALLINA *et al.*, 2009; PERRONE *et al.*, 2011a; VIEIRA e JÚNIOR, 2004).

### 2.3 Reação de Maillard no alimento

Existem diferentes tipos de escurecimento dos alimentos o qual acontece rotineiramente tanto a nível residencial quanto industrial. O escurecimento enzimático corresponde àquele que resulta em descoloração oriunda de reações catalisadas por uma enzima conhecida por polifenol oxidase (PPO). Tal enzima age principalmente sobre frutas e vegetais gerando consequências negativas como perdas econômicas, diminuição do valor nutritivo, alterações de sabor e aparência do alimento ou desejáveis como no caso de alimentos como chá, café, cacau e ameixa seca (ARAÚJO, 2008; FENNEMA, 2010).

Há também o escurecimento não-enzimático, mais lento do que o escurecimento enzimático por não ter a enzima catalisadora da reação, é representado pela caramelização, reação de Maillard e oxidação do ácido ascórbico (vitamina C). Cada alimento, de acordo com suas características, vai apresentar um escurecimento específico, já que a velocidade da reação é dependente da natureza dos componentes reativos dos alimentos (ARAÚJO, 2008; BRIÃO *et al.*, 2011).

Dentre as reações de escurecimento não-enzimático destaca-se a reação de Maillard, a mesma foi descoberta em 1912 por Louis-Camille Maillard durante a tentativa da síntese de peptídeo em condições fisiológicas. É objeto de grande interesse na atualidade, estando relacionado com aspectos químicos, organolépticos, nutricionais, toxicológicos e manifestações *in vivo* (BASTOS *et al.*, 2011; CHARISSOU *et al.*, 2007; NUNES e BAPTISTA, 2001).

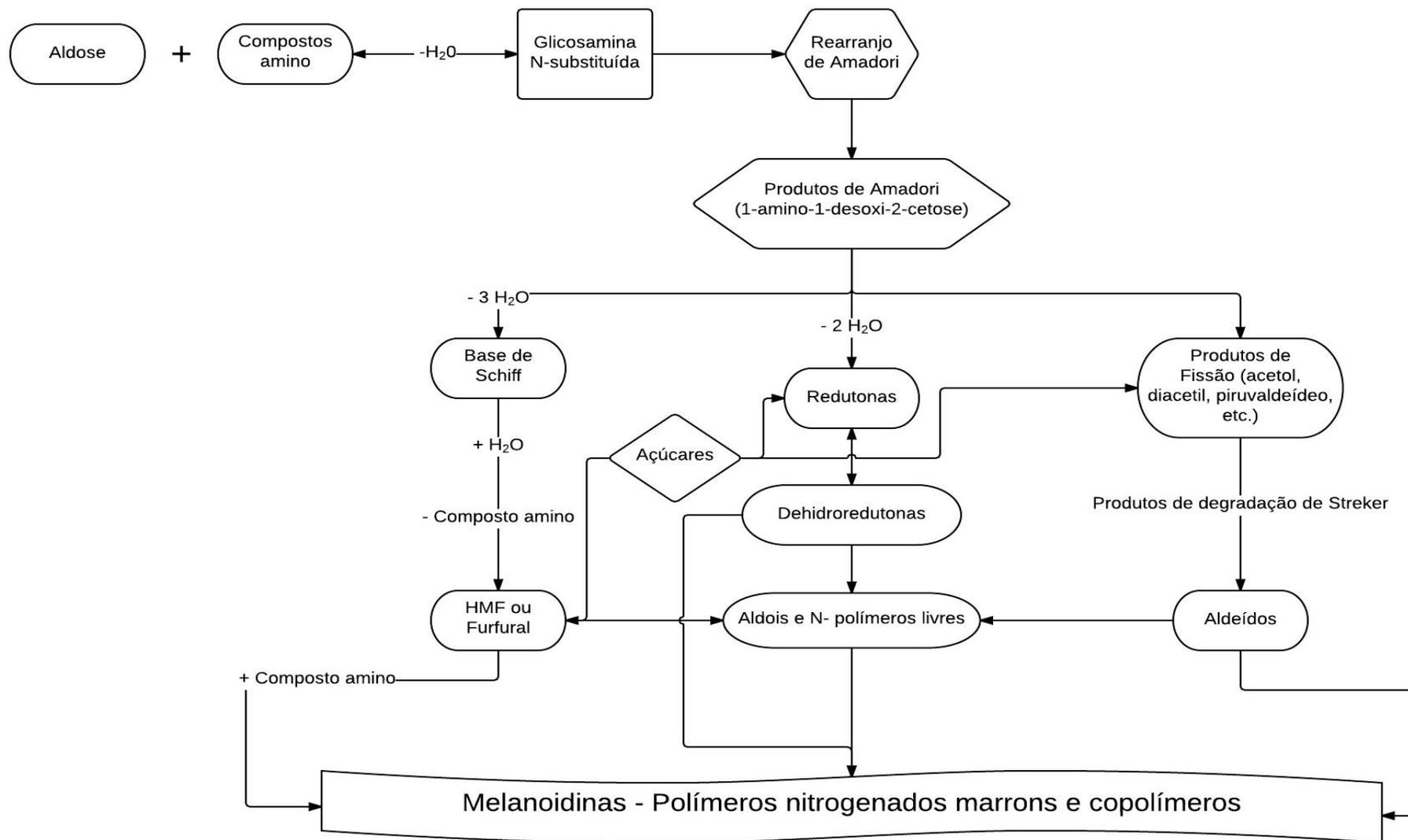
A reação de Maillard é representada por uma complexa cascata de reações, que surge principalmente durante o aquecimento e armazenamento prolongado de produtos alimentícios resultando em modificações positivas ou negativas na qualidade dos alimentos, favorecendo a formação de compostos responsáveis pelo aroma, sabor, cor dos alimentos tratados termicamente. Esta reação é subdividida em três estágios: estágio inicial, estágio intermediário e estágio final (ARAÚJO, 2008; BASTOS *et al.*, 2011; VAN BOEKEL, 1998; BRIÃO *et al.*, 2011; CHARISSOU *et al.*, 2007; FENNEMA, 2010; FAYLE e GERRARD, 2002; NUNES e BAPTISTA, 2001; SILVA, 2004).

O estágio inicial consiste na condensação do grupo carbonila do açúcar redutor com o grupamento amino livre de aminoácidos, peptídeos ou proteínas, o que ocorre através do ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio do grupo amino, levando ao início da reação. Como consequência desta condensação há formação da base de Schiff instável que libera água e forma uma glicosilamina. Assim, esta base de Schiff sofre rearranjos sequenciais produzindo uma aminocetose razoavelmente estável conhecida como produto de Amadori (açúcar aldose) ou produto de Heyns (açúcar cetose). Estes produtos, desenvolvidos no estágio inicial, são estáveis e não possuem cor, fluorescência ou absorção na região ultravioleta resultando em uma enorme variedade de produtos em distintas proporções (ARAÚJO, 2008; BASTOS *et al.*, 2011; VAN BOEKEL, 1998; BRIÃO *et al.*, 2011; CHARISSOU *et al.*, 2007; FENNEMA, 2010; NUNES e BAPTISTA, 2001; SILVA, 2004; FAYLE e GERRARD, 2002).

Com o prolongamento do aquecimento ou armazenamento inicia-se a segunda fase. Os produtos de Amadori ou produtos de Heyns são fragmentados e originam uma série de reações como desidratação, enolização e retroaldolização. Nesta etapa intermediária, surgem os compostos dicarbonílicos, redutonas, derivados do furfural e produtos da degradação de Strecker, podendo ocorrer o aparecimento de um derivado furano que origina uma hexose comumente conhecida por 5-hidroxiacetilfurfural (ARAÚJO, 2008; BASTOS *et al.*, 2011; VAN BOEKEL, 1998; BRIÃO *et al.*, 2011; CHARISSOU *et al.*, 2007; FENNEMA, 2010; NUNES e BAPTISTA, 2001; SILVA, 2004; FAYLE e GERRARD, 2002; SHIBAO e BASTOS *et al.*, 2011).

Os compostos originados na fase intermediária são fluorescentes e com capacidade de absorção da radiação na região ultravioleta. Os mesmos são cíclicos e altamente reativos, se polimerizando junto com resíduos de lisina ou arginina em proteínas, resultando em compostos estáveis e culminando na formação de pigmentos escuros conhecidos como melanoidinas. Estes pigmentos levam à coloração dos alimentos sendo desejáveis ou indesejáveis e fazendo parte do estágio final da reação de Maillard (ARAÚJO, 2008; BASTOS *et al.*, 2011; VAN BOEKEL, 1998; BRIÃO *et al.*, 2011; CHARISSOU *et al.*, 2007; FENNEMA, 2010; NUNES e BAPTISTA, 2001; SILVA, 2004; FAYLE e GERRARD, 2002).

Para o melhor entendimento das diferentes etapas da RM nos alimentos foi elaborado um resumo esquemático estando apresentado na Figura 1.



**Figura 1.** Principais etapas da reação de Maillard em alimentos, adaptado pelo autor a partir dos trabalhos de Ames (1998), Bastos *et al.* (2012), McSweeney e Fox (2009), Martins *et al.* (2001).

A reação de Maillard pode ser afetada por diversos fatores entre eles a temperatura e o pH. A velocidade desta reação é lenta a temperaturas mais baixas e praticamente duplica a cada aumento de 10°C entre 40°C e 70°C. O pH também exerce efeito sobre a intensidade da reação, assim a descoloração máxima incide principalmente na faixa alcalina entre pH 9 e 10 (ARAÚJO, 2008; BASTOS *et al.*, 2011; BELLARDE, 2001; FENNEMA, 2010; NUNES e BAPTISTA, 2001).

O tipo de amina influencia diretamente na facilidade de desenvolvimento da RM. Os aminoácidos de alta reatividade representados pela lisina, glicina, triptofano, tirosina facilitam a ocorrência da reação quando comparados com os de reatividade média como prolina, leucina, isoleucina, hidroxiprolina, metionina e com os de fraca reatividade como histidina, treonina, ácido aspártico, ácido glutâmico e cisteína. A lisina, por apresentar o grupo amino épsilon livre, apresenta alta reatividade sendo mais susceptível à reação (carbonila-amino) o que pode reduzir o valor nutricional do alimento (ARAÚJO, 2008; BASTOS *et al.*, 2011; FENNEMA, 2010; NUNES e BAPTISTA, 2001).

O açúcar redutor é essencial para que a reação de Maillard aconteça, as pentoses são mais reativas que as hexoses que são mais reativas que os dissacarídeos. Este tipo de escurecimento sucede com maior ênfase nos valores intermediários de atividade de água (0,5 e 0,8) e em umidade relativa entre 30% e 70%. Isto porque em baixa atividade de água (0,2 a 0,25) a velocidade tende a zero por uma diminuição de solvente e em altos valores (0,9) os reagentes se encontram muito diluídos o que diminui a velocidade de escurecimento (ARAÚJO, 2008; BASTOS *et al.*, 2011; BELLARDE, 2001; FENNEMA, 2010; NUNES e BAPTISTA, 2001).

Além destes fatores, os íons metálicos (ferro e cobre), luz, sulfito, condições de armazenagem, tipo, tempo e temperatura do tratamento térmico e método de cozedura dos alimentos podem ser considerados interferentes nesta reação (ARAÚJO, 2008; BASTOS *et al.*, 2011; BELLARDE, 2001; FENNEMA, 2010; NUNES e BAPTISTA, 2001).

A extensão da reação de Maillard pode ser monitorada pelo surgimento de compostos o que permite avaliar a intensidade do processamento térmico e as alterações nutricionais relacionadas a ele. Entre estes compostos estão: a furosina, o hidroximetilfurfural e a carboximetilisina (RUFÍAN HENARES *et al.*, 2009a e 2009b; CHARISSOU *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2008).

## 2.4 Produtos da reação de Maillard (PRM)

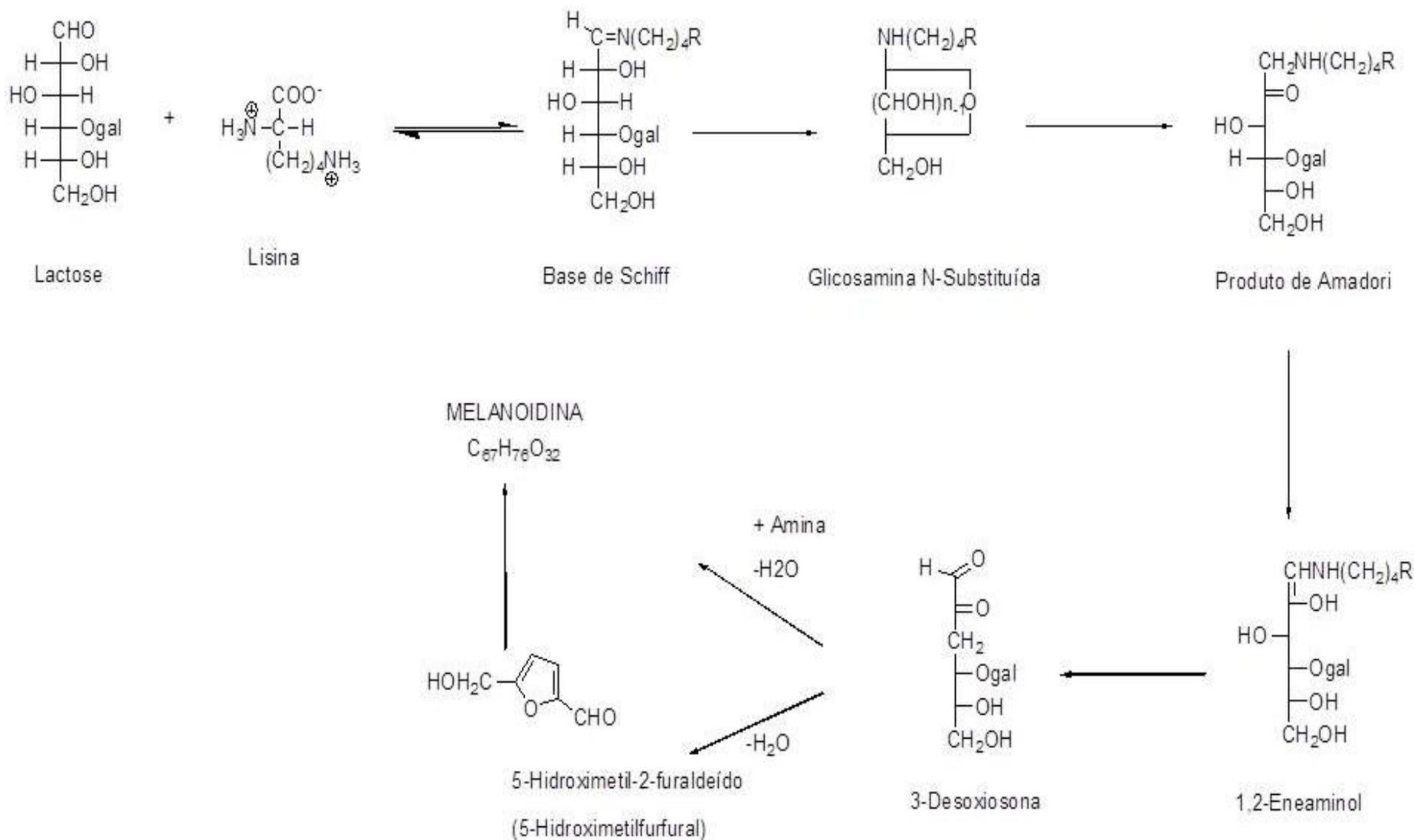
Os PRM são consumidos diariamente pela população, por meio da ingestão de alimentos como leite, produtos de panificação, cereais infantis e matinais, caramelo, mel, café, cerveja, chocolate, carnes, vegetais desidratados e frutas processadas apresentando um importante papel tecnológico e sensorial para a indústria de alimentos por suas propriedades antioxidantes, *flavor*, aroma, odor, textura e coloração (ANDRADE *et al.*, 2008; ANDRADE, 2014; RUFIAN, 2009a; RUFIAN, 2009b; SHIBAO e BASTOS, 2011; YILDIZ, 2010; SHIBAO, 2010).

Em geral alimentos ricos em lipídeos e que são submetidos a calor seco como grelhados, fritos e assados apresentam os maiores teores de produtos da reação de Maillard enquanto que métodos mais brandos de aquecimento como ensopados e a vapor apresentam menores teores (BASTOS *et al.*, 2011; SHIBAO e BASTOS, 2011).

Sabe-se que os PRM correspondem a um grupo heterogêneo de substâncias de baixo peso molecular. O HMF é considerado um destes produtos e não existe em alimentos crus e frescos, porém é produzido rapidamente durante o processamento térmico e no armazenamento prolongado, principalmente em alimentos ricos em carboidratos e lipídeos (ROSATELLA *et al.*, 2011; RUFIAN, 2009a; RUFIAN, 2009b; VORLOVA *et al.*, 2006).

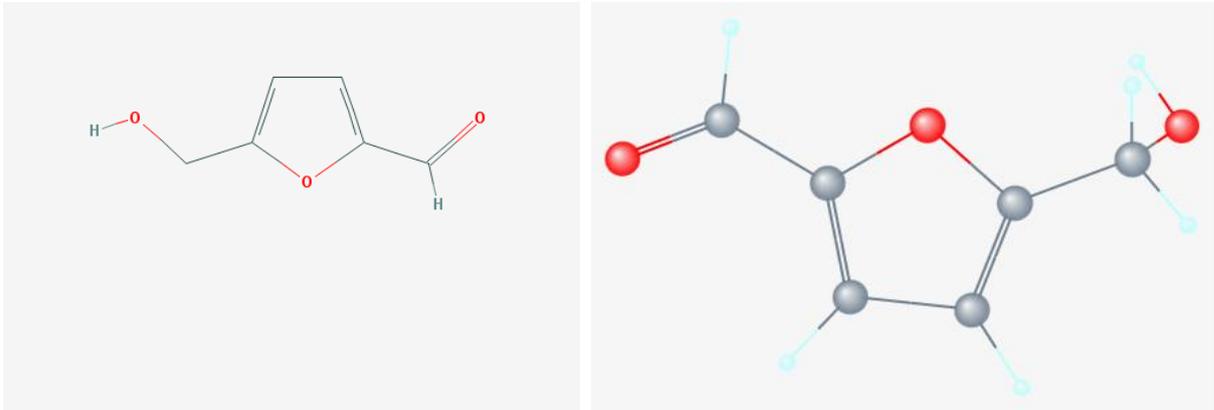
O 5-hidroximetilfurfural foi relatado pela primeira vez no final do século 19, a partir da descrição da sua síntese por aquecimento da inulina com uma solução de ácido oxálico sob pressão e este produto foi primeiro revisado em 1951 (ROSATELLA *et al.*, 2011).

Em temperaturas acima de 100°C os produtos de enolização que são formados durante o estágio intermediário da reação de Maillard, sofrem desidratação com fragmentação do açúcar e degradação de aminoácidos. A desidratação do açúcar neste caso, pode acontecer de duas formas dependentes do pH. Em condições ácidas com pH menor ou igual a 7 há formação desta hexose nomeada pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) de 5-(hidroximetil)furan-2-carbaldeído a mesma também é conhecida por 5-hidroximetilfurfural ou 5-hidroxi-2-metilfuraldeído ou hidroximetilfurfural ou 5-Hidroximetilfuraldeído (YILDIZ, 2010; NCBI, 2005). Para maior esclarecimento, foi elaborada uma sequência esquemática (Figura 2) das etapas da reação de Maillard ressaltando a via de formação do HMF.



**Figura 2.** Resumo esquemático das etapas da reação de Maillard destacando o HMF, adaptado pelo autor a partir dos trabalhos de Van Boekel (1998), Fennema *et al.* (2010), Perrone *et al.* (2011a), Nursten (2005), Fox (1998), elaborado pelo autor.

A fórmula molecular do HMF é  $C_6H_6O_3$ . As fórmulas estruturais deste produto intermediário da reação de Maillard podem ser visualizadas na Figura 3.



**Figura 3.** Fórmulas estruturais do 5-hidroxi metilfurfural, NCBI (2005).

Algumas características das propriedades físicas, químicas e experimentais do HMF podem ser visualizadas na Tabela abaixo.

**Tabela 1.** Propriedades físicas, químicas e experimentais do 5-hidroxi metilfurfural

Propriedades	Característica do HMF
Peso molecular	126,11004 g.mol <sup>-1</sup>
Coloração	Sólido cristalino
Odor	Flores de camomila
Textura	Manteiga, caramelo ou mofado
Ponto de fusão	31,5 °C
Solubilidade em água	7,0x10+5 g.mL <sup>-1</sup> a 25°C
Muito solúvel	Metanol, etanol, acetona, acetato de etilo, dimetilformamida
Solúvel	Éter, benzeno, clorofórmio
Pouco solúvel	Éter de petróleo
Densidade	1,2062 g.mL <sup>-1</sup> a 25°C
Pressão de vapor	5,28x10 <sup>-3</sup> mmHg a 25°C

Fonte: Elaborado pelo autor a partir de NCBI (2005).

O HMF é cíclico e um marcador da fase intermediária da reação de Maillard sendo reativo, dependente da severidade do tratamento térmico empregado no alimento e podendo se polimerizar com grupos amino originando materiais

insolúveis, de maior massa molar, que contém nitrogênio e coloração que pode variar de marrom a preto conhecidas como melanoidinas (FENNEMA, 2010; SHIBAO e BASTOS, 2011). As melanoidinas apresentam efeitos biológicos positivos por suas atividades antioxidantes, benefícios prebióticos, função anti-hipertensiva, atividade bacteriostática, prevenção de doenças dentárias, redução do risco de câncer, ação antiinflamatória (ANDRADE, 2014; SAKKAS, 2014).

Lechner (1982) citado por Pinto e Wolfschoon-Pombo (1984) assegura que a denominação teor de HMF para aqueles que utilizam a metodologia de Kenney e Basete (1959) não é adequada, sendo assim o mesmo autor sugere a utilização do termo: “valor de HMF” ou “índice de ácido tiobarbitúrico”. Neste trabalho o termo utilizado será índice de HMF.

Percebe-se que as gerações atuais começam a ingerir alimentos ricos em produtos da reação de Maillard cada vez mais cedo. As fórmulas infantis e alimentos de fácil preparo como *fast food*, frituras e industrializados muitas vezes apresentam altas concentrações dos PRM (ANDRADE, 2014; BASTOS *et al.*, 2011; ROJAS e MORALES, 2004; TAN, 2002).

Um dos pontos negativos mais evidentes do escurecimento dos alimentos e dos produtos formados a partir dele corresponde à destruição ou redução do valor nutricional de aminoácidos essenciais como arginina, lisina, metionina e triptofano além de redução da digestibilidade do alimento (IKAN, 1996; MARTINS *et al.*, 2001; YILDIZ, 2010). Além disto, o HMF pode estar relacionado com danos ao DNA, formação de inibidores do crescimento e atividades citotóxicas, genotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas (GLATT *et al.*, 2005; IKAN, 1996; MARTINS *et al.*, 2001; MONARO, 2012; SILVA *et al.*, 2008; TEIXIDÓ *et al.*, 2006; YILDIZ, 2010).

Os produtos da reação de Maillard presentes nas dietas podem elevar os níveis séricos dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) estando diretamente relacionados com aumento do estresse oxidativo, tais como disfunções orgânicas e aumento dos níveis de moduladores inflamatórios (CAI *et al.*, 2007; VLASSARA *et al.*, 2008).

## **2.5 Reação de Maillard *in vivo* (glicação)**

A reação de Maillard também pode acontecer *in vivo* tornando-se conhecida como glicação, a mesma ocorre nos tecidos e corpos fluidos estando normalmente

associada a condições patofisiológicas, se envolvendo com a formação dos produtos finais de glicação avançada (KUNKEL e WALLENIUS, 1955; URIBARRI *et al.*, 2010; VISTOLI *et al.*, 2013).

Os AGEs, também conhecidos como glicotoxinas, apresentam estruturas variadas, sendo dependentes das características individuais, do tipo de alimento ingerido e do método do tratamento térmico empregado. Os mesmos surgem pela reação de Maillard ou pela glicação as quais são iniciadas pela associação entre açúcares redutores e grupos amino livres de proteínas, lipídios ou ácidos nucleicos (BARBOSA *et al.*, 2008; POULSEN *et al.*, 2013; URIBARRI *et al.*, 2010).

Os AGEs são originados endogenamente, fazendo parte do metabolismo normal, podendo neste caso prevenir doenças como diabetes tipo I, além de facilitar a proliferação da íntima após angioplastia, melhorar a sensibilidade à insulina, auxiliar na cicatrização de feridas. Porém, se os níveis de AGEs forem excessivamente elevados, como em condições de hiperglicemia ou estresse oxidativo, podem alcançar os tecidos e a circulação tornando-se patogênicos (BARBOSA *et al.*, 2008; GOLDBERG *et al.*, 2004; POULSEN *et al.*, 2013; URIBARRI *et al.*, 2010; VISTOLI *et al.*, 2013; VLASSARA *et al.*, 2008).

Em adição aos produtos finais de glicação avançada que se formam no interior do corpo, existem os provenientes dos alimentos. A formação dos AGEs endógenos sucede em baixas temperaturas quando comparados com os dietéticos, desta forma existe uma menor quantidade de compostos formados *in vivo* quando comparado com aqueles formados nos alimentos, além disto a quantidade de AGEs ingeridos normalmente é maior do que a quantidade formada no plasma sanguíneo ou nos tecidos. As duas fontes principais peculiares ao estilo de vida moderno, que fornecem uma oferta crescente de AGEs exógenos, são a alimentação e o tabagismo, sendo que da fração total absorvida cerca de dois terços são retidos no organismo e apenas um terço é excretado pela urina (BARBOSA *et al.*, 2008; POULSEN *et al.*, 2013; VLASSARA *et al.*, 2008).

O método de preparo e a composição de nutrientes do alimento podem influenciar na maior ou menor quantidade de AGEs, alimentos submetidos a altas temperaturas e baixa umidade como grelhados, assados, tostados, secos e fritos ou alimentos ricos em lipídeos/proteínas ou ainda alimentos processados por calor seco como chips, cookies, bolachas normalmente são aqueles que apresentam maior teor

destes produtos (BARBOSA *et al.*, 2008; GOLDBERG *et al.*, 2004; URIBARRI *et al.*, 2010).

Normalmente o grupo de alimentos que contém menor quantidade de AGEs são aqueles que apresentam em sua constituição carboidratos como os amidos, as frutas, os legumes e o leite, provavelmente esta situação acontece pelo maior teor de água, maior nível de antioxidantes e vitaminas ou pelo fato de que nesta categoria de alimentos, a maioria dos polissacarídeos consistem em açúcares não redutor (GOLDBERG *et al.*, 2004; URIBARRI *et al.*, 2010).

De acordo com a pirâmide alimentar atual o grupo dos cereais, pães, tubérculos, raízes e massas são os alimentos que devem ser ingeridos em maior quantidade durante o dia. Isto pode resultar em uma maior ingestão de produtos da reação de Maillard ou AGEs o que pode conseqüentemente afetar o *pool* endógeno auxiliando para o excesso destes produtos no organismo modificando suas características positivas para negativas.

## **2.6 Atributos composicionais e físico-químicos**

O conhecimento da composição dos alimentos auxilia para a determinação da qualidade nutricional, estabilidade ao processamento térmico e aprovação para o consumo humano (PEREIRA *et al.*, 2001).

### **2.6.1 Umidade**

A água corresponde a um dos componentes principais e fundamentais para os alimentos, está presente extracelular ou intracelularmente na forma de água fortemente ligada, água capilar e/ou água livre tanto nos alimentos de origem vegetal quanto nos alimentos de origem animal, podendo influenciar a conformação das macromoléculas destes alimentos (DeMAN, 1999; FELLOWS, 2006; FENNEMA, 2010).

A vida-de-prateleira de um produto assim como a textura, consistência e viscosidade estão diretamente relacionados com o teor de água. A associação entre a atividade de água e água ligada resulta no total de água do alimento que é representado pelo teor de umidade. Este teor de umidade, se relaciona com

temperatura e pH sendo que tais atributos apresentam grande importância para a tecnologia de alimentos (FOX, 1998; KUROISHI *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Os produtos lácteos possuem modificações em sua estrutura química, física e microbiológica, principalmente em decorrência da influência da umidade. Estes podem sofrer processos de concentração e desidratação com o objetivo de diminuir o conteúdo de água com concentração dos solutos e redução da perecibilidade do produto. O doce de leite pastoso corresponde a um destes produtos lácteos concentrados o que provoca sua baixa umidade e boa conservação (DEMIATTE, 2001; FELLOWS, 2006; FENNEMA, 2010; FOX, 1998; PERRONE *et al.*, 2008).

### **2.6.2 Lipídeos**

Cerca de 90% dos lipídeos são encontrados na forma de triacilgliceróis em quase todos os tipos de alimentos. Este macronutriente é passível de modificações químicas durante processamento, armazenamento e consumo, representando um dos principais componentes insolúveis em água (ARAÚJO, 2008).

Os produtos lácteos são importantes fontes de ácido linoléico conjugado (CLA) que quando ingeridos podem estar relacionados com a redução do risco de desenvolvimento de doença cardiovascular, câncer e doença de Alzheimer (FÁ *et al.*, 2005; GAMA *et al.*, 2015). Sabe-se que o doce de leite é um derivado lácteo, apresentando as gorduras provenientes destes produtos, o que pode resultar em benefícios para a saúde.

### **2.6.3 Proteínas**

As proteínas correspondem a polímeros constituídos por aminoácidos e ligados entre si por ligações peptídicas, a sua diversidade funcional resulta principalmente de sua composição química. O leite, a carne, os ovos, os cereais e as leguminosas são as principais fontes de proteínas alimentares (ARAÚJO, 2008; FENNEMA, 2010).

Sabe-se que o tratamento térmico pode aumentar a vida de prateleira dos alimentos, melhorar sua palatabilidade e digestibilidade, elevar a disponibilidade de aminoácidos além de tornar o alimento mais atrativo sensorialmente. Em contrapartida, as condições de processamento e armazenamento em que as

proteínas são expostas, como elevado pH ou aquecimento severo, podem resultar em diversas alterações na cadeia lateral dos aminoácidos levando a uma perda de funcionalidade e qualidade nutricional deste nutriente (ARAÚJO, 2008).

As principais proteínas presente no leite e derivados, conseqüentemente no doce de leite, correspondem às caseínas e proteínas do soro que possuem grande qualidade nutricional fornecendo quantidade e qualidade de aminoácidos (DEMIATE *et al.*, 2001a; LOBATO, 2007).

#### **2.6.4 Cinzas**

As cinzas, também conhecida por resíduo mineral fixo, são um dos componentes centesimais dos alimentos, fornecendo uma ideia bruta do conteúdo mineral incluindo óxidos metálicos, sulfatos, fosfatos, nitratos, cloretos e outros halogenatos (FENNEMA, 2010).

#### **2.6.5 Carboidratos**

Os carboidratos são abundantes, amplamente disponíveis, de baixo custo e frequentemente presente nos alimentos podendo ser naturais ou adicionados como ingredientes. São consumidos em grande quantidade e têm muitas estruturas moleculares, tamanhos e configurações diferentes (DeMAN, 1999; FENNEMA, 2010).

O termo carboidrato sugere uma composição elementar geral, representando moléculas que apresentam átomos de carbono juntamente com átomos hidrogênio e oxigênio, na mesma proporção que ocorrem na água (FENNEMA, 2010).

A sacarose é um oligossacarídeo que existe em várias plantas e é comercialmente obtido a partir da cana de açúcar e da beterraba. Este oligossacarídeo é altamente solúvel o que faz dele ser um bom ingrediente para formulação de alimentos. A sacarose é formada pela fusão de uma molécula de glicose com uma molécula de frutose, podendo ser encontrada refinada ou cristal. É o tipo de açúcar mais empregado na fabricação de doce de leite e sua qualidade é crucial na tecnologia de fabricação, pois pode influenciar, dentre outros fatores, na cristalização do produto final (DeMAN, 1999; PERRONE *et al.*, 2011a).

A lactose é considerada uma molécula pré-biótica favorecendo o desenvolvimento da bactéria bífido e aumentando a absorção de cálcio e vitamina D. É o carboidrato principal e mais predominante do leite. Este açúcar é formado por glicose e galactose unidas por ligação glicosídica  $\beta$  (1,4) sendo composta por D-glicose e D-galactose, sofre saturação e supersaturação durante a concentração do leite na fabricação do doce de leite. A concentração de lactose nos produtos lácteos varia de acordo com as diversas espécies de animais. Tal açúcar contribui para o valor nutritivo, textura, cor e *flavor* dos produtos lácteos (FOX, 1998; PERRONE *et al.*, 2011a).

Como o doce de leite é formulado a partir da fusão de leite e açúcar, o mesmo apresentará carboidrato proveniente do leite (lactose) e carboidrato proveniente do açúcar empregado na formulação (glicose e/ou sacarose). Assim, a quantidade e qualidade dos carboidratos empregados na formulação do doce de leite vão influenciar, consideravelmente, na característica de *flavor*, textura, cor e na velocidade da reação de Maillard no produto final.

### **2.6.6 Teor de sólidos solúveis**

O teor de sólidos solúveis são as substâncias solúveis em água como carboidratos, vitaminas e sais, estando incluídos nos sólidos totais de um alimento.

A determinação do ponto do doce de leite realizado através do teor de sólidos solúveis em °Brix é de grande relevância tanto no início quanto no final da tecnologia de fabricação. Este ponto indica se o doce está pronto ou não para ser envasado e posteriormente armazenado e comercializado. Quanto maior o teor de sólidos solúveis na matéria prima leite maior o rendimento na fabricação do doce de leite, menor o tempo de evaporação e menor os gastos com a fabricação (PERRONE *et al.*, 2011a; PERRONE *et al.*, 2012).

### **2.6.7 Atividade de água**

A água que se encontra nos alimentos pode estar ligada às moléculas constituintes dos produtos não sendo desassociada e nem utilizada em reações químicas. Esta água também pode estar disponível nos alimentos para as reações físicas, químicas e microbiológicas a qual é conhecida por atividade de água ou

pressão de vapor relativa (PVR) e definida como sendo: “a razão da pressão de vapor da água no alimento (P) e a pressão de vapor saturada da água ( $P_o$ ) na mesma temperatura ( $a_w = P/P_o$ )”. A atividade de água pode ser reduzida no alimento pela desidratação, liofilização, concentração por congelamento e aquecimento (FELLOWS, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2008, WONG *et al.*, 1999).

A  $A_w$  pode ser utilizada como uma forma de controle da taxa de deterioração de produtos alimentícios, sendo uma medida para mensurar a susceptibilidade do alimento à degradação, auxiliando para determinação da vida de prateleira, do tipo de embalagem e das condições de armazenamento do produto. Quando estes valores superam o valor de 0,90 nos alimentos percebe-se uma maior chance de desenvolvimento de microrganismo (FELLOWS, 2006; FERREIRA, 2012; KUROIISHI *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2008; PERRONE *et al.*, 2012).

O doce de leite não é um produto favorável para o crescimento de microrganismos, portanto é um alimento microbiologicamente estável e higroscópico por ser industrializado, por sua concentração de carboidratos e pela baixa atividade de água. Porém, não se pode descartar a hipótese de uma possível contaminação, como por exemplo, crescimento de bolores, leveduras e microrganismos mesófilos aeróbicos durante sua estocagem. Com isso, evidencia uma necessidade de medidas higiênicas sanitárias satisfatórias durante todo o processo de produção, armazenamento e comercialização do produto (FELLOWS, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2008; SÁ, 2012a; TIMM *et al.*, 2007).

### **2.6.8 Amido**

O amido é um polissacarídeo não redutor composto basicamente pela mistura de dois polímeros um polissacarídeo linear chamado de amilose o qual possui ligações  $\alpha$  (1,4) que se une com maior intensidade umas às outras e um polissacarídeo ramificado conhecido por amilopectina com ligações  $\alpha$  (1,4) e  $\alpha$  (1,6) que tendem a ficar mais afastadas umas das outras por suas ramificações (FENNEMA, 2010; PERRONE *et al.*, 2011b; PERRONE *et al.*, 2008).

O milho e a mandioca são fontes de amido de destaque na natureza, já que o mesmo é um produto amiláceo extraído de vegetais. O amido apresenta numerosas aplicações como adesão, função ligante, gelificante, estabilizante, texturizante, espessante e ainda retém umidade (FENNEMA, 2010; PERRONE *et al.*, 2011b;

PERRONE *et al.*, 2008). Sendo assim o mesmo é utilizado na fabricação do doce de leite com a finalidade de aumento da viscosidade e do rendimento do produto, porém, em concentrações aumentadas pode representar fraude, causar sinérese ou retrogradação e reduzir a qualidade sensorial do produto fabricado.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Quantificar os teores de 5-hidroximetilfurfural como indicador nutricional e da intensidade do tratamento térmico, além de realizar análises físico-químicas e composicionais em amostras comerciais e em doce de leite experimental elaborado com diferentes formulações.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Realizar processamentos experimentais de doce de leite, para testar diferentes formulações e avaliar os efeitos na formação de HMF no produto.
- Quantificar, com base na análise de diferentes amostras comerciais de doces de leite e de doces experimentais, os atributos físico-químicos (atividade de água, teor de sólidos solúveis e análise qualitativa de amido) e composicionais (umidade, proteínas, lipídeos, carboidratos e cinzas).
- Avaliar os doces de leite comerciais e experimentais em relação ao 5-hidroximetilfurfural, como indicador de tratamento térmico.
- Analisar 5-hidroximetilfurfural, verificando sua evolução ao longo da fabricação e no armazenamento dos doces de leite experimentais.
- Acompanhar o teor de sólidos solúveis durante a fabricação dos doces de leite experimentais.
- Construir curvas de taxa de evaporação de água e do percentual de água evaporada, ambas em relação ao tempo durante a fabricação dos doces experimentais.
- Comparar os resultados obtidos para os doces de leite comerciais em relação aos resultados encontrados nos doces de leite experimentais.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Aquisição dos doces de leite comerciais**

Foram analisadas nove diferentes marcas comerciais de doce de leite. Os produtos foram adquiridos no mercado da Zona da Mata de MG e foram escolhidos aleatoriamente. As compras foram efetivadas no mês de fevereiro e março do ano de 2015 e as análises foram realizadas em abril do mesmo ano. A maior parte dos doces estava com cerca de quatro meses de fabricação quando foram analisados. As amostras adquiridas apresentavam uma variação de quatro meses a um ano de validade.

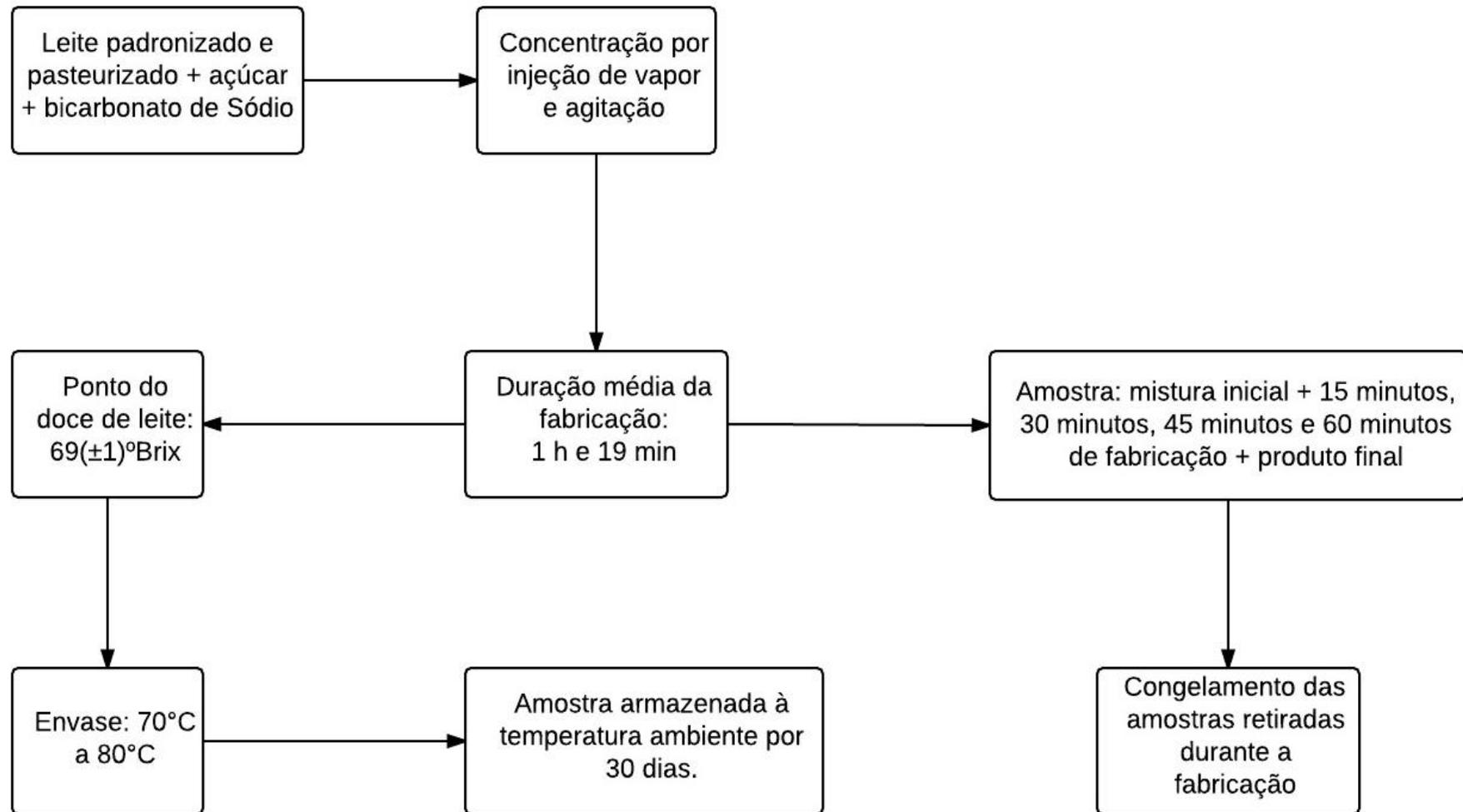
### **4.2 Fabricações dos doces de leite, delineamento experimental e análise estatística**

Foram produzidas doze fabricações de doce de leite pastoso seguindo o processo tradicional proposto por Perrone *et al.* (2011a).

As fabricações foram realizadas na Universidade Federal de Viçosa (UFV) no Departamento de Tecnologia de Alimentos – Plataforma Inovaleite. Os doces foram processados em um tacho de aço inoxidável, marca Inoxul<sup>®</sup>, de parede dupla, com capacidade para 15 kg de leite e dotado de pá para agitação (50 rpm). Primeiramente foi colocado no tacho o leite padronizado e pasteurizado, o açúcar e o bicarbonato de sódio. Em seguida, iniciou-se o processo de concentração do doce de leite, com agitação até o teor de sólidos solúveis desejado, 69(±1)<sup>o</sup>Brix, e temperatura máxima de 110°C.

O tempo de cocção do doce de leite é variável e modificável pelo tipo de equipamento utilizado, teor de sólidos solúveis iniciais, coloração e umidade desejada. No trabalho em questão o tempo de fabricação variou entre 1 h e 15 min e 1 h e 30 min, com tempo médio de 1 h e 19 min.

A Figura 4 mostra a sequência de atividades realizadas durante a fabricação dos doces de leite experimentais.



**Figura 4.** Fluxograma da fabricação experimental de doce de leite na UFV, elaborado pelo autor.

Em todos os tratamentos fixou-se o teor de açúcares (sacarose e glicose) em 20% (m/m) sobre a massa de leite, variando apenas a proporção entre os dois açúcares. Foram realizados quatro processamentos: tratamento 1 (Leite + 20% de sacarose + 12 g de bicarbonato), tratamento 2 (Leite + 20% de sacarose + 18 g de bicarbonato), tratamento 3 (Leite + 18% de sacarose + 2% glicose + 12 g de bicarbonato) e tratamento 4 (Leite + 18% de sacarose + 2% glicose + 18 g de bicarbonato).

O delineamento experimental consistiu em quatro tratamentos, com três repetições, retirando amostra da calda e do produto final para congelamento e posterior análise. As amostras foram retiradas em seis diferentes tempos durante a fabricação (tempo 1 – calda dos ingredientes sem aquecimento, tempo 2 – calda com 15 minutos de aquecimento, tempo 3 – calda com 30 minutos de aquecimento, tempo 4 – calda com 45 minutos de aquecimento, tempo 5 – calda com 60 minutos de aquecimento e tempo 6 – doce de leite final). O doce de leite foi armazenado à temperatura ambiente para análise após 30 dias de fabricação (tempo 7).

A análise estatística dos resultados de HMF livre e total, da composição centesimal e dos atributos físico-químicos dos doces de leite comerciais assim como a análise estatística da composição centesimal e dos atributos físico-químicos dos doces de leite experimentais foi realizada pelo programa estatístico Excel (2011).

Os resultados obtidos da análise de HMF livre, HMF total e teor de sólidos solúveis dos diferentes pontos retirados durante a fabricação dos doces de leite experimentais, foram analisados através de distintos programas estatísticos. A análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação de médias foram obtidos através do programa ASSISTAT, por experimento em blocos casualizados com repetições. O gráfico da evolução do HMF livre e HMF total ao longo da fabricação foram formulados através do programa estatístico PRISMA.

Já a análise de regressão polinomial do comportamento do índice de HMF livre e do teor de sólidos solúveis durante a elaboração do doce de leite experimental, a curva da taxa de massa de água evaporada e a curva do percentual de água evaporada foram obtidas através do programa estatístico Excel (2011). Este programa também foi utilizado para a determinação da estatística descritiva do HMF livre, HMF total e teor de sólidos solúveis ao longo da fabricação.

A Figura 5, apresentada logo abaixo, sintetiza o delineamento experimental do trabalho em questão.

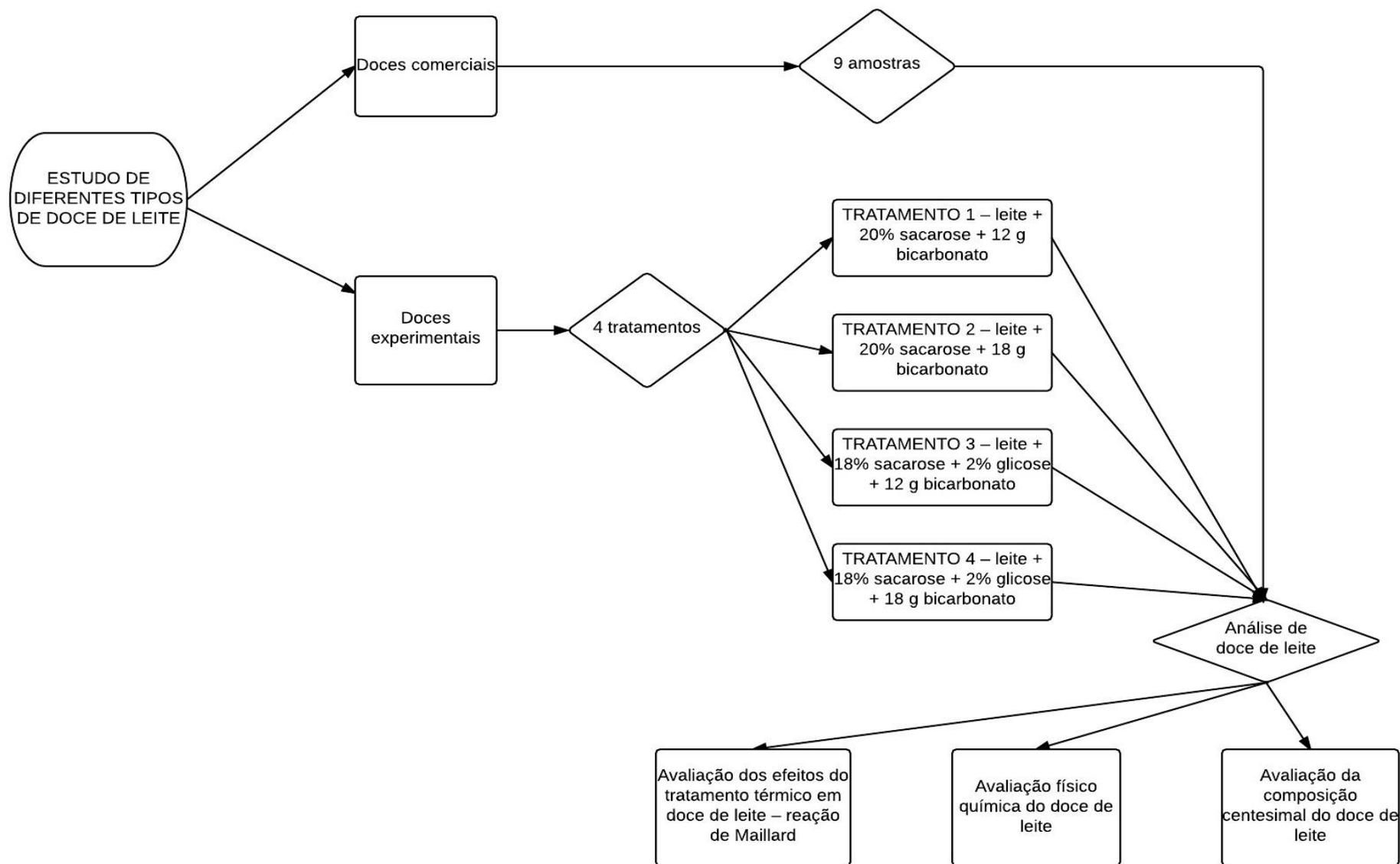


Figura 5. Delineamento experimental do trabalho, elaborado pelo autor.

### 4.3 Cálculo do balanço de massa

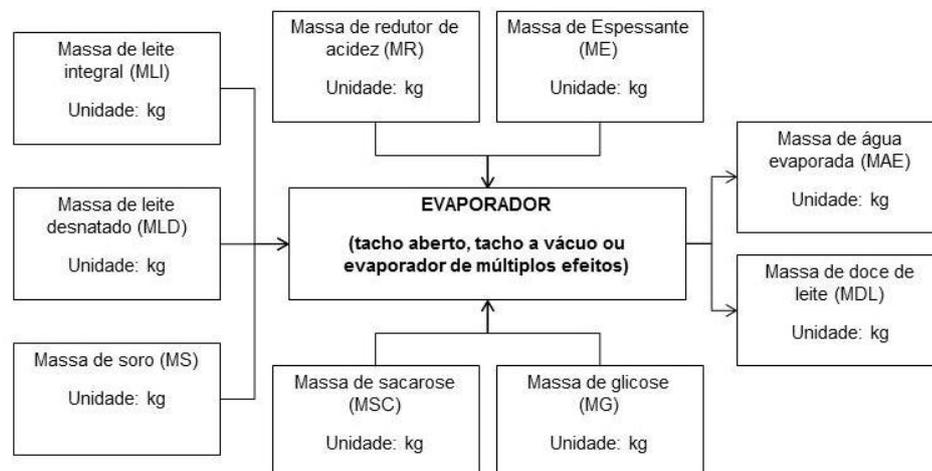
O balanço de massa foi empregado para determinação dos atributos tecnológicos de rendimento e taxa de evaporação e seguiram o proposto por Perrone *et al.* (2011). A determinação do rendimento, da massa de água evaporada e da taxa de evaporação para os doces de leite produzidos foram calculados pelas equações 1 e 2 e seguiram a esquematização dos processos industriais apresentados na Figura 6.

$$MLCD = \frac{[(MLP * \%SLLP) + MSC]}{\%STLCD} \quad (1)$$

Sendo: MLCD = massa de produto; MLP = massa de leite ou soro padronizado (kg) ou volume de leite ou soro (L); SLLP= sólidos lácticos do leite ou soro padronizado expresso em (m/m) ou expresso em (m/v); MSC = massa de sacarose (kg); % STLCD = porcentagem de sólidos totais do produto expresso em (m/m).

$$FC = \frac{TSLLCD}{TSSL} \quad (2)$$

Sendo: FC = fator de concentração; TSLLCD = teor de sólidos lácticos no produto final; TSSL = teor de sólidos lácticos no leite ou soro. Na Figura abaixo pode-se visualizar a geometrização do processo de produção de doce de leite.



**Figura 6.** Geometrização do processo de produção de doce de leite retirado de Perrone *et al.* (2011).

#### 4.4 Elaboração da curva padrão para 5-hidroximetulfurfural

Para obtenção da concentração de HMF em  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , foi construída uma curva analítica usando diferentes níveis de padrão de HMF em relação à absorvância. A curva foi realizada em duplicatas autênticas nas seguintes concentrações:  $2\mu\text{mol.L}^{-1}$ ;  $5\mu\text{mol.L}^{-1}$ ;  $15\mu\text{mol.L}^{-1}$ ;  $25\mu\text{mol.L}^{-1}$ ;  $35\mu\text{mol.L}^{-1}$ ;  $45\mu\text{mol.L}^{-1}$ ;  $55\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

A leitura dos mesmos foi realizada aleatoriamente com auxílio do espectrofotômetro.

#### 4.5 Determinação dos atributos composicionais e físico-químicos

A ordem estabelecida para os atributos composicionais e físico-químicos seguiu a seguinte sequência: atributos com valores mínimos e máximos estabelecidos pelo RTIQDL, atributos composicionais que não apresentam limites impostos pela legislação, atributos físico-químicos e amido por ter sido analisado apenas nas amostras comerciais.

##### 4.5.1 Umidade

A determinação do teor de umidade neste estudo foi realizada pelo método clássico gravimétrico segundo a Instrução Normativa nº 62 (IN 62), submetendo a amostra ao aquecimento em estufa por  $105^{\circ}\text{C}$  durante, aproximadamente, seis horas, até massa constante.

As análises foram realizadas em duplicata.

##### 4.5.2 Lipídeos

O teor de lipídeos foi determinado de acordo com o método de Gerber, metodologia oficial descrita na IN 62. Neste método há separação e quantificação de lipídeo por meio do tratamento da amostra com ácido sulfúrico e álcool isoamílico. A leitura é realizada na escala graduada do butirômetro após centrifugação e imersão em banho-maria.

Foi realizada a determinação em duplicata.

### **4.5.3 Proteínas**

A proteína bruta foi calculada no trabalho em questão, em função dos teores de nitrogênio total determinado pelo método de micro Kjeldahl, multiplicado pelo fator 6,38, de acordo com a Instrução Normativa nº62. Este método desenvolve-se em três etapas, oxidação da amostra pelo ácido, adição de hidróxido de sódio culminando na formação do metaborato de amônio e titulação por neutralização com ácido clorídrico representando a fração nitrogenada que se deseja determinar. A análise foi realizada em triplicata.

### **4.5.4 Cinzas**

A determinação do Resíduo Mineral Fixo ou Cinzas no trabalho fundamentou-se na volatilização sob a forma de dióxido de carbono e água da matéria orgânica à temperatura de 550°C utilizando mufla e seguindo o método oficial descrito por Brasil (2011). Esta análise foi realizada em duplicata.

### **4.5.5 Carboidratos**

A determinação de carboidratos totais baseou-se na diferença matemática dos demais constituintes composicionais analisados para o doce de leite.

### **4.5.6 Amido**

O amido foi determinado apenas nas amostras comerciais, por meio da análise qualitativa de amido pela reação iodo/iodeto de potássio (lugol) segundo Pereira *et al.* (2001). O teste verifica o desenvolvimento de coloração azulada após aquecimento e adição de solução de iodo/iodeto de potássio (lugol) à amostra, em presença de amido.

### **4.5.7 Atividade de água**

A análise da atividade de água foi realizada em duplicata e conduzida no equipamento Aqua Lab 4 ATE.

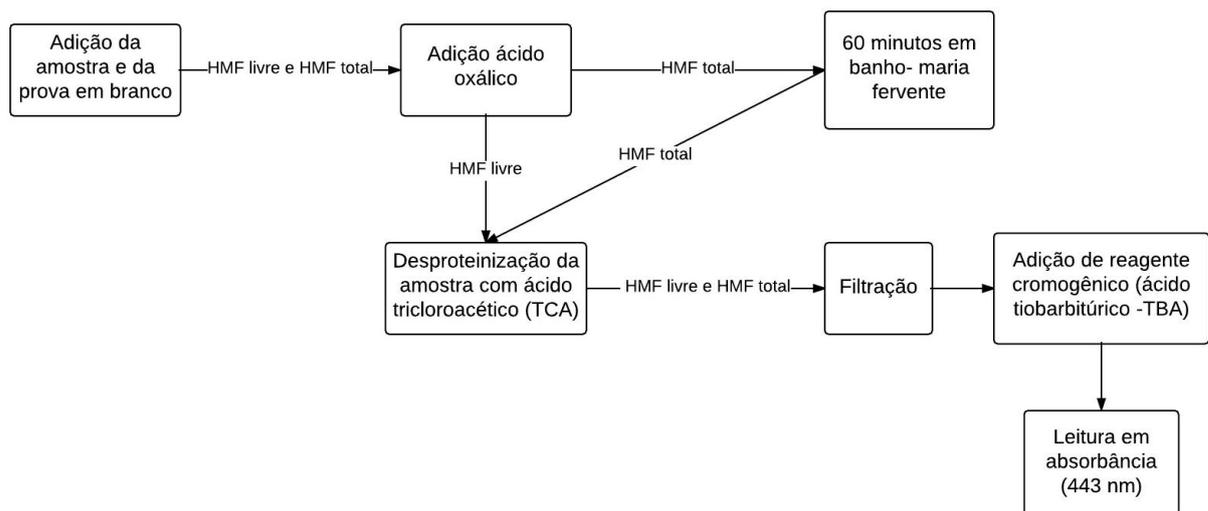
#### 4.5.8 Teor de sólidos solúveis

A quantificação do teor de sólidos solúveis foi obtida, no presente trabalho, em triplicata e por refratometria através do equipamento Reichert AR200.

#### 4.6 Determinação de 5-hidroximetilfurfural

A determinação de HMF livre e HMF total foram conduzidas por análise espectrofotométrica em meio acidificado após desproteinização da amostra com ácido tricloroacético (TCA), seguida de filtração e adição de reagente cromogênico (ácido tiobarbitúrico - TBA), procedendo à leitura da absorvância em 443 nm. A concentração do 5-hidroximetilfurfural em  $\mu\text{mol.kg}^{-1}$  foi dada a partir da construção de uma curva analítica utilizando diferentes níveis de padrão de 5-hidroximetilfurfural *versus* absorvância, segundo Keeney e Bassette (1959).

A representação esquemática da técnica analítica usada para determinação de 5-hidroximetilfurfural por espectrometria foi resumida e pode ser verificada na Figura 7, sendo detalhada na sequência.



**Figura 7.** Representação esquemática da técnica analítica usada para determinação de 5-hidroximetilfurfural por espectrofotometria, elaborado pelo autor.

Para a determinação de HMF livre nas amostras retiradas nos tempos 1, 2, 3 e 4 as caldas foram analisadas diretamente sem a necessidade de uma previa diluição. Já nas amostras retiradas nos tempos 5, 6 e 7 ocorreu a necessidade de

uma diluição equivalente a 5 g de doce de leite em 10 ml de água para que os valores da absorvância, obtidos pela leitura espectrofotométrica, ficassem dentro dos limites da curva padrão formulada.

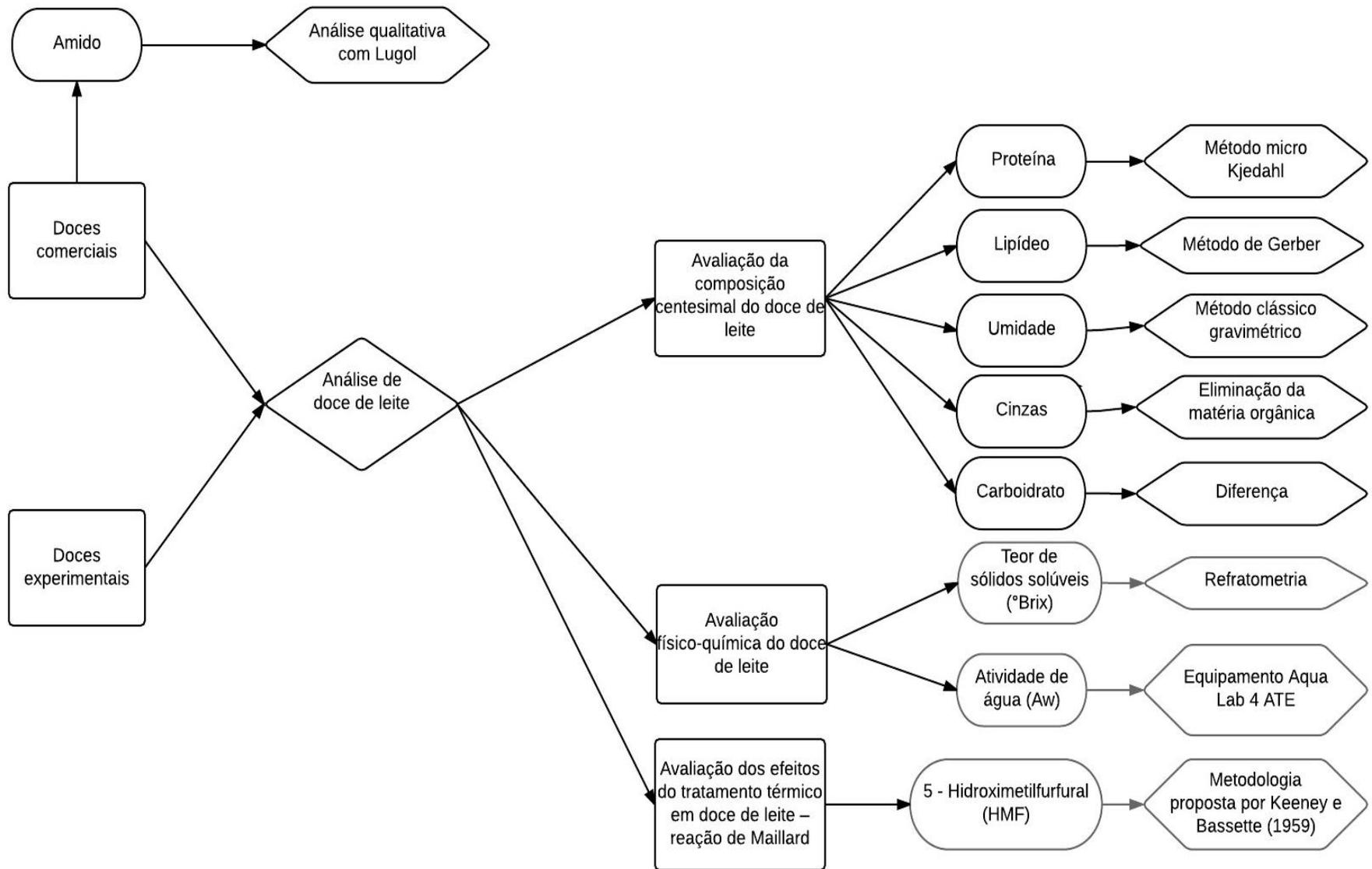
Para HMF total foi realizada a diluição de 0,25 g de doce de leite em 100 ml de água em todos os tempos de retirada da amostra durante a fabricação. Tanto HMF livre quanto HMF total foram analisados em triplicata.

Para a determinação do HMF livre, foi transferido 5 ml de cada diluição, assim como de água destilada (prova em branco), para um tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se 5 ml de ácido oxálico  $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$  e 5 ml de ácido tricloroacético 40% m/v, filtrando-se posteriormente em papel filtro qualitativo. Deste filtrado, foi transferido 4 ml para um tubo de ensaio acrescentando 1 ml de ácido tiobarbitúrico  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$  e submetendo o sistema a um aquecimento em banho termostático a  $40^\circ\text{C}$  por 30 min. Após o tempo determinado, procedeu-se leitura em espectrofotômetro UV/Visível ThermoScientific® modelo Evolution 60S a 443 nm.

Para quantificar o índice de HMF total, foi transferido 5 ml de cada diluição, assim como de água destilada (prova em branco), para um tubo de ensaio adicionando 5 ml de ácido oxálico e submetendo este sistema a um banho fervente por 60 minutos. Após este período a amostra foi resfriada imediatamente até temperatura ambiente. Neste momento, acrescentou-se 5 ml de TCA. Deste ponto em diante, prosseguiu-se com a mesma sequência já descrita acima, para o HMF livre (obtenção do filtrado, adição de TBA, aquecimento a  $40^\circ\text{C}$ , leitura a 443 nm).

#### **4.7 Resumo das análises físico-químicas, composicionais e do indicador de tratamento térmico**

A Figura 8 resume as análises composicionais, físico-químicas e dos indicadores da reação de Maillard determinadas para os doces de leite comerciais e para os doces de leite experimentais na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

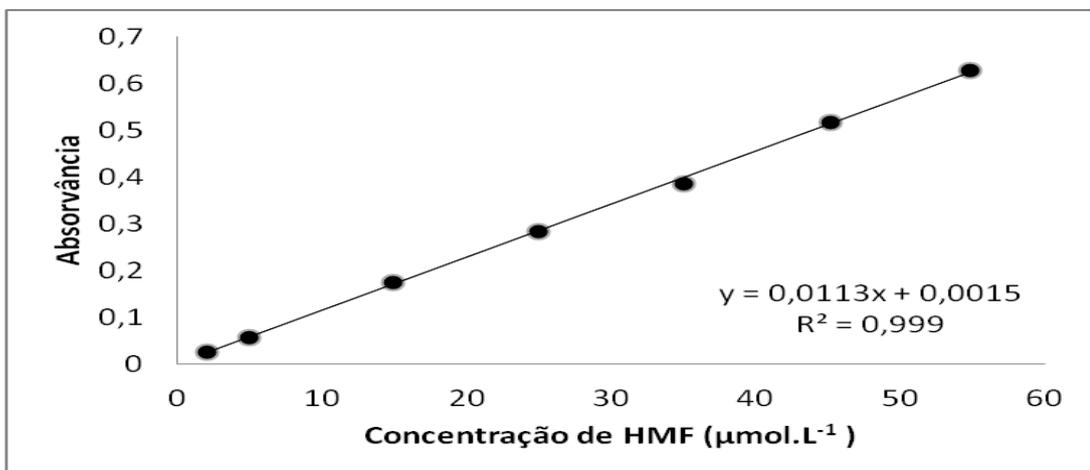


**Figura 8.** Resumo das análises físico-química, composicionais e de indicadores de tratamento térmico determinadas para os doces de leite comerciais e experimentais, elaborado pelo autor.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Curva padrão 5-hidroximetilfurfural

A curva padrão estabelecida para os índices de HMF livre e HMF total pode ser visualizada na Figura 9. Na qual é possível identificar também a equação de regressão linear.



**Figura 9.** Curva padrão 5-hidroximetilfurfural, elaborado pelo autor.

O modelo matemático utilizado foi eficiente para explicar os valores observados. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da regressão linear foi alto (0,999), indicando alto grau de ajuste da correlação aos dados originais, sendo a variação da absorvância explicada em 99,9% pela equação de regressão.

A obtenção desta curva padrão para HMF é uma ferramenta útil na determinação das concentrações de amostras como o doce de leite, auxiliando no cotidiano laboratorial.

### 5.2 Doces de leite comerciais

O doce de leite comercial possui características sensoriais e composicionais heterogêneas, evidenciando a necessidade de maior controle no processo de produção para padronização da composição dos produtos, cumprimento da legislação, otimização dos lucros e garantia do direito do consumidor (PEREIRA *et al.*, 2010).

### 5.2.1 Atributos composicionais e físico-químicos

A característica físico-química e composicional de um alimento são importantes de serem acompanhadas para caracterização e classificação do mesmo. Assim, verifica-se a necessidade das empresas em formular alimentos que estejam com valores dentro do recomendado.

Estes aspectos físico-químicos podem estar em desacordo com a legislação por uma falha no processo de produção, por falta de padronização ou mesmo intencionalmente para fraudar e adulterar o produto com intuito de se beneficiar financeiramente (PEREIRA *et al.*, 2010).

A análise descritiva dos atributos físico-químicos e composicionais das nove diferentes marcas de doces de leite comerciais pode ser verificada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Análise estatística descritiva dos atributos físico-químicos e composicionais de nove diferentes marcas de doces de leite comerciais

Estadística Descritiva	Umidade %(m/m)	Lípidos %(m/m)	Proteínas %(m/m)	Cinzas %(m/m)	Carboi- dratos %(m/m)	Atividade de água	Sólidos solúveis (°Brix)
Média	32,09	3,58	5,10	1,64	57,59	0,85	65,94
Desvio padrão	4,72	1,49	0,96	0,32	6,31	0,04	4,29
Mínimo	26,36	1,25	3,52	0,98	47,58	0,80	57,23
Máximo	40,95	5,50	6,55	2,05	67,89	0,91	70,00
Amplitude	14,59	4,25	3,03	1,07	20,31	0,11	12,77
Coeficiente de variação (%)	14,71	41,71	18,86	19,46	10,95	4,34	6,51

Fonte: Elaborado pelo autor.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece valores físico-químicos e composicionais mínimos que devem ser obrigatoriamente seguidos durante a formulação do doce de leite. Estes limites podem ser visualizados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Requisitos físico-químicos obrigatórios para doce de leite de acordo com Brasil (1997)

Requisito ( $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ )	Doce de leite
Umidade	Máx. 30,0
Lipídeos	6,0 a 9,0
Proteínas	Mín. 5,0
Cinzas	Máx. 2,0

Fonte: Adaptada do Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Doce de Leite (BRASIL, 1997).

As amostras mostraram-se heterogêneas em relação à umidade, oscilando entre 26% (m/m) e 40% (m/m) o que determinou alta amplitude. No presente trabalho, verifica-se que somente 33% das amostras analisadas ficaram dentro do limite estabelecido pela legislação que determina o teor de umidade de no máximo 30% (m/m). O doce de leite corresponde a um alimento elaborado a partir da retirada de água do leite através da troca de calor com vapor indireto, assim, há uma melhora na conservação, palatabilidade, com conseqüente diminuição de custos no transporte, armazenamento e estocagem devido à redução no teor de umidade do produto (PERRONE, 2007).

Demiate *et al.* (2001a) encontrou variação dos valores de umidade entre 19% (m/m) e 37% (m/m) em 32 amostras comerciais analisadas, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho. Já Bellarde (2001) se deparou, em todas as amostras, com o teor de umidade variando entre 26,26% (m/m) e 29,83% (m/m), ficando desta forma dentro do valor estabelecido pela legislação e contrapondo ao resultado aqui relatado.

O coeficiente de variação e a amplitude obtidos a partir das análises dos resultados de lipídeos foram bastante expressivos, o que reflete diferença entre as amostras analisadas em relação a este atributo. O valor esperado de lipídeos para doces de leite fabricados a partir de leite de vaca deveria ser de  $6 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  a  $9 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ , porém, nas amostras analisadas neste trabalho, a média foi de 3,58% (m/m), ou seja, nenhuma das amostras estavam com valores dentro do limite estabelecido por lei. Observa-se uma não conformidade com o RTIQDL e falta de padronização dos produtos disponíveis no mercado local, pelo alto coeficiente de variação e alta amplitude com valor mínimo de 1,25% (m/m) e valor máximo de

5,50% (m/m). Em trabalho semelhante, Demiate *et al.* (2001a) encontrou grande parte de suas amostras com conteúdo de lipídeos entre 2% (m/m) e 4% (m/m). Oliveira *et al.* (2010), também apresentou valores abaixo de 6% (m/m) para todas as seis marcas analisadas em seu trabalho assim como Pieretti *et al.* (2012) onde o resultado médio foi de  $5,33 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de lipídeos.

Diferentemente do teor de lipídeo aqui relatado e nos estudos acima citados Santos e Marques (2010), estudaram amostras de doce de leite comercializadas informalmente na cidade de Currais Novos/RN. As cinco amostras analisadas apresentaram percentual de lipídeos variando entre 6,5% (m/m) até 9,5% (m/m), ou seja, em acordo com Brasil (1997).

O DL apesar de apresentar um alto conteúdo energético proporciona um elevado conteúdo de proteínas, vitaminas e minerais, sendo assim este produto é dotado de um elevado valor nutricional, além de sua excelente característica sensorial (DEMIATE *et al.*, 2001a).

A média obtida da análise de proteínas nos doces de leite analisados foi de 5,10% (m/m) o que demonstra conformidade com a legislação vigente, que estipula o mínimo de 5% (m/m) de proteínas neste produto lácteo. Porém, no trabalho em questão 44% das amostras analisadas apresentaram valores abaixo de  $5 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  estando fora do ideal para o produto estudado. A amplitude foi elevada, com resultados variando entre 3,52% (m/m) (valor mínimo) e 6,55% (m/m) (valor máximo) o que demonstra uma desuniformidade em relação às amostras analisadas.

Autores relatam que o baixo teor de proteínas no doce de leite pode estar associado ao uso de amido na formulação o que reduz o valor nutricional, gera prejuízos econômicos para o consumidor e descaracteriza o alimento tradicional ou também este baixo teor pode estar relacionado à possível adição de soro no produto elaborado (PASSOS *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

No trabalho realizado por Passos *et al.* (2013), a concentração média de proteínas variou entre 2,14% e 5,86%; 50% das amostras analisadas por este autor estavam em desacordo com a legislação. Já Oliveira *et al.* (2010) encontrou todas as amostras analisadas dentro da conformidade com uma variação entre 8,88% (m/m) até 10,49% (m/m) de proteínas nas seis marcas com três diferentes lotes bem como Santos *et al.* (2012) que apresentou valores de proteínas entre 8% (m/m) e 8,5% (m/m).

O coeficiente de variação e a amplitude foram elevados para o atributo cinzas, o que comprova uma inconstância entre as amostras analisadas verificando uma variação entre 0,98% (m/m) até 2,05% (m/m).

O teor de cinzas, de acordo com a legislação, deve apresentar valor máximo de  $2 \text{ g.100}^{-1}$ . No trabalho em questão, apenas uma amostra apontou valores acima deste limite, o que contrapõe com os resultados obtidos por Passos *et al.* (2013) no qual 75% das amostras analisadas apresentaram acima do ideal. Guimarães *et al.* (2012) exibiu valores de todos os doces analisados acima do proposto RTIQDL, a saber: 2,15% (m/m) e 2.84% (m/m). Já nos resultados obtidos por Oliveira *et al.* (2010), foi revelado que todas as amostras estudadas apresentaram valores em conformidade com o estabelecido por lei vindo ao encontro dos valores obtidos no presente trabalho.

Na fabricação de DL admite-se a adição de bicarbonato de sódio e outros sais o que pode aumentar os valores de cinzas do produto em questão. Entretanto, baixos valores de cinzas podem demonstrar que o doce foi fabricado com pouco leite ou outras matérias lácteas. Conforme concluiu diversos autores, o teor de cinzas é um importante indicador da presença de leite no produto analisado, pois é valor constante nesta matéria prima (GONÇALVES *et al.*, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2012; PASSOS *et al.*, 2013).

A média de carboidratos totais de 57,59% (m/m) do trabalho em questão foi coerente com o encontrado na literatura, sendo que este atributo foi aquele que exibiu maior desvio padrão e maior amplitude demonstrando uma alta variação dos dados. O fato de este atributo ter sido o que exibiu maiores variações pode ser em consequência da ausência de uma regulamentação de teores máximos ou mínimos para carboidratos totais. De acordo com Brasil (1997) o único requisito obrigatório corresponde à adição de sacarose no máximo  $30 \text{ kg.100L}^{-1}$  de leite.

Em trabalho realizado por Perrone *et al.* (2008), foi elaborado doce de leite pela mistura de leite e soro de queijo, os quais obtiveram teor médio de carboidratos totais equivalente a 57,7% (m/m). Já no trabalho realizado por Demiate *et al.* (2001a) o teor de carboidratos totais evidenciou média das amostras analisadas de 57,15% (m/m).

O teor de sólidos solúveis possuiu média semelhante aos resultados da literatura. Valente *et al.* (2015) elaborou doce de leite com adição de soro de Leite

fixando o valor de 67°Brix para o ponto final do produto, enquanto que Milagres *et al.* (2010) encontrou valores médios de 63°Brix em doce de leite adicionado de açúcar.

A determinação do ponto do doce de leite pode ser realizada através do teor de sólidos solúveis no final da fabricação do produto, sugerindo o grau de concentração atingido no processo e indicando a passagem para a próxima etapa da fabricação ou manutenção na etapa em que se encontra. Este atributo não tem um valor determinado pela legislação. Perrone *et al.* (2011a) sugerem que valores entre 66°Brix e 68°Brix representam um doce com aproximadamente 70% (m/m) de sólidos totais, que por sua vez, representa um doce com aproximadamente 30% (m/m) de umidade o que é regulamentado por Brasil (1997). Assim sendo, a importância de se determinar um ponto adequado do doce pelo teor de sólidos solúveis e a relação deste atributo com a umidade podem explicar o baixo coeficiente de variação e baixa amplitude encontrados no presente trabalho, demonstrando a uniformidade em relação ao teor de sólidos solúveis nas diferentes marcas analisadas.

A atividade de água de um alimento está intimamente relacionada com a deterioração mais acelerada do produto e conseqüente redução da vida de prateleira. O conhecimento da atividade de água se mostra de grande valor para assim determinar a validade do produto, o tipo de embalagem e as condições de armazenamento. O DL é um alimento que apresenta  $A_w$  mais baixa pela concentração de solutos o que inibe o crescimento de microrganismos deteriorantes (PASSOS *et al.*, 2013; FERREIRA, 2012).

Os valores de atividade de água dos doces comerciais observados ficaram próximos ao encontrado por Passos *et al.* (2013) que determinou o valor de  $A_w$  em quatro doces com três diferentes lotes comercializados nas cidades de Rio Paranaíba e Patos de Minas com resultados entre 0,83 e 0,89 e por Bellarde (2001) onde os valores de  $A_w$  variaram entre 0,83 e 0,86. O coeficiente de variação e a amplitude foram baixos mostrando que as marcas analisadas apresentaram uma homogeneidade quanto a este atributo.

No presente trabalho, 67% das amostras comerciais analisadas não indicaram no rótulo a presença de amido, das quais 17% apresentava amido apesar de não indicar sua existência e 83% não incluiu realmente este ingrediente em sua formulação.

Perrone *et al.* (2011b) utilizou diferentes tipos de espessantes na formulação de doce de leite para confeitaria, o produto que utilizou o amido como espessante foi aquele que obteve maior aceitação sensorial, apresentando um maior teor médio de sacarose e um menor teor de gordura. No trabalho realizado por Passos *et al.* (2013) das cinco marcas analisadas apenas uma delas apresentou amido, sendo esta amostra aquela que obteve menor aceitação pela análise sensorial. Ferreira *et al.* (2012) analisaram seis marcas comerciais de doce de leite comercializadas na cidade de Lavras (MG) onde duas das seis marcas afirmaram em seu rótulo a existência de amido ou amido modificado. Por fim, Colombo *et al.* (2009) realizou fabricação experimental de cinco tipos de doce de leite adicionados de amido de milho nativo concluindo que a viscosidade do DL tradicional em pasta fabricado com amido aumenta significativamente após 80 min de fervura.

Na fabricação de doce de leite permite-se a inserção de vários aditivos e ingredientes tal como o amido, o qual corresponde a uma importante ferramenta para a indústria de alimentos. Ele é usado como espessante e estabilizante durante a fabricação de produto estudado acarretando em ganho de rendimento, diminuição de cristais de lactose perceptíveis ao paladar, aumento da viscosidade, facilidade de evaporação, além de auxiliar para textura mais consistente e reduzir o tempo de fabricação. Porém, algumas alterações físicas e sensoriais podem ocorrer e acabar prejudicando a qualidade do DL e até fornecer um sabor residual indesejável (DEMIATE *et al.*, 2001b; KONKEL *et al.*, 2004; PERRONE, 2007; PERRONE *et al.*, 2008; PERRONE *et al.*, 2011b).

Dentre os atributos avaliados, umidade e lipídeos apresentaram médias em desacordo com a legislação vigente. No trabalho de Pereira *et al.* (2010) foram analisados distintos produtos lácteos, sendo que aquele com maior porcentagem de amostras em desacordo com a legislação foi o doce de leite, principalmente por exibir baixo teor de proteínas e lipídeos.

A heterogeneidade das amostras analisadas em relação à característica composicional e físico-química é visível a partir da verificação dos coeficientes de variação e amplitudes determinados pela análise descritiva. Isto reflete a variedade de produtos disponíveis no mercado com distintas características físicas e sensoriais. A variação encontrada nos doces analisados provavelmente ocorreu pela oscilação na característica composicional da matéria prima utilizada e também pelas

distintas tecnologias empregadas com diferentes tipos de tachos, tempo e temperatura de fabricação.

### 5.2.2 Índice de 5-hidroximetilfurfural

O doce de leite corresponde a um alimento de uso amplo e popular, porém tem sido objeto de poucos estudos. Um dos requisitos importantes na qualidade de tal produto se relaciona à sua coloração, o que não é padrão de um doce para o outro. A cor neste alimento é basicamente decorrente da reação de Maillard e esta reação apresenta o intermediário 5-hidroximetilfurfural o qual se comporta como sendo indicador da severidade do tratamento térmico e das possíveis perdas nutricionais em decorrência do aquecimento do alimento (BASTOS *et al.*, 2012; PASSOS *et al.*, 2013; PERRONE *et al.*, 2011a).

Verifica-se na Tabela 4 a análise descritiva de HMF livre e de HMF total nos doces de leite comerciais.

**Tabela 4.** Análise estatística descritiva do índice de HMF livre e de HMF total dos doces de leite comerciais

Estatística Descritiva	HMF Livre ( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ )	HMF Total ( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ )
Média	494	1.797
Desvio-padrão	93	471
Mínimo	332	1.111
Máximo	628	2.569
Amplitude	295	1.458
Coeficiente de variação (%)	19	26

Fonte: Elaborado pelo autor.

Visualizando a Tabela acima, observa-se que o HMF total apresentou médias dos valores superiores àqueles encontrados para o HMF livre. Pereda *et al.* (2009) também encontrou valores menores de HMF livre ( $0,203 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) quando comparados com HMF total ( $0,5259 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ).

O coeficiente de variação e a amplitude para os índices de HMF foram elevados assim como no trabalho de Francisquini *et al.* (2013b). Os autores citados atribuíram esta elevação à heterogeneidade entre as amostras analisadas.

No Regulamento técnico para fixação de Identidade e Qualidade de doce de leite existe uma variação em relação à quantidade e qualidade dos teores de carboidratos e do redutor de acidez o que pode aumentar ou diminuir a velocidade da reação de Maillard no produto em questão. Além disto, nesta legislação (BRASIL, 1997) para o requisito cor está estabelecida a seguinte definição: “Cor: Castanho caramelado proveniente da reação de Maillard”.

As situações acima expostas favorecem distintas colorações para os doces de leite comercializados, o que pode ser em decorrência da utilização de diferentes ingredientes, com modificação, por exemplo, do tipo de açúcar e quantidade de redutor de acidez durante a fabricação. Isto explica o alto coeficiente de variação e a alta amplitude encontrados neste trabalho para HMF livre e HMF total, indicando grande variabilidade entre os produtos analisados e despadronização do processo de fabricação do doce de leite com possível implicação nutricional como perda de lisina, diminuição da digestibilidade proteica e maior na formação de AGEs auxiliando para uma elevação do *pool* endógeno.

### **5.3 Doces de leite experimentais**

Para a elaboração de doce de leite são necessários poucos ingredientes, facilitando a execução experimental. Segundo Perrone *et al.* (2011a) pode-se afirmar que o doce de leite teve crescimento das produções industriais em larga escala a partir do desenvolvimento da indústria da sacarose sendo que o mesmo foi originado em fabricações caseiras com ascensão nos séculos XIX e XX.

#### **5.3.1 Atributos composicionais e físico-químicos**

O doce de leite é amplamente consumido no Brasil sendo apreciado pelo mercado consumidor. O mesmo pode ser utilizado como ingrediente para fabricação de confeites, bolos, biscoitos, sorvetes ou para o consumo direto como sobremesa ou ainda acompanhado de pães, torradas ou queijos (MILAGRES *et al.*, 2010, DEMIATE *et al.*, 2001a).

A uniformidade e homogeneidade dificilmente são obtidas durante a fabricação do doce de leite, este produto apresenta variação principalmente em relação às

características físico-químicas, composicionais, sensoriais e nutricionais (DEMIATE *et al.*, 2001a; VIEIRA *et al.*, 2011).

Os doces de leite experimentais foram analisados quanto à sua composição e atributos físico-químicos. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Análise estatística descritiva dos atributos físico-químicos e composicionais dos doces de leite experimentais

Estadística Descritiva	Umidade %(m/m)	Lipídeos %(m/m)	Proteínas %(m/m)	Cinzas %(m/m)	Carboi- dratos %(m/m)	Atividade de água	Sólidos solúveis (°Brix)
Média	28,55	6,29	4,57	1,69	58,90	0,84	68,98
Desvio padrão	3,01	1,13	0,53	0,05	2,86	0,01	1,15
Mínimo	20,70	4,25	3,56	1,55	55,13	0,83	66,37
Máximo	32,59	7,50	5,63	1,74	66,50	0,87	70,30
Amplitude	11,89	3,25	2,06	0,19	11,37	0,04	3,93
Coeficiente de variação (%)	10,55	18,00	11,57	2,94	4,86	1,35	1,67

Fonte: Elaborado pelo autor.

A média da umidade dos doces de leite experimentais conseguiu atender aos limites impostos pela legislação, porém, 33% das repetições apresentaram teores de umidade superiores a 30% (m/m) podendo indicar que estes doces deveriam ter sido expostos a uma maior evaporação não atingindo o limite máximo tolerado por Brasil (1997). Gallina *et al.* (2009) apresentou teor médio de umidade equivalente a 26,26% (m/m) resultado semelhante à média obtida neste trabalho.

Rocha *et al.* (2012), elaborou doce de leite com extrato hidrossolúvel de soja e soro de leite sabor café, em quatro fabricações, Konkel *et al.* (2004) elaborou seis amostras de doce de leite com diferentes concentrações de amido e Madrona *et al.* (2009) elaborou cinco tipos de doces de leite fabricados com diferentes teores de soro do queijo. Os três trabalhos citados não atingiram em 100% de suas fabricações teores de umidade inferior a 30% (m/m) assim como no presente trabalho.

O coeficiente de variação, desvio e amplitude verificados para umidade não foram elevados resultando em razoável padronização. Esta padronização do teor de

umidade é importante de ser obtida entre os doces de leite, pois está diretamente relacionada às características dos alimentos como estabilidade, qualidade, composição, textura, estocagem, embalagem e processamento, além de ser um dos requisitos físico-químicos com limites máximos instituídos pelo RTIQDL (GALLINA *et al.*, 2009).

O teor de lipídeos também é regulamentado pela legislação e assim como a umidade 33% das repetições apresentaram valores inferiores ao ideal para doce de leite, apesar disto a média apresentada foi de 6,29% (m/m) valor que está em conformidade com o regulamento técnico. O coeficiente de variação foi alto o que demonstra uma despadronização em relação ao teor de lipídeos nos doces experimentais. Milagres *et al.* (2010) elaborou três diferentes tipos de doce de leite na UFV e em contraposto com o trabalho encontrou valores superiores a 9% (m/m) de lipídeos em dois de seus doces e Moreira *et al.* (2009) se deparou com valor médio para lipídeos de 7,4% (m/m) resultado também superior ao encontrado no presente trabalho.

Os valores mínimos e máximos para lipídeos corresponderam respectivamente a 4,25% (m/m) e 7,50% (m/m) assemelhando com o resultado obtido por Perrone *et al.* (2011b) o qual formulou quatro diferentes doces com distintos espessantes e encontrou valor mínimo de 4,80% (m/m) e valor máximo de 6,80% (m/m) de lipídeos nos doces de leite fabricados.

Todos os doces aqui analisados, apresentaram valores em acordo com a legislação vigente no que diz respeito ao teor de cinzas, com a média de 1,69% (m/m). O coeficiente de variação foi baixo o que evidencia que os doces experimentais revelaram-se homogêneos em relação a este requisito. Konkel *et al.* (2004), Madrona *et al.* (2009) e Silva (2011) obtiveram resultados similares com os resultados expostos no presente trabalho.

O último requisito obrigatório que tem limite estabelecido por Brasil (1997) corresponde ao teor de proteínas, o qual deve ser no mínimo 5 g.100g<sup>-1</sup>. Apenas duas repetições conseguiram valores dentro do ideal. Diferentemente dos resultados deste trabalho, Rocha *et al.* (2012) apresentou valores entre 6,4% (m/m) e 9,2% (m/m) e Guimarães *et al.* (2012) encontrou valores de 9,87% (m/m) a 12,51% (m/m). Madrona *et al.* (2009) por sua vez, relevou resultados inferiores a 5% (m/m) assim como no trabalho em questão.

A variação no teor de carboidratos foi baixa, o coeficiente de variação correspondeu a 4,86 e os valores mínimos e máximos ficaram entre 55,13% (m/m) e 66,5% (m/m) respectivamente. Konkel *et al.* (2004) revelou resultados entre 43,9% (m/m) e 64,4% (m/m) de carboidratos totais o que corrobora com os valores encontrados neste estudo. Machado *et al.* (2005) realizou dezesseis diferentes tratamentos em duplicata encontrando valores de carboidratos totais com uma variação de 47,29% (m/m) a 56,06% (m/m), resultados estes mais baixos quando comparados com o trabalho aqui relatado.

A média obtida tanto para atividade de água quanto para o teor de sólidos solúveis se assemelham ao encontrado na literatura (PERRONE *et al.*, 2008; MILAGRES *et al.*, 2010; PASSOS *et al.*, 2013) e também ao resultado da análise realizada para as amostras comerciais de doce de leite deste trabalho. Rocha *et al.* (2012) encontrou médias entre 0,79 e 0,82, em Machado (2005) os valores da atividade de água ficaram entre 0,78 a 0,87 e Silva (2011) apresentou resultado variando de 0,81 a 0,86. De tal modo, os resultados obtidos nos estudos acima vão ao encontro dos valores mínimos e máximos encontrados nos doces de leite experimentais.

O teor de sólidos solúveis também apresentou valores interessantes com uma média de 68,98°Brix, valores próximos ao encontrado nos doces comerciais deste trabalho, cujo valor médio foi de 65,94°Brix. Francisquini *et al.* (2013a) analisou quatorze amostras de doce de leite do mercado nacional se deparando com valores mínimos, máximos e média de 57,70°Brix; 73,40°Brix e 65,67°Brix respectivamente o que corrobora com os resultados deste trabalho.

Infere-se, portanto, que a fabricação experimental foi adequadamente conduzidas o que se pode comprovar pelas características físico-químicas e composicionais do produto. A atividade de água apresentou-se dentro dos limites dos demais doces do mercado, o que evidencia que o mesmo provavelmente apresentou um bom *shelf life* quando armazenado em condições adequadas.

### **5.3.2 Índice de 5- hidroximetilfurfural**

Os produtos lácteos são susceptíveis à RM, pois são tratados termicamente podendo ainda ser submetidos a temperaturas de estocagem elevadas. A complexidade composicional e estrutura dos leites e derivados dificulta o controle

deste tipo de escurecimento. A determinação do índice HMF, nestes produtos, corresponde a uma medida usada para avaliar o efeito do tratamento térmico elevado já que o mesmo representa um dos PRM formado apenas sob condições elevadas de temperatura (OLIVEIRA, 1999; SAKKAS, 2014; VAN BOEKEL, 1998).

### 5.3.2.1 HMF livre

O índice de HMF livre é obtido pela ação do ácido tiobarbitúrico sem aquecimento e demonstra o valor atual de hidroximetilfurfural na amostra, este índice é utilizado para determinar a extensão da reação de Maillard no alimento (PEREIRA *et al.*, 2001; PEREDA *et al.*, 2009; SILVA, 2004).

### Estatística descritiva

Os dados referentes à estatística descritiva do índice de HMF livre dos doces de leite experimentais ao longo da fabricação neste trabalho estão descritos na Tabela 6.

**Tabela 6.** Análise estatística descritiva do índice de HMF livre dos doces de leite experimentais ao longo da fabricação

Descritiva	HMF Livre ( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ )
Média	87
Desvio-padrão	6
Mínimo	79
Máximo	96
Amplitude	18
Coeficiente de variação (%)	7

Fonte: Elaborado pelo autor.

Pinto e Wolfschoon-Pombo (1984) analisaram doces de leites disponíveis no mercado brasileiro e se depararam com alto coeficiente de variação para HMF livre. Os autores atribuíram esta elevada variabilidade à falta de padronização durante a fabricação do doce de leite comercial o que levou à desuniformidade produtos analisados.

Quando se observa os dados da Tabela 6, com respeito aos doces experimentais deste trabalho, depreende-se que houve baixo coeficiente de variação para HMF livre, permitindo inferir que alcançou-se homogeneidade em relação a este indicador da intensidade do tratamento térmico, demonstrando adequada condição da tecnologia de fabricação aplicada, além de qualidade e uniformidade das matérias primas utilizadas.

O resultado para o valor máximo deste trabalho foi maior do que o encontrado por Bellarde (2001), o valor máximo para HMF no trabalho citado foi de 47,67  $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ . O valor médio observado por Pinto e Wolfschoon-Pombo (1984) foi 56,6  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e o valor máximo foi 103,5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  o que se mostra em concordância aos resultados deste estudo.

Presume-se que os doces formulados com maior controle experimental são mais constantes no que diz respeito ao índice de HMF livre o que pode positivamente correlacionar-se com a característica nutricional do produto formulado. Assim, seria interessante que as indústrias alimentícias buscassem uma forma de aumentar o rigor ao longo da fabricação do doce de leite procurando elaborar um alimento mais regular não apenas em relação às características físico-químicas, composicionais e sensoriais, mas também em relação às características nutricionais.

O doce de leite quando comparado com outros produtos analisados na literatura apresenta índice de HMF relativamente alto. Neves (2015) encontrou valores de HMF livre em leite UHT entre 1,31  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e 9,66  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  enquanto que Silva (2004) apresentou resultados variando entre 1,0  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e 4,2  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de HMF livre com valor médio de 1,82  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Este comportamento provavelmente acontece pela formulação e tipo de tratamento térmico aplicado no doce de leite, disponibilizando um ambiente favorável para o aumento da velocidade da reação de Maillard e conseqüente formação, maior ou menor, do 5-hidroximetilfurfural.

Ferrer *et al.* (2000) analisou amostras de leite de vaca UHT integral exibindo valores para HMF livre entre 7,40  $\mu\text{g.100 ml}^{-1}$  (0,60  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e 50,93  $\mu\text{g.100 ml}^{-1}$  (4,04  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) enquanto que as amostras de leite com baixo conteúdo de lactose apontou média equivalente a 65,22  $\mu\text{g.100ml}^{-1}$  (5,17  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). A diferença dos valores encontrados pelos autores citados para leite UHT integral e leite com baixo conteúdo de lactose evidenciam que a formulação do produto, o tipo de tratamento térmico e o ambiente químico podem influenciar na formação de HMF livre.

## Análise da variância e teste de comparação de médias

O doce de leite é resultante do tratamento térmico aplicado no leite, sendo assim o mesmo torna-se um modelo experimental adequado para verificação da intensidade do aquecimento. O HMF pode ser utilizado como indicador da reação de Maillard em leite e derivados detectando as primeiras manifestações de escurecimento não-enzimático (PINTO e WOLFSCHOON-POMBO, 1984; KEENEY e BASSETE, 1959).

Os resultados da análise de variância para HMF livre indicaram diferença significativa em nível de 1% de probabilidade para os tratamentos e tempo. Deste modo, foi realizado o Teste de Tukey, para comparar as médias e verificar a magnitude das diferenças.

As médias obtidas para os diferentes tratamentos durante a fabricação e estocagem (30 dias) são apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Índice médio de HMF livre em  $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ , nos diferentes tratamentos, para os doces de leite experimentais ao longo da fabricação

Tratamento(*)	Índice de HMF livre nos doces de leite experimentais ( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ )
1	39 d
2	44 c
3	53 b
4	60 a

(\*) Tratamento 1: leite + 12 g bicarbonato + sacarose; Tratamento 2: leite + 18 g bicarbonato + sacarose; Tratamento 3: leite + 12 g bicarbonato + sacarose + glicose; Tratamento 4: leite + 18 g bicarbonato + sacarose + glicose.

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A glicose é um monossacarídeo, portanto é constituída por unidades monoméricas que quando unidas formam açúcares de tamanho maior. É ingrediente opcional na formulação do doce de leite, apresenta menor poder edulcorante em relação à sacarose e auxilia para a redução do desenvolvimento e crescimento dos cristais de lactose aumentando a viscosidade e brilho do produto final. O máximo de

substituição de sacarose por glicose é de 40% (m/m) de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Doce de Leite, autores sugerem adicionar 2% de glicose em relação ao peso de leite com a função de melhorar a textura e brilho do produto. A cor do doce de leite adicionado de glicose tende a ser mais escura pelo fato deste açúcar ser redutor e assim promover o aumento da velocidade da reação de escurecimento não-enzimático no produto (DEMIATE *et al.*, 2001a; FENNEMA, 2010; PERRONE *et al.*, 2011a).

O bicarbonato de sódio é elemento fundamental na tecnologia de fabricação do doce de leite agindo como um redutor de acidez. A adição do bicarbonato no início do processo auxilia para a redução da acidez inicial da calda (leite + açúcar) e manutenção do pH do leite durante a concentração. Assim, o bicarbonato de sódio atua como uma fonte extra de alcalinidade, evitando que aconteça a desestabilização das micelas de caseína pela diminuição do pH durante a evaporação, sendo que esta diminuição pode ser em decorrência da concentração de fosfato de cálcio, formação de ácidos orgânicos a partir da degradação de lactose e pela hidrólise de ésteres fosfóricos de caseína (McSWEENEY e FOX, 2009; PERRONE *et al.*, 2011a; PERRONE, 2007).

Os tratamentos diferenciaram-se estatisticamente entre si provavelmente pela parcela da sacarose substituída por glicose e também pelo aumento na quantidade de bicarbonato utilizado durante a fabricação dos doces de leite experimentais. Os doces do tratamento 4 apresentaram o maior índice de HMF sendo que os mesmos foram formulados com a substituição de 2% de sacarose por glicose e com maior quantidade do redutor de acidez (18 g).

Infere-se com este resultado que os fatores determinantes para o aumento do HMF livre no doce de leite foram a glicose e o bicarbonato de sódio. Ou seja, o açúcar redutor influenciou assim como o redutor de acidez na reação de Maillard.

Quando se adiciona o bicarbonato de sódio, há uma influencia na intensidade da RM, desta forma o mesmo é adicionado durante o processamento de doce de leite para evitar a coagulação da caseína e favorecer o desenvolvimento desta reação de escurecimento não enzimático responsável pela coloração castanha típica do doce de leite. Quanto maior a redução da acidez, maior a quantidade de bicarbonato e mais escuro o doce formulado (McSWEENEY e FOX, 2009; PERRONE *et al.*, 2011a; PASSOS *et al.*, 2013).

A situação acima exposta acontece, pelo fato de que a reação de Maillard apresenta pH ótimo de desenvolvimento em meio alcalino, atingindo descoloração máxima na faixa alcalina de pH 9 a 10. A reação entre o açúcar redutor e o grupo amino ocorre quando o par de elétrons do nitrogênio do aminoácido está livre, o que ocorre em pH elevado. Quando o pH está baixo, o íon  $H^+$  protona o grupamento amino ( $-NH_3^+$ ), deixando de existir o par de elétrons livre para reagir com o açúcar redutor. Conclui-se que se diminuir o pH há redução da velocidade da reação (ARAÚJO, 2008).

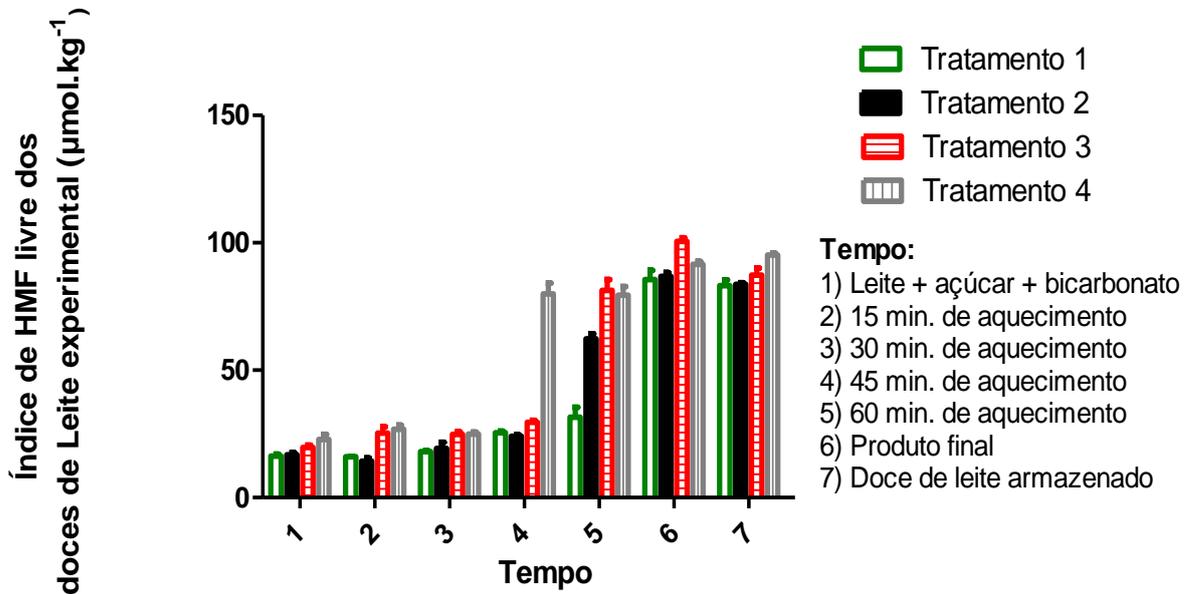
No caso em estudo, a presença de bicarbonato de sódio, sendo um sal de carácter básico, evitou a protonação do grupo amino fazendo com que o mesmo, permanecesse na forma ( $-NH_2$ ), permitindo a ligação com o grupo carbonila do açúcar redutor. Com isto, houve aumento da velocidade da reação de escurecimento nos tratamentos em que foi usado maior o teor de bicarbonato de sódio.

Passos *et al.* (2013) elaborou doce de leite comercializado na região do Alto Paranaíba/MG e encontrou grande heterogeneidade entre as amostras estudadas, inclusive dentro de uma mesma marca, o mesmo inferiu a diferenciação da cor do produto final à acidez inicial do leite, à quantidade e o momento da adição do bicarbonato de sódio, à presença de açúcares redutores, além da lactose, ao teor inicial e final de sólidos solúveis da calda e do doce de leite, ao tempo gasto para a evaporação e à pressão de vapor utilizada nos tachos. Do mesmo modo, Gaze *et al.* (2015) se deparou com grande variabilidade da cor entre as amostras analisadas as quais estavam disponíveis no mercado brasileiro, inferindo esta despadronização às diferentes formulações e aos distintos parâmetros utilizados no processo de fabrico, tal como a intensidade do tratamento térmico e da quantidade de sódio bicarbonato, sacarose e glicose (FERREIRA, 2012).

Em trabalho realizado por Hough *et al.* (1992) *apud* Bellarde (2001) os autores salientaram que os fatores como pH, temperatura, concentração e tipos de ingredientes, que afetam a cor, podem variar de indústria para indústria. Os mesmos autores observaram que uma mudança na adição de 0,05% para 0,20% de bicarbonato de sódio afetou sensivelmente a cor formada. Esta constatação concorda com os resultados deste trabalho, em que as dosagens de bicarbonato foram 12 g/18 kg de doce e 18 g/18 kg de doce, correspondendo à adição do redutor de acidez equivalente a 0,07% para os tratamentos 1 e 3 e 0,1% para os tratamentos 2 e 4, respectivamente. Conforme os valores da Tabela 7, tem-se que

os índices de HMF livre nos tratamentos 2 e 4 (maiores dosagens de bicarbonato) superam os índices dos tratamentos 1 e 3 (menores dosagens de bicarbonato).

A fim de ilustrar a diferença dos tratamentos nos distintos tempos foi elaborado o gráfico apresentado na Figura 10.



**Figura 10.** Evolução do índice de HMF livre nos diferentes tempos ao longo do tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor.

Nesta Figura percebe-se que em todos os tempos os índices de HMF livre foram maiores nos tratamentos 3 e 4 do que nos tratamentos 1 e 2 o que está de acordo com o resultado do teste de comparação de médias acima mencionado. Provavelmente isto aconteceu, além do anteriormente discutido acerca da dosagem de bicarbonato de sódio, também pela presença de uma maior quantidade de açúcar redutor para participar da reação de escurecimento não enzimático, visto que houve uma substituição de 10% da sacarose por glicose. Visualizando o gráfico percebe-se que o tratamento 2 apresentou maior formação de HMF livre do que o tratamento 1, assim como o tratamento 4 em relação ao tratamento 3. Isto está de acordo com os resultados obtidos por Hough *et al.* (1992) *apud* Bellarde (2001), que compararam xarope de glicose com glicose pura e observaram o maior efeito da segunda por ter um poder redutor maior devido à presença de carboidratos de menor peso molecular.

A composição do alimento influencia consideravelmente na intensidade da reação de Maillard. Alimentos com maior teor de açúcar redutor ou com a presença

de aminos mais reativas (lisina), por exemplo, aceleram a velocidade da reação (NEVES, 2015; SHIBAO e BASTOS, 2011). No trabalho de Brião *et al.* (2011) chegou-se à conclusão de que o tipo de açúcar influencia mais na reação do que o tipo de aminoácido; que a glicose apresenta maior reatividade que a lactose e que o pH (neutro ou ácido) foi fator determinante na reação de Maillard. As médias obtidas para os diferentes tempos durante a fabricação e estocagem (30 dias) são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Índice médio de HMF livre em  $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ , nos diferentes tempos, para os doces de leite experimentais ao longo da fabricação

Tempo(*)	Índice de HMF livre nos doces de leite experimentais ( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ )
1	19 d
2	20 d
3	22 d
4	40 c
5	64 b
6	91 a
7	87 a

(\*)Tempo 1: sem aquecimento; Tempo 2: 15 min.; Tempo 3: 30 min.; Tempo 4: 45 min.; Tempo 5: 60 min.; Tempo 6: Produto final; Tempo 7: Produto com 30 dias de armazenamento.

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Fonte: Elaborado pelo autor.

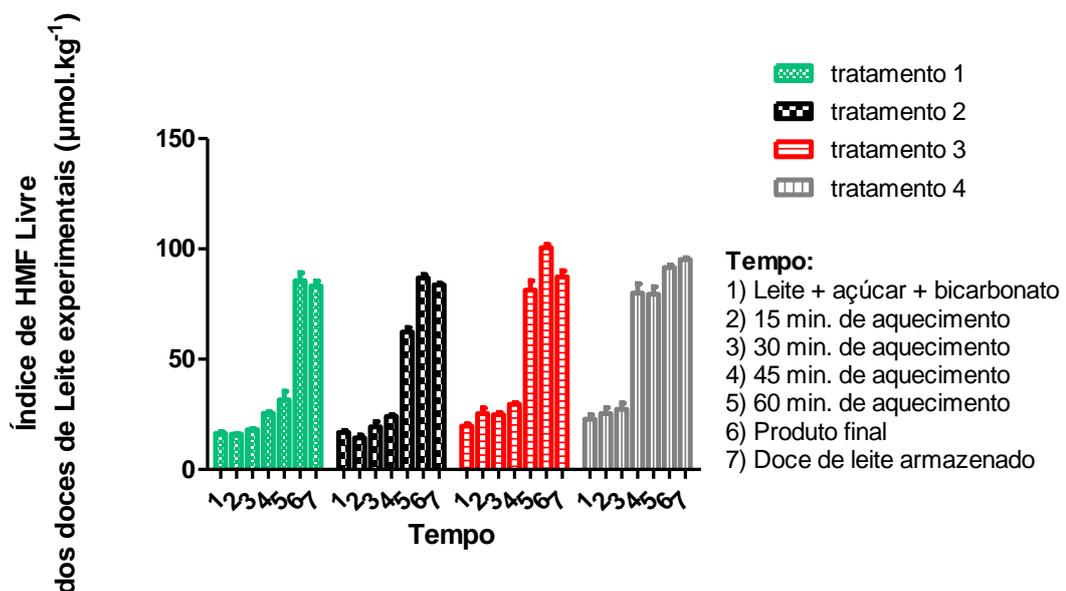
De acordo com os resultados acima apresentados na Tabela 8, pode-se verificar que a concentração de HMF livre tende a elevar com o decorrer do tempo de fabricação em todos os tratamentos. Verifica-se no tempo de 45 min a 75 min uma mudança na velocidade de formação do HMF livre, momento em que o indicador analisado começa a ser formado com maior intensidade pelo prolongamento do aquecimento.

Segundo Brião *et al.* (2011) a reação teve início a partir dos 15 primeiros min de aquecimento, a amostra que continha glicose apresentou mudança na velocidade de formação de HMF com 45 min de aquecimento o que foi mais acelerado do que

as amostras que continham apenas lactose nas quais a velocidade de formação de HMF modificou-se com 75 min de aquecimento (BRIÃO *et al.*, 2011; BOBBIO e BOBBIO, 1992). Esta situação está em acordo com este trabalho, visto que o doce de leite experimental fabricado apenas com sacarose apresentou mudança de velocidade de formação de HMF livre entre 60 min e 75 min de fabricação, sabe-se que este doce só exibia a lactose como açúcar redutor. Já o doce de leite fabricado com sacarose e glicose a velocidade de produção de HMF foi modificada com 45 min a 60 min, podendo inferir este adiantamento à presença de lactose e glicose, ambos açúcares redutores.

No início da fabricação pelo maior teor de de água a mistura apresenta uma atividade de água maior, desta forma em decorrência do tratamento térmico e consequente concentração ao longo do tratamento térmico, tal atividade de água vai diminuído sua quantidade. Isto favorece o aumento da velocidade da reação de Maillard, pois sabe-se que esta reação acontece com maior facilidade em valores intermediários de atividade de água.

O aumento na velocidade de formação de HMF livre no tempo 4 demonstra que neste momento aconteceu formação mais acentuada deste indicador, com isto, pode-se inferir que a formação dos produtos finais da reação de Maillard estarão sendo formados com maior ênfase tornando evidente a coloração caramelada típica deste alimento. A Figura 11 auxilia para a visualização da evolução e da mudança na velocidade de desenvolvimento de HMF livre.



**Figura 11.** Evolução do índice de HMF livre nos diferentes tratamentos ao longo do tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor.

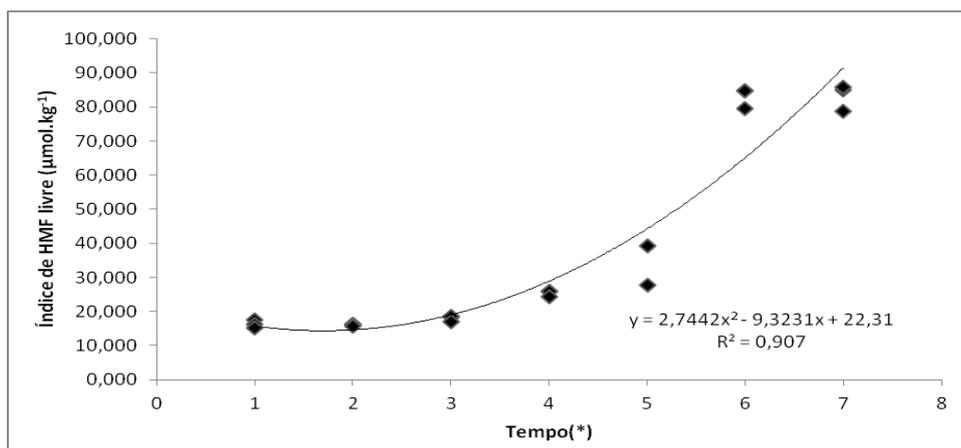
Em estudo semelhante, Pavlovic *et al.* (1993) determinou 5-hidroxiacetilfurfural em doce de leite na tentativa de avaliar a ocorrência e extensão da reação de Maillard durante o processamento térmico. O autor se deparou com aumento no índice de HMF ao longo do tempo de aquecimento, com pico de formação nos 60 min de fabricação.

Embora existam diferenças nas condições tecnológicas e de formulações dos doces analisados nos trabalhos acima citados quando comparado com o trabalho aqui relatado, os resultados da evolução do índice de HMF livre durante a fabricação foram semelhantes, colaborando conjuntamente para a fundamentação do fenômeno aqui observado.

### Análise de regressão

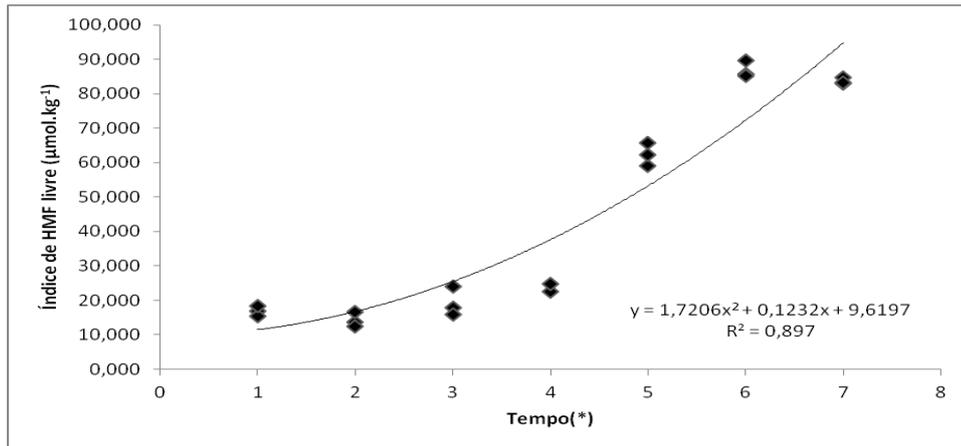
Empregando-se a análise de regressão, permite-se acompanhar a evolução do índice de HMF livre ao longo da fabricação e após trinta dias de armazenamento à temperatura ambiente.

Nas Figuras 12, 13, 14 e 15 são apresentados os resultados da regressão do índice de HMF livre ( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ ) para os quatro diferentes tratamentos realizados.



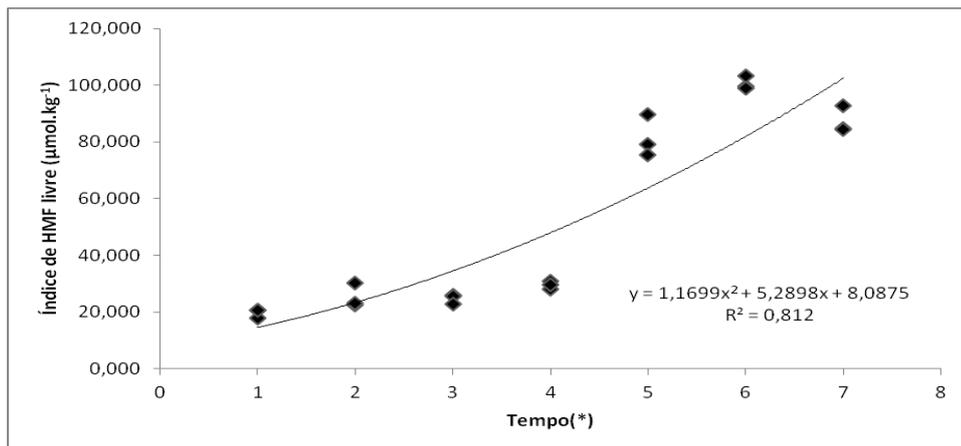
(\*)Tempo 1: sem aquecimento; Tempo 2: 15 min.; Tempo 3: 30 min.; Tempo 4: 45 min.; Tempo 5: 60 min.; Tempo 6: Produto final; Tempo 7: Produto com 30 dias de armazenamento.

**Figura 12.** Regressão polinomial do comportamento do índice de HMF livre, no tratamento 1, nos doces de leite experimentais durante o tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor.



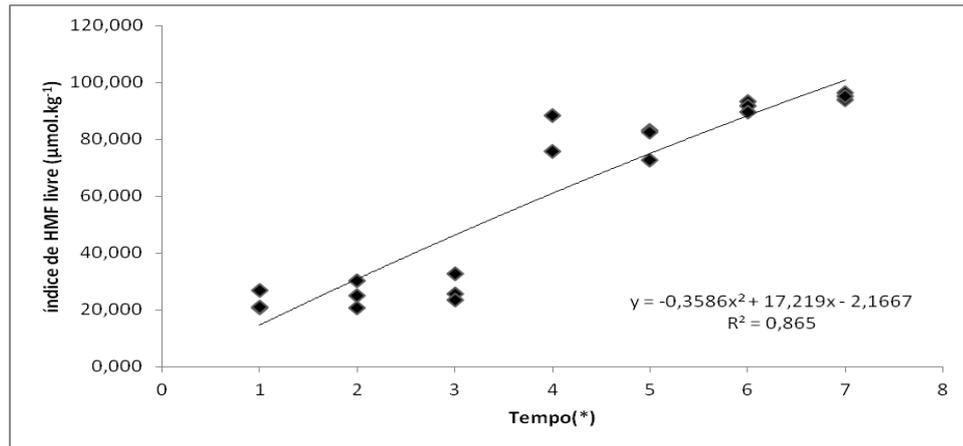
(\*)Tempo 1: sem aquecimento; Tempo 2: 15 min.; Tempo 3: 30 min.; Tempo 4: 45 min.; Tempo 5: 60 min.; Tempo 6: Produto final; Tempo 7: Produto com 30 dias de armazenamento.

**Figura 13.** Regressão polinomial do comportamento do índice de HMF livre, no tratamento 2, nos doces de leite experimentais durante o tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor.



(\*)Tempo 1: sem aquecimento; Tempo 2: 15 min.; Tempo 3: 30 min.; Tempo 4: 45 min.; Tempo 5: 60 min.; Tempo 6: Produto final; Tempo 7: Produto com 30 dias de armazenamento.

**Figura 14.** Regressão polinomial do comportamento do índice de HMF livre, no tratamento 3, nos doces de leite experimentais durante o tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor.



(\*)Tempo 1: sem aquecimento; Tempo 2: 15 min.; Tempo 3: 30 min.; Tempo 4: 45 min.; Tempo 5: 60 min.; Tempo 6: Produto final; Tempo 7: Produto com 30 dias de armazenamento.

**Figura 15.** Regressão polinomial do comportamento do índice de HMF livre, no tratamento 4, nos doces de leite experimentais durante o tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor.

As amostras nos quatro tratamentos, invariavelmente, mostraram um aumento na concentração de HMF livre com o decorrer do tempo de fabricação e armazenamento.

A coloração do alimento estudado pode ser atribuída à reação de Maillard, a qual é influenciada pelo tipo de açúcar (glicose ou lactose), pelo tipo de aminoácido e pelo pH ácido ou básico do alimento. O aquecimento também corresponde a uma variável importante para o aumento da velocidade da RM e consequente aumento do índice de HMF (BRIÃO *et al.*, 2011; BOBBIO e BOBBIO, 1992).

A determinação de HMF livre empregada neste trabalho forneceu dados que vêm demonstrar como a severidade do tratamento térmico pode ser analiticamente acompanhada ao longo da fabricação, aquecimento e estocagem do doce de leite, colaborando para a determinação de um importante indicador para o controle e prevenção das perdas nutricionais durante o intenso tratamento térmico.

### 5.3.2.2 HMF total

O HMF total estima o potencial de escurecimento da amostra sendo dependente da intensidade do tratamento térmico empregado e correspondendo a um índice utilizado para determinar as mudanças induzidas pelo calor no alimento (PEREDA *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2001; SILVA, 2004).

## Estatística descritiva

A estatística descritiva realizada para o HMF total pode ser visualizada na Tabela 9.

**Tabela 9.** Análise estatística descritiva do índice de HMF total dos doces de leite experimentais

Descritiva	Índice de HMF total ( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ )
Média	1.918
Desvio-padrão	344
Mínimo	1.398
Máximo	2.791
Amplitude	1.392
Coeficiente de variação (%)	18

Fonte: Elaborado pelo autor.

O coeficiente de variação encontrado neste experimento foi elevado e praticamente igual ao encontrado por Pinto e Wolfschoon-Pombo (1984) que correspondeu a 18,3%. Este elevado coeficiente de variação pode estar correlacionado com alta variabilidade dos resultados entre os doces de leite analisados. Pinto e Wolfschoon-Pombo (1984) atribuíram a alta variabilidade nos índices de HMF total aos diferentes tipos de ingredientes utilizados na fabricação de doce de leite e às próprias condições de processamento afetando a reação de Maillard e conseqüentemente a evolução da cor do produto final.

O mesmo autor reputa ainda que esta alta variação entre as amostras de doce de leite exigem maiores rigores durante a elaboração deste produto para que ocorra uniformidade da cor e da quantidade de HMF, defendendo que a determinação do indicador analisado poderia ser correlacionada com as características de qualidade do doce de leite.

O índice de HMF nas amostras de granola no trabalho de Shibao (2010) variaram entre  $20 \text{ mg.kg}^{-1}$  ( $158,60 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ ) e  $149 \text{ mg.kg}^{-1}$  ( $1181,51 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ ) e nos flocos de milho o valor ficou entre  $32 \text{ mg/kg}$  ( $253,75 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ ) e  $105 \text{ mg.kg}^{-1}$  ( $832,61 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ ). Gokmen e Suenyuva (2006) encontrou valores de HMF em fórmulas infantis a base de cereal variando entre  $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$  ( $0,80 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ ) e  $57$

mg.kg<sup>-1</sup> (451,99 μmol.kg<sup>-1</sup>). Os resultados apresentados comprovam uma variabilidade no índice de HMF o que corrobora com os resultados aqui apresentados.

Os índices de HMF total encontrados na literatura não são uniformes, autores atrelam esta desuniformidade aos erros inerentes à padronização do método tradicional. Estudos tem demonstrado que a análise colorimétrica por absorvância apresenta uma média de erro de 7% em amostras de leite cru e de 10,1% em amostras de leite UHT, além disto, cerca de 72 % do HMF total mensurado por este procedimento colorimétrico pode ser resultado de outros compostos formados os quais são lidos pela absorvância (MORALES *et al.*, 1992; MORALES *et al.*, 1996).

A utilização do HMF total como índice específico para determinar a extensão da reação de Maillard em leite e derivados é limitada, pela falta de especificidade do método empregado e por este intermediário ter a capacidade de ser formado por outras vias, como por exemplo, pela degradação ácido-catalizada da lactose (FERRER *et al.*, 1999; MORALES e PÉRES, 1998).

Na metodologia proposta por Keeney e Basset (1959) as substâncias que reagem durante o aquecimento na análise de HMF total podem não ser exclusivamente HMF. Por outro lado existe a inespecificidade da reação do complexo TBA – HMF, ou seja, o ácido tiobarbitúrico não é um reagente específico tendo a habilidade de reagir, por exemplo, com grupos aldeídicos (FERRER *et al.*, 1999; PINTO e WOLFSCHOON-POMBO, 1984; MORALES *et al.*, 1996).

O resultado obtido para o índice de HMF total do presente trabalho foi inferior ao encontrado por Pinto e Wolfschoon-Pombo (1984), estes autores demonstraram uma variação de 3.169 μmol.L<sup>-1</sup> a 6.432 μmol.L<sup>-1</sup> e média 4.889 μmol.L<sup>-1</sup> para doces de leite comerciais. Provavelmente o tipo de formulação e tempo de fabricação foram os fatores que mais influenciaram nos menores valores encontrados no trabalho aqui exposto.

Depreende-se, portanto, que o doce de leite experimental apresentou menor formação de HMF, o qual é utilizado como um indicador da severidade do tratamento térmico. A característica nutricional provavelmente foi melhor preservada no doce aqui formulado do que nos doces comerciais analisados no trabalho comparado, possivelmente pelo melhor controle tecnológico.

Assim como o HMF livre, o HMF total em doce de leite quando comparado com outros produtos alimentícios apresenta-se com valores elevados. Neves (2015) se

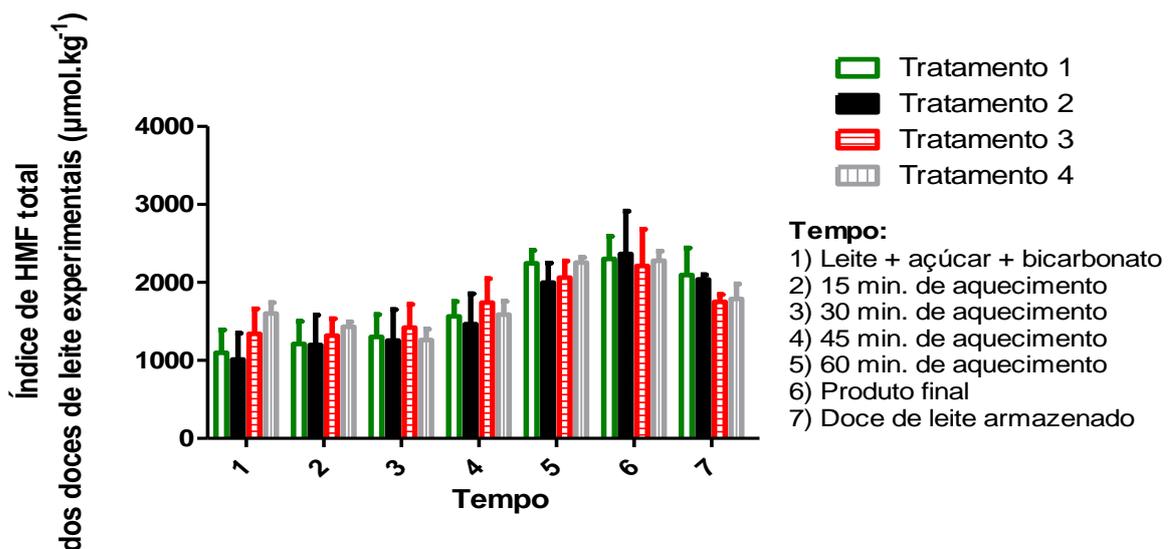
deparou com resultados médios de HMF total para leite UHT convencional de  $12,03 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e para leite delactosado de  $137,75 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Silva (2004) verificou HMF total para leite UHT desnatado o valor médio de  $14,03 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Ainda a título de comparação, Keeney e Basset (1959) encontraram em leite em pó desnatado reconstituído em água HMF total com valores entre  $12,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $28,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

### Análise da variância e teste de comparação de médias

Os resultados da análise de variância indicaram não existir diferença significativa com  $p < 0,01$  entre os tratamentos.

Diferentemente do encontrado para HMF livre, nem a quantidade de bicarbonato nem o tipo de açúcar empregado influenciaram no valor final de HMF total. Neves (2015) realizou trabalho com leite UHT e encontrou valores de HMF total semelhantes entre suas amostras inferindo esta semelhança ao fato do índice de HMF total estar ligado com o grau de extensão da reação de formação deste composto, e esta extensão, por sua vez, correlacionada com a disponibilidade, grau de reatividade do substrato e condições do meio que o alimento se encontra.

Na Figura 16 pode-se visualizar que em todos os tempos o índice de HMF total foi igual nos diferentes tratamentos o que vem ao encontro do resultado obtido pela ANOVA.



**Figura 16.** Evolução do índice de HMF total nos diferentes tempos ao longo do tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor.

Para a variável tempo, concernente ao índice de HMF total, ocorreu diferença significativa em nível de 1% de probabilidade. Foi realizado o Teste de Tukey, para comparar as médias daqueles resultados que foram significativamente diferentes um dos outros, o que está apresentado na Tabela 10.

**Tabela 10.** Índice médio de HMF total em  $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ , nos diferentes tempos, para os doces de leite experimentais

Tempo(*)	Índice de HMF total nos doces de leite experimentais ( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ )
1	1263 c
2	1290 c
3	1310 c
4	1590 bc
5	2199 a
6	2289 a
7	1918 ab

(\*)Tempo 1: sem aquecimento; Tempo 2: 15 min.; Tempo 3=30 min.; Tempo 4=45 min.; Tempo 5=60 min.; Tempo 6=Produto final; Tempo 7=Produto com 30 dias de armazenamento.

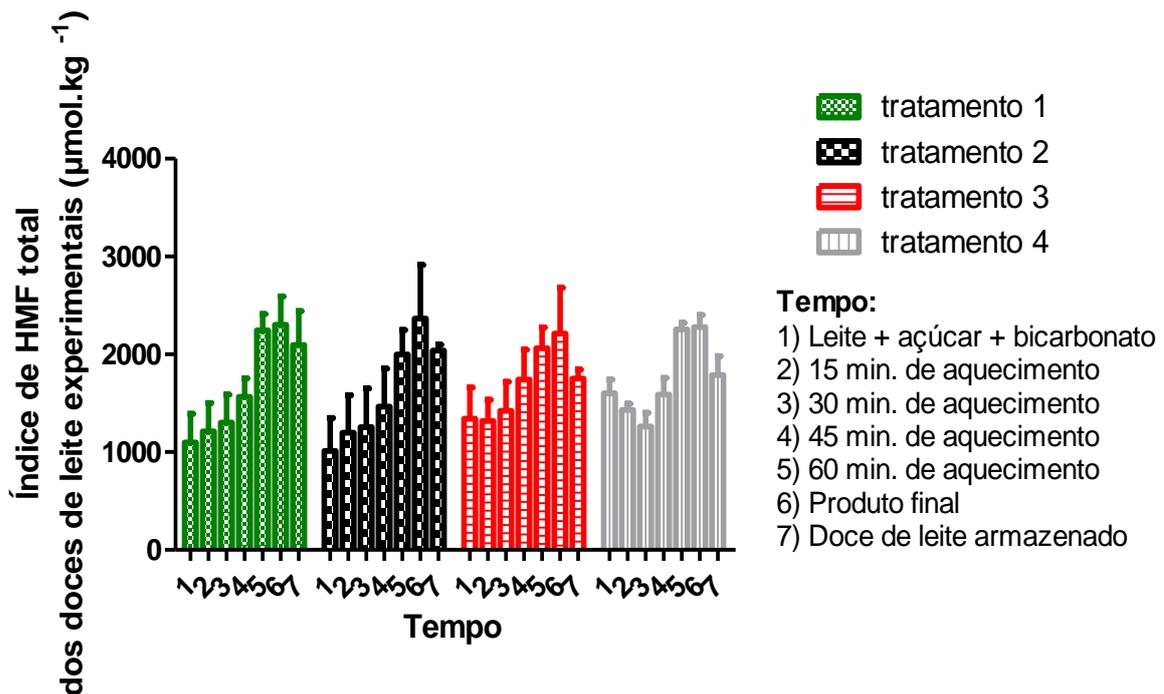
Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Depreende-se que o potencial de formação da reação de escurecimento estimado pelo índice de HMF total atingiu sua plenitude com 60 min de fabricação, visto que os valores deste indicador, neste tempo, para o doce após a fabricação e para o doce com 30 dias de armazenamento, não diferiram estatisticamente.

No caso do HMF total, percebe-se que não houve uma mudança da velocidade de formação abrupta, tal índice foi aumentando gradativamente e continuamente durante a fabricação do doce de leite assim como aconteceu no estudo de Van Boekel (1998).

A gradual evolução do HMF total ao longo do tratamento térmico e estocagem, pode ser melhor visualizado na Figura 17.



**Figura 17.** Evolução do índice de HMF total nos diferentes tratamentos ao longo do tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor.

Esta Figura ilustra o fato de que em todos os tratamentos o aumento de HMF foi gradativo sem ocorrer uma aceleração da velocidade de formação.

Foi verificado no presente trabalho pequena redução do índice de HMF total do tempo 6 (produto final no dia da fabricação) para o tempo 7 (produto final com 30 dias de armazenamento), embora não tenha ocorrido com significância estatística.

Em trabalho realizado por Morales e Pérez (1998) as amostras de leite analisadas apontaram em baixas temperaturas um aumento linear de HMF com o decorrer do tempo, porém em temperaturas mais elevadas sucedeu a degradação aparente deste intermediário ao longo do tratamento térmico.

Os mesmos autores reputam este efeito a três possíveis explicações: 1) degradação dos Produtos de Amadori ligados à proteína por aquecimento intenso; 2) interação de HMF com outros compostos altamente reativos; 3) combinação das duas situações acima expostas.

Van Boekel (1998) evidenciou, em seu trabalho, que a  $130^{\circ}\text{C}$  sucedeu aumento na formação da lisina indisponível mais rapidamente do que ocorreu a formação dos produtos de Amadori. O autor sugere que nesta temperatura a degradação destes produtos de Amadori foi mais rápida do que sua formação e/ou que os resíduos de lisina estiveram envolvidos nos estágios avançados da reação de Maillard.

No estudo realizado por Bellarde (2001) o autor percebeu que durante a concentração do leite, na fabricação de doce de leite, há influência negativamente no índice de HMF, ou seja, em alta concentração a reação de Maillard é mais lenta, pois os solutos apresentam-se imobilizados (BOBBIO e BOBBIO, 1995).

O autor acima citado, concluiu que a maior temperatura e o maior tempo de exposição do alimento ao tratamento térmico influencia negativamente na formação de HMF, isto porque o tratamento térmico intenso produz outros produtos da degradação na reação de Maillard ou pelo fato do HMF poder se comportar com instabilidade e com facilidade de se polimerizar alterando sua quantificação.

### **5.3.3 Teor de sólidos solúveis durante a fabricação**

O teor de sólidos solúveis indica a quantidade de solutos presentes no alimento, afetando a viscosidade, auxiliando para o controle do teor de umidade e correlacionando com o teor de sólidos totais do alimento (SILVA, 2011; PERRONE *et al.*, 2012).

#### **Análise descritiva**

O ponto do doce de leite é determinado no final da fabricação para saber se o produto está pronto para ser resfriado e envasado. Uma das maneiras mais fáceis, eficazes e fiéis de se obter o ponto deste alimento é através da determinação do teor de sólidos solúveis por refratometria (PERRONE *et al.*, 2011a; PERRONE *et al.*, 2012).

Tal forma de se conferir o ponto do doce de leite corresponde a uma característica analítica de importância para verificar os requisitos mínimos de qualidade do produto final (NUNES, 2012; PERRONE *et al.*, 2011a; PERRONE *et al.*, 2012).

A análise descritiva para o teor de sólidos solúveis uniu os resultados dos diferentes tratamentos nos tempos específicos e pode ser visualizada na Tabela abaixo.

**Tabela 11.** Análise estatística descritiva do teor de sólidos solúveis dos doces de leite experimentais

Estatística Descritiva	Tempo (*)						
	1	2	3	4	5	6	7
Média	25,00	28,34	33,20	41,35	55,22	69,82	68,98
Desvio padrão	0,74	0,74	1,88	5,23	9,24	0,98	1,15
Mínimo	23,80	26,83	30,63	36,03	43,80	68,50	66,37
Máximo	26,26	29,37	36,80	51,40	68,97	71,50	70,30
Amplitude	2,46	2,53	6,17	15,37	25,17	3,00	3,93
Coeficiente de variação (%)	2,96	2,62	5,68	12,65	16,73	1,41	1,67

(\*)Tempo 1: sem aquecimento; Tempo 2: 15 min.; Tempo 3=30 min.; Tempo 4=45 min.; Tempo 5=60 min.; Tempo 6=Produto final; Tempo 7=Produto com 30 dias de armazenamento.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O coeficiente de variação e amplitude foram baixos, o que indica uma padronização e uniformidade durante a fabricação no que diz a este atributo. Esta padronização é importante de ser obtida, pois sugere que o doce de leite foi submetido às mesmas condições de fabricação alcançando no final do processo características sensoriais, físico-químicas, composicionais e nutricionais semelhantes entre os produtos formulados.

O tempo 1 foi aquele que apresentou menor °Brix, isto porque o mesmo corresponde à calda sem ainda iniciar o aquecimento. Com a evolução do aquecimento, percebe-se que a média do teor de sólidos solúveis foi aumentando gradativamente de 25°Brix até 69,82°Brix. Mendes (2011) analisou a calda do leite condensado (Leite + açúcar) que também aumentou gradualmente, variando entre 25,46°Brix e 69°Brix no decorrer da fabricação.

### **Análise da variância e teste de comparação de médias**

Pela análise de variância é possível verificar que em nível de 1% de probabilidade não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos. Demonstrando que o teor de sólidos solúveis não variou em decorrência do tipo de ingrediente utilizado.

Silva *et al.* (2013) analisou o efeito da adição de soro ao leite na fabricação de doce de leite através da variação do teor de sólidos solúveis durante a evaporação de três diferentes tratamentos. Em contradição ao encontrado no presente trabalho, um destes tratamentos apresentou maior tempo de fabricação para atingir o ponto adequado, esta situação aconteceu por causa da substituição do leite por soro do leite, ou seja, neste caso o ingrediente utilizado influenciou no aumento do teor de sólidos solúveis.

Os resultados referentes ao teor de sólidos solúveis para a variável tempo mostrou existir diferença significativa com  $p < 0,01$ . Sendo assim, a Tabela abaixo exhibe a comparação de médias, para os resultados que foram significativamente diferentes, realizada através do Teste Tukey.

**Tabela 12.** Índice médio do teor de sólidos solúveis em °Brix, nos diferentes tempos, para os doces de leite experimentais

Tempo(*)	Média do teor de sólidos solúveis (°Brix)
1	25,00 e
2	28,34 de
3	33,20 d
4	41,35 c
5	55,22 b
6	69,82 a
7	68,98 a

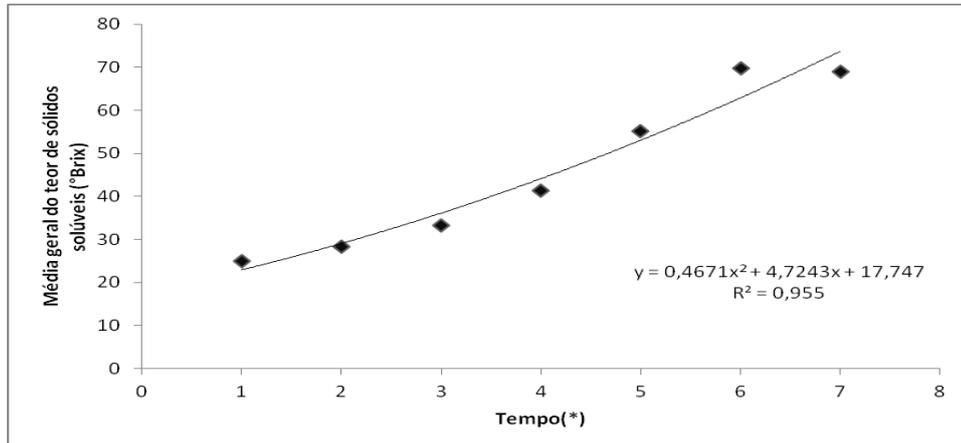
(\*)Tempo 1: sem aquecimento; Tempo 2: 15 min.; Tempo 3=30 min.; Tempo 4=45 min.; Tempo 5=60 min.; Tempo 6=Produto final; Tempo 7=Produto com 30 dias de armazenamento.

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Verificando os resultados apresentados na Tabela acima, conclui-se que o teor de sólidos solúveis aumentou gradativamente com o decorrer do tempo de fabricação. A concentração durante a elaboração de doce de leite torna-se dificultada no começo do tratamento térmico, pois existe uma quantidade grande de água a evaporar. De igual modo ao se aproximar o final da preparação torna-se difícil continuar o processo de evaporação em decorrência do alto ponto de ebulição

do produto nesta etapa. Em razão destes dois fatores os resultados obtidos indicaram que o teor de sólidos solúveis aumenta mais lentamente no início e no final do processo de fabricação do DL o que pode ser visualizado na regressão representada na Figura abaixo.



(\*)Tempo 1: sem aquecimento; Tempo 2: 15 min.; Tempo 3=30 min.; Tempo 4=45 min.; Tempo 5=60 min.; Tempo 6=Produto final; Tempo 7=Produto com 30 dias de armazenamento.

**Figura 18.** Regressão polinomial do comportamento da média geral do teor de sólidos solúveis durante a fabricação dos doces de leite experimentais durante o tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor.

Silva *et al.* (2013) verificou aumento gradual no teor de sólidos solúveis ao longo da produção (0 min a 105 min) do doce de leite, atingindo no final da fabricação  $68(\pm 2)^{\circ}\text{Brix}$ . Os autores encontraram velocidade de concentração inicial menor no doce que possuía elevado teor de água, pela dificuldade na concentração dos sólidos. No trabalho aqui formulado o tempo médio foi de 79 min e a média do teor de sólidos solúveis foi de  $69,82^{\circ}\text{Brix}$  para atingir a concentração final. Portanto, percebe-se que os doces experimentais deste trabalho atingiram a concentração final em tempo inferior do que os doces formulados no trabalho acima comparado, ficando expostos a um menor tempo/temperatura e provavelmente preservando melhor suas características nutricionais.

PIERETTI *et al.* (2012) produziu doce de leite pastoso elaborado com açúcar mascavo obtendo resultado de  $65^{\circ}\text{Brix}$ . Valente *et al.* (2015) utilizou o valor de  $67^{\circ}\text{Brix}$  para a determinação do ponto do produto final em DL. Perrone *et al.* (2011b) fabricou diferentes tipos de DL para confeitaria com quatro distintos espessantes, atingindo no final da fabricação teor de sólidos solúveis entre  $67^{\circ}\text{Brix}$  e  $71,7^{\circ}\text{Brix}$ .

Silva *et al.* (2013) concentrou o doce de leite até obter teor de sólidos solúveis entre 66°Brix e 72°Brix. E por fim, Bellarde (2001) verificou valores entre 68°Brix e 73°Brix em doces de leite formulados com leite em pó. Tendo em vista os resultados acima citados pode-se inferir que os mesmos corroboram com os valores do trabalho em questão.

O teor de sólidos solúveis do doce de leite é considerado elevado quando comparado com outros produtos alimentícios, este comportamento ocorre pela tecnologia de fabricação e tipo de ingrediente utilizado, isto porque o leite e açúcar são altamente concentrados aumentando o conteúdo de nutrientes solúveis (minerais e açúcar). Moura *et al.* (2014) se deparou com valores variando entre 53,3°Brix e 56,6°Brix em doce cremoso de goiaba o que afirma o alto teor de sólidos solúveis do DL em comparação a outros tipos de doce.

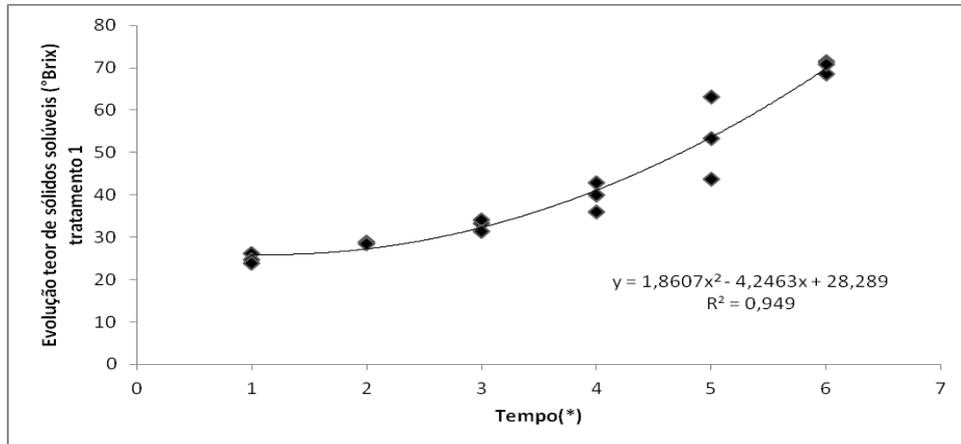
A análise do teor de sólidos solúveis é rápida e simples e por isso muito usada na indústria para controle do processo produtivo, em derivados lácteos concentrados fornece uma estimativa da quantidade total de água presente no produto final, assim os trabalhos consultados permitem superficialmente inferir que quanto maior o teor deste atributo, menor a quantidade de água do alimento (SÁ, 2012b).

Tendo o produto sido estocado em embalagem com tampa hermética, a redução do teor de sólidos solúveis durante o armazenamento não foi estatisticamente relevante, assim como o encontrado no estudo de Garcia e Cardona (2008). Os autores citados não reportaram diferenças expressivas no teor de sólidos solúveis entre doces de leite formulados com baixa caloria durante o período de armazenamento (1, 10 e 20 dias). Mendes (2011), por sua vez, obteve redução do teor de sólidos solúveis, no leite condensado, gradativamente com o decorrer do tempo de armazenamento (1 dia a 120 dias de fabricação), situação esta provavelmente em decorrência da contínua cristalização que este tipo de concentrado sofre.

### **Análise de regressão**

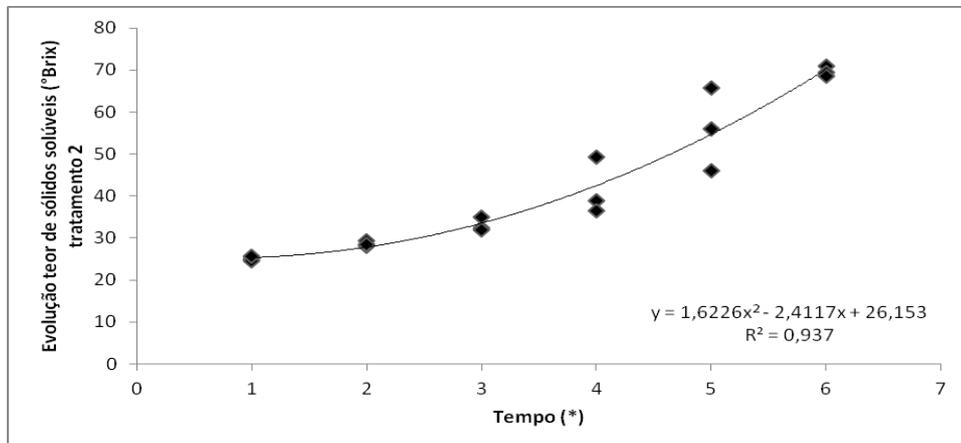
Empregando-se a análise de regressão, pôde-se acompanhar a evolução do teor de sólidos solúveis ao longo da fabricação e após trinta dias de armazenamento à temperatura ambiente. As Figuras 19, 20, 21 e 22 apresentam os resultados para

o teor de sólidos solúveis (°Brix) e a equação que representa o modelo para os quatro diferentes tratamentos realizados.



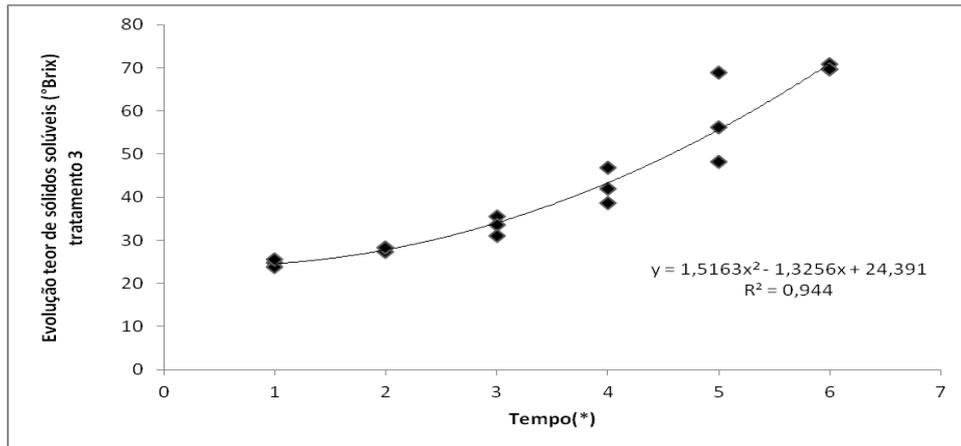
(\*)Tempo 1: sem aquecimento; Tempo 2: 15 min.; Tempo 3=30 min.; Tempo 4=45 min.; Tempo 5=60 min.; Tempo 6=Produto final; Tempo 7=Produto com 30 dias de armazenamento.

**Figura 19.** Regressão polinomial do comportamento do teor de sólidos solúveis, no tratamento 1, nos doces de leite experimentais durante o tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor.



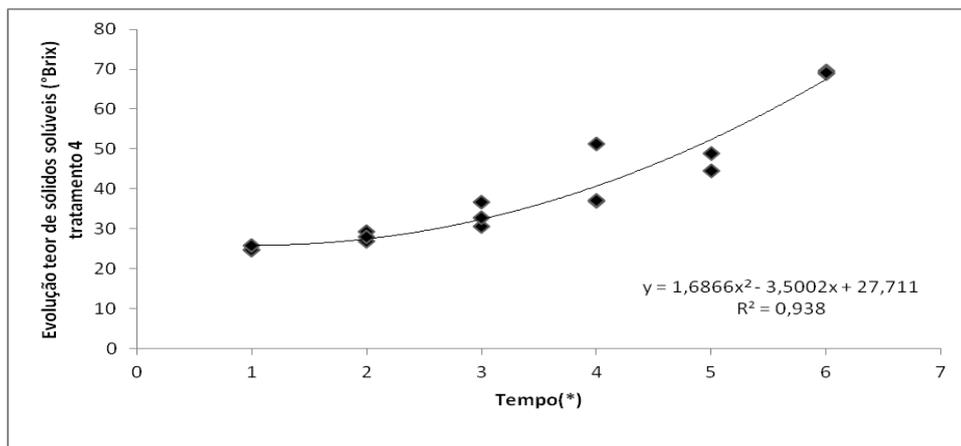
(\*)Tempo 1: sem aquecimento; Tempo 2: 15 min.; Tempo 3=30 min.; Tempo 4=45 min.; Tempo 5=60 min.; Tempo 6=Produto final; Tempo 7=Produto com 30 dias de armazenamento.

**Figura 20.** Regressão polinomial do comportamento do teor de sólidos solúveis, no tratamento 2, nos doces de leite experimentais durante o tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor.



(\*)Tempo 1: sem aquecimento; Tempo 2: 15 min.; Tempo 3=30 min.; Tempo 4=45 min.; Tempo 5=60 min.; Tempo 6=Produto final; Tempo 7=Produto com 30 dias de armazenamento.

**Figura 21.** Regressão polinomial do comportamento do teor de sólidos solúveis, no tratamento 3, nos doces de leite experimentais durante o tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor.



(\*)Tempo 1: sem aquecimento; Tempo 2: 15 min.; Tempo 3=30 min.; Tempo 4=45 min.; Tempo 5=60 min.; Tempo 6=Produto final; Tempo 7=Produto com 30 dias de armazenamento.

**Figura 22.** Regressão polinomial do comportamento do teor de sólidos solúveis, no tratamento 4, nos doces de leite experimentais durante o tratamento térmico e estocagem, elaborado pelo autor.

Visualiza-se que o modelo matemático que melhor ajustou os dados obtidos foi a polinomial. As amostras nos quatro tratamentos, invariavelmente, mostraram um aumento na concentração do teor de sólidos solúveis com o decorrer do tempo.

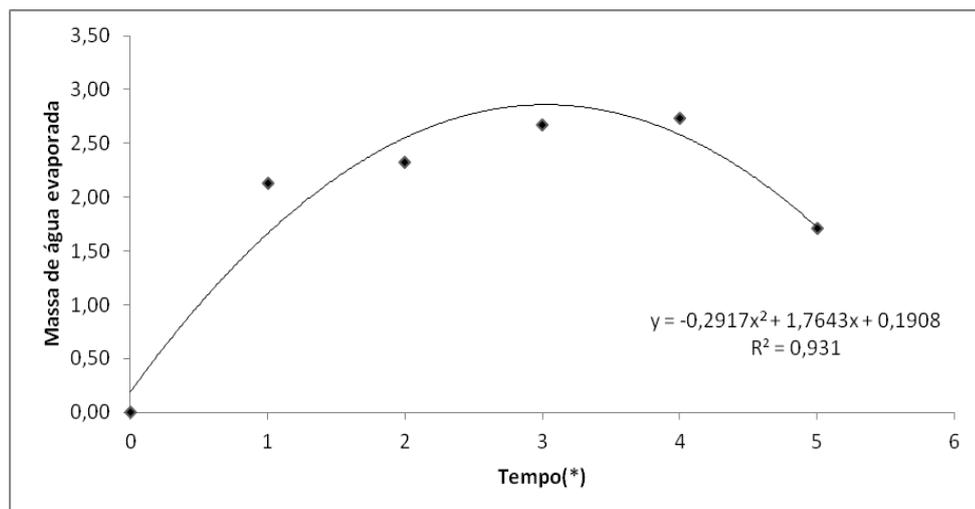
Durante a fabricação de doce de leite há evaporação do leite o que é dependente da pressão externa, do princípio hidrostático, da carga calorífica e do

teor de sólidos solúveis. No início do processo a calda formada pela mistura dos ingredientes possui elevada quantidade de água o que permite uma evaporação mais acelerada. Com o decorrer do aquecimento há aumento da viscosidade e concentração dos sólidos totais (PERRONE *et al.*, 2011a).

O resultado encontrado para o teor de sólidos solúveis neste trabalho pode ser analiticamente acompanhado ao longo do tratamento térmico e estocagem do doce de leite, sendo um indicador para o controle da fabricação, determinação do ponto final do produto elaborado, homogeneidade das amostras formuladas e extensão do *shelf life*.

### Taxa de massa evaporada de água

A massa de água evaporada em relação ao tempo de fabricação do doce de leite pode ser visualizada na Figura 23.

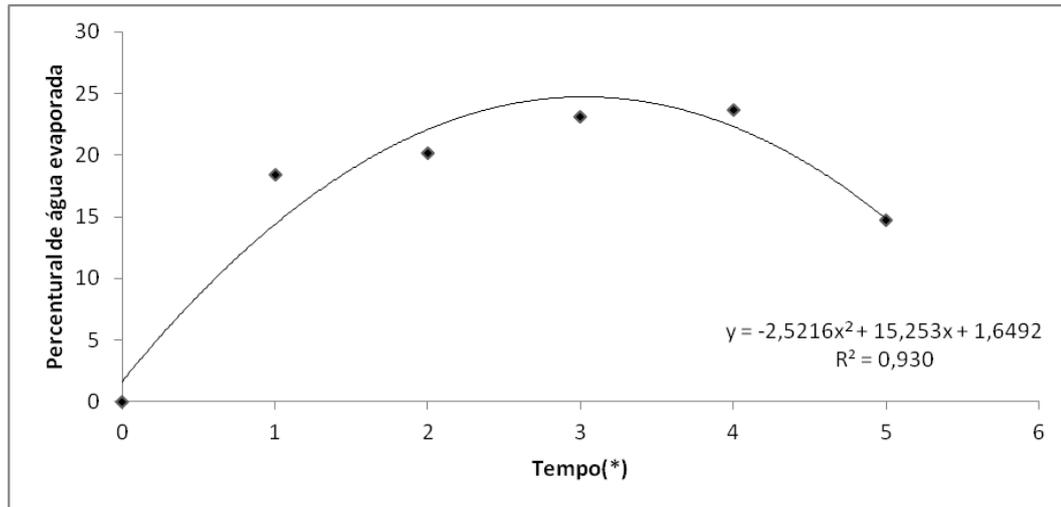


(\*)Tempo 1: sem aquecimento; Tempo 2: 15 min.; Tempo 3=30 min.; Tempo 4=45 min.; Tempo 5=60 min.; Tempo 6=Produto final; Tempo 7=Produto com 30 dias de armazenamento.

**Figura 23.** Taxa de massa de água evaporada (kg) em função do tempo de fabricação do doce de leite partindo-se de 18,02 kg de calda, elaborado pelo autor.

Em razão das características da curva o modelo matemático quadrático foi aquele que melhor ajustou para a taxa de massa de água evaporada.

A Figura 24 expõe o percentual de água evaporada durante a fabricação em função do tempo que o produto ficou exposto ao tratamento térmico.



(\*)Tempo 1: sem aquecimento; Tempo 2: 15 min.; Tempo 3=30 min.; Tempo 4=45 min.; Tempo 5=60 min.; Tempo 6=Produto final; Tempo 7=Produto com 30 dias de armazenamento.

**Figura 24.** Percentual de água evaporada em função do tempo de fabricação do doce de leite partindo-se de 18,02 kg de calda, elaborado pelo autor.

Durante a fabricação de doce de leite, busca-se uma relação ideal entre a cor, tempo de fabricação, temperatura do tacho e formulação do produto. Infere-se que durante a elaboração dos doces experimentais a temperatura no tacho e composição mantiveram-se constantes. No caso de utilizar-se tachos de construção diferente, variando a capacidade útil do equipamento ou mesmo a quantidade de doce formulado, em fábricas de doce de leite, a aplicação dos modelos matemáticos acima expostos permitirá que se obtenha a mesma taxa de evaporação e o mesmo percentual de água evaporada.

A produção de doce de leite equivalente ao formulado neste estudo pode ser conseguida a partir da repetição da curva demonstrada na Figura 23. Se atingido o mesmo percentual de água evaporada em cada tempo, mesmo em diferentes condições experimentais ou fabris, o doce resultante tenderá a apresentar características muito semelhantes ao doce obtido neste trabalho, de forma independente do volume, do tipo de tacho ou da composição do produto formulado. Este mesmo percentual de água evaporada pode ser alcançado por meio do controle do teor de sólidos solúveis e da taxa de massa de água evaporada durante a fabricação.

#### 5.3.4 Correlação do índice de 5-hidroxiacetilfurfural e teor de sólidos solúveis.

A análise de correlação realizada entre o teor de sólidos solúveis e o índice HMF livre nas amostras experimentais foi positiva significativa (com  $p < 0,05$  e correlação de 0,90). Esta correlação demonstra que à medida que o teor de sólidos solúveis aumenta o HMF livre também eleva seus valores. O trabalho formulado por Bellarde (2001) está de acordo com o encontrado no presente estudo, já que o índice de HMF aumentou com a elevação do teor de sólidos no alimento.

Ao longo do processamento de DL ocorre aquecimento elevado, desidratando a calda e aumentando a concentração dos ingredientes o que gera como consequência a elevação do teor de sólidos solúveis. A combinação dos efeitos da alta temperatura de exposição com o crescente aumento do teor de sólidos solúveis acelera a velocidade da reação de Maillard durante a fabricação de doce de leite.

Autores sugerem que o valor do índice de HMF eleva-se linearmente com o aumento da concentração do açúcar e com o tempo de aquecimento, ou seja, com o aumento do teor de sólidos solúveis. Estes autores também entendem que a adição de diferentes ingredientes e a condição de processamento como pH, tempo, temperatura e concentração afetam a formação da RM e de seus produtos assim como a cor final do alimento (BELLARDE, 2001; PINTO e WOLFSCHOON-POMBO, 1984).

O aquecimento prolongado e a concentração no teor de sólidos induz a uma série de modificações químicas como diminuição da atividade de água, mudança no equilíbrio salino, degradação da lactose, desnaturação e associação das frações de proteína, saturação da lactose e sacarose na solução, reação de Maillard o que resulta em uma maior conservação do produto, diminuição do pH, aumento da estabilidade térmica e da viscosidade, cristalização além do escurecimento com possível formação de compostos antioxidantes (PERRONE, 2007).

A concentração de leite e açúcar com o decorrer do tempo de fabricação do doce de leite, leva à formação deste alimento que usualmente apresenta 95,5% a 97% de sólidos totais, 3% a 4% de umidade, 12% a 15% de proteína total, 69% a 75% de lactose, 0,8% a 1% de gordura, 7,3% a 8,3% de cinzas, atividade de água de 0,85, pH 6,75 (BELLARDE, 2001). Portanto, a modificação da característica da calda (leite + açúcar) com o decorrer da formulação do doce de leite origina um

alimento mais propício ao aumento da velocidade da reação de Maillard e com maior teor de sólidos solúveis.

#### 5.4 Comparação composicional, nutricional e do indicador do tratamento térmico entre doces comerciais e doces experimentais

Observando o trabalho aqui formulado infere-se que alguns resultados dos atributos analisados foram divergentes entre os doces de leite comerciais e os doces de leite experimentais. Provavelmente, esta diferença se deve ao maior controle durante a fabricação experimental.

Para uma melhor visualização desta diferença, foi formulada a Tabela 13, a qual compara as médias de todos dos atributos composicionais, nutricionais e de indicadores de tratamento térmico (5-hidroximetilfurfural) encontrados nos doces de leite comerciais e nos doces de leite experimentais deste estudo.

**Tabela 13.** Comparação das médias encontradas para os atributos composicionais, nutricionais e dos indicadores do tratamento térmico nos DL comerciais e nos DL experimentais

Atributos analisados	Média dos doces de leite comerciais	Média dos doces de leite experimentais
Umidade % (m/m)	32,09	28,55
Lipídeos % (m/m)	3,58	6,29
Proteínas % (m/m)	5,10	4,57
Cinzas % (m/m)	1,64	1,69
Carboidratos % (m/m)	57,59	58,90
Atividade de água	0,85	0,84
Teor de sólidos solúveis (°Brix)	65,94	68,98
HMF livre ( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ )	494	87
HMF total ( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ )	1.797	1.918
Valor energético ( $\text{kcal.100g}^{-1}$ ) (*)	293	310

(\*) Cálculo baseado em: 1g de Lipídeos=9 kcal; 1 g de carboidrato=4 kcal; proteína=4 kcal..

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dentre os requisitos obrigatórios na legislação, a fabricação experimental apresentou média de umidade, lipídeos e cinzas dentro da conformidade enquanto que os doces comerciais só apresentaram valores médios de proteínas e cinzas de acordo com o recomendado.

Os resultados médios de cinzas, carboidratos, atividade de água e teor de sólidos solúveis foram semelhantes entre os doces analisados, demonstrando uma uniformização em relação a estes atributos. A umidade, quando não está em conformidade com a legislação vigente, sugere um produto que não foi concentrado durante tempo e temperatura adequados, além de poder demonstrar a utilização de leite fraudado com adição de água.

O teor de lipídeos e proteínas no doce de leite quando não estão em conformidade com a legislação podem sugerir que o leite utilizado não continha quantidade adequada destes compostos o que pode influenciar na qualidade do produto final e gerar defeitos como perda da característica de textura ou ainda modificação da estrutura do produto por desnaturação proteica. Por outro lado, os teores de proteínas também são influenciados pelo alto teor de umidade nos doces.

O índice de HMF livre divergiu entre as amostras comerciais e as amostras experimentais, sendo maior nos doces comerciais. Esta situação pode ser decorrente de um maior controle do processamento dos doces de leite experimentais, revelando que estes doces não estiveram expostos por um período prolongado ao aquecimento térmico, somente durante o tempo necessário para atingir a viscosidade, cor e sabor característicos do produto. Outras possíveis causas do maior escurecimento nos doces comerciais podem estar relacionados ao uso industrial de glicose e/ou redutor de acidez em maiores proporções do que no experimento realizado neste projeto.

Os índices de HMF total apresentaram semelhança entre os doces comerciais e doces experimentais, estando na mesma ordem de grandeza. Sabe-se que o HMF livre está relacionado com o resultado deste indicador no momento da análise e o HMF total correlaciona-se com o potencial de formação de 5-hidroximetilfurfural na amostra analisada. Pode-se prever que os dois tipos de doce tendem a apresentar o mesmo grau de escurecimento final, ao longo de um tempo prolongado, ainda que exibam colorações distintas em um tempo específico.

Segundo Simonyan (1972) *apud* Ulbricht *et al.* (1984) a ingestão limite diária estimada de HMF para uma pessoa com 60 kg corresponde a 150 mg/dia (1189

$\mu\text{mol}/\text{dia}$ ), o equivalente a 2,5 mg/kg de peso (20  $\mu\text{mol}/\text{dia}$ ). Em estudo mais recente feito por Janzowski *et al.* (2000) descobriu-se que esta estimativa parece ser bem elevada, levando em consideração os dados analíticos mais recentes sobre o conteúdo de HMF em itens alimentares básicos como pão. Assim, os últimos autores citados sugeriram uma ingestão média diária de 30 mg/dia (238  $\mu\text{mol}/\text{dia}$ ) a 60 mg/dia (476  $\mu\text{mol}/\text{dia}$ ) para uma pessoa de 60 kg (0,5 mg/kg=4  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  a 1 mg/kg=8  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) como sendo uma estimativa mais realista da ingestão de HMF. Desta forma, Rosatella *et al.* (2011), como uma maneira de conciliar os valores mínimos e máximos da ingestão por dia de HMF estipulada pelos autores anteriores, sugerem uma ingestão diária entre 30 mg/dia (238  $\mu\text{mol}/\text{dia}$ ) e 150 mg/dia (1189  $\mu\text{mol}/\text{dia}$ ) para uma pessoa de 60 kg equivalendo a 0,5 mg/kg (4  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) a 2,5 mg/kg (20  $\mu\text{mol}/\text{dia}$ ).

Por meio de cálculos matemáticos é possível inferir que, para atingir a última recomendação acima mencionada, de ingestão diária de HMF (30 mg/dia até 150 mg/dia), seria necessário o consumo de três a 15 porções/dia do doce de leite comercial e de 17 a 86 porções/dia do doce de leite experimental analisados neste trabalho, sendo cada porção equivalente a 20 g.

De acordo com a literatura o doce de leite usualmente apresenta valor calórico acima de 300 kcal.100 g<sup>-1</sup> pela alta concentração de açúcar e gordura. O valor calórico encontrado para o doce de leite experimental mostrou-se com uma pequena elevação do doce de leite em relação ao doce de leite comercial. Pode-se inferir este reduzido valor calórico do DL comercial ao menor teor de lipídeo apresentado por ele, o que não é interessante, pois o mesmo não conseguiu atingir o mínimo estabelecido por Brasil (1997) para tal atributo.

Percebe-se que o doce de leite, somente quando ingerido em quantidades muito elevadas, o que é praticamente inviável, estaria auxiliando para o aumento do consumo de HMF. Apesar deste produto alimentício exibir um valor energético considerável, o mesmo possui importantes teores de proteína, lipídeos e minerais, principalmente pela presença da matéria prima leite. Com isto, depreende-se que o doce de leite pode fazer parte de uma alimentação saudável, desde que consumido em quantidade adequada associada a uma dieta equilibrada nutricionalmente.

## 6. CONCLUSÃO

Com base nas condições utilizadas neste trabalho e nos resultados obtidos, pode-se formular as conclusões abaixo.

Foi possível inferir que as fabricações experimentais de DL foram úteis para constatar a influencia dos diferentes ingredientes nas características físico-químicas, composicionais e no perfil nutricional do produto formulado.

As análises físico-químicas e composicionais do doce de leite contribuíram para a verificação da padronização e homogeneidade dos doces analisados. Tanto as amostras comerciais, quanto as experimentais não atenderam completamente os limites estabelecidos pela legislação vigente, porém, as amostras experimentais mostraram-se mais condizentes com os limites estabelecidos pela legislação do que as amostras comerciais.

A variação do índice de 5-hidroxiacetilfurfural foi maior nas amostras comerciais, provavelmente em consequência das diversas formulações utilizadas ou pela modificação do tempo e temperatura durante a fabricação dos diferentes tipos de doces existentes no mercado.

A curva padrão elaborada para 5-hidroxiacetilfurfural neste trabalho, foi eficaz para a determinação das concentrações das amostras de doce de leite.

Ao longo da fabricação, houve aumento do índice de 5-hidroxiacetilfurfural o que pôde ser atribuído às diferentes formulações utilizadas. É possível presumir que a adição de glicose e o incremento na quantidade de bicarbonato de sódio foram determinantes para o aumento deste indicador.

A análise espectrofotométrica implantada para HMF permitiu constatar o perfil das amostras em relação às condições de processamento, ingredientes utilizados e indiretamente, características nutricionais. O HMF livre apresentou resultados mais uniformes do que HMF total. Desta forma, o índice de HMF livre contribuiu melhor para o entendimento das influencias das formulações e do tempo de fabricação do doce de leite.

O teor de sólidos solúveis aumentou gradualmente ao longo da fabricação devido à concentração que os ingredientes foram submetidos no decorrer do aquecimento. Este atributo é considerado uma variável de verificação dos requisitos mínimos de qualidade do produto analisado.

A taxa de massa de água evaporada e sua respectiva equação, obtidas com auxílio da regressão polinomial, permite reproduzir, em produções experimentais e industriais de doce de leite, as mesmas características do produto experimental deste trabalho independente do volume, do tipo de tacho ou composição.

Houve relação positiva e significativa entre o HMF livre e teor de sólidos solúveis. Constatou-se que o aquecimento juntamente com a concentração que o produto lácteo estudado sofre ao longo da fabricação, resulta no aumento do teor de sólidos solúveis e na velocidade da reação de Maillard com conseqüente elevação do índice de HMF.

O maior controle experimental dos doces de leite experimentais em comparação com os doces de leite comerciais é evidenciado quando se confronta os resultados das análises físico-químicas, composicionais e do índice de HMF. Portanto, conclui-se que os doces experimentais apresentaram resultados mais homogêneos, padronizados e em maior conformidade com o RTIQDL.

A quantidade diária de consumo de doce de leite necessária para atingir o limite sugerido de ingestão por dia de HMF mostrou-se elevada, indicando que este produto alimentício pode fazer parte de uma dieta saudável e equilibrada.

## 7. DIREÇÃO PARA FUTUROS ESFORÇOS

Por muitos anos os estudos relacionados com a reação de Maillard focalizaram apenas os alimentos e os sistemas alimentares, neste caso esta reação acontece durante o tratamento térmico, processamento e estocagem sendo chave para a determinação de cor, *flavor* e qualidade nutricional. A RM *in vivo* ficou conhecida pela descoberta da primeira proteína glicada relacionada com a glicação descoberta em 1955, porém, a maior atenção só foi dada nas últimas três décadas já que as consequências negativas desta reação tornaram-se mais evidentes (KUNKEL e WALLENIUS, 1955; URIBARRI *et al.*, 2010; VISTOLI *et al.*, 2013).

Há a formação de produtos finais de glicação avançada pela reação de Maillard/glicação sendo a carboximetilisina, pirralina, pentosidina exemplos de AGEs bem caracterizados na literatura e amplamente estudados. Sabe-se que a formação de tais produtos integra uma complexa sequência e reações paralelas ocorrendo tanto no alimento quanto no organismo humano e não estão totalmente elucidadas até o momento (BARBOSA *et al.*, 2008; GOLDBERG *et al.*, 2004; URIBARRI *et al.*, 2010; VISTOLI *et al.*, 2013; VLASSARA *et al.*, 2008).

Não existe ainda nenhum alimento ou componente alimentar que seja indicado para a redução de AGEs endogenamente, porém algumas substâncias como piridoxamina, alilcisteína, compostos fenólicos, vitaminas C e E, tiamina, taurina e carnosina estão sendo investigadas por possivelmente reduzir a concentração destes produtos *in vivo*. Também tem sido estudados agentes que apresentam propriedades anti-age como medicamentos, suplementos e terapias dietéticas os quais atuam na diminuição da absorção de AGEs, inibição da formação de produtos de Amadori, prevenção da progressão dos produtos de amadori a AGEs e diminuição do estresse oxidativo (BARBOSA *et al.*, 2008; POULSEN *et al.*, 2013).

A modificação da técnica culinária como ferver, aumento da umidade durante a cocção, menor tempo e temperatura de cozimento, utilização de ingredientes ácidos como limão e vinagre e a realização de uma dieta com ingestão equilibrada de alimentos como queijos gordos, carnes e produtos processados, e aumento do consumo de peixe, produtos lácteos como leite e queijos menos gordurosos, frutas e legumes são estratégias para reduzir a ingestão de AGEs exógenos (BARBOSA *et al.*, 2008; GOLDBERG *et al.*, 2004; POULSEN *et al.*, 2013; URIBARRI *et al.*, 2010).

A quantificação de AGEs nos alimentos é uma estimativa, isto porque o cálculo muitas vezes se relaciona apenas com um marcador, porém existe uma variedade individual entre os diferentes tipos de alimentos, além disto muitos destes produtos são instáveis e podem ser degradados antes ou durante as medições tornando difícil sua quantificação. Por isso observa-se a importância de se encontrar o marcador utilizado para a detecção destes produtos. Autores como Goldberg *et al.* (2004) e Uribarri *et al.* (2010) utilizaram técnica de ELISA para a determinação de carboximetilisina como representante dos produtos finais de glicação avançada (POULSEN *et al.*, 2013).

A dieta moderna apresenta uma grande variedade de alimentos expostos ao cozimento e processamento térmico, por razões de segurança e conveniência, bem como para melhorar o sabor, cor e aparência, percebe-se que as pessoas estão expostas cada vez mais a uma grande quantidade de ingestão de alimentos ricos em produtos finais de glicação avançada contribuindo assim para o *pool* endógeno. Este *pool* endógeno de formação de AGEs está relacionado com o balanço entre a formação endógena/absorção exógena e a degradação/eliminação por sistemas especializados (BARBOSA *et al.*, BASTOS *et al.*, 2012; 2008; POULSEN *et al.*, 2013; URIBARRI *et al.*, 2010; VISTOLI *et al.*, 2013; VLASSARA *et al.*, 2008).

A necessidade de maiores estudos para um melhor esclarecimento das diferentes fases, via de formação, *pool* endógeno, absorção, eliminação e influências positivas e negativas dos produtos formados pela reação de Maillard e glicação tornam-se evidentes visto que este tipo de reação de escurecimento não enzimático apresenta uma complexidade e muitos fatores influenciadores. Além disto, o entendimento da relação entre a reação de Maillard e glicação parecem ser um campo de estudo interessante e com uma vasta área ainda a ser explorada.

A ausência de um limite mais seguro da quantidade ideal e recomendada, específico para a população brasileira, de ingestão de produtos da reação de Maillard ou produtos finais de glicação avançada corresponde a um tema ainda não explorado pela academia e que pode revelar grande importância nutricional e para a saúde populacional. Estudos demonstrando como diferentes técnicas de preparo, nutrientes, suplementos e medicamentos afetam positivamente ou negativamente o *pool* endógeno de AGEs parece ser um campo de estudo a ser melhor compreendido.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMES, J. M. Applications of the Maillard reaction in the food industry. **Food Chemistry**. v. 62, n. 4; p. 431-439, 1998.

ANDRADE, C. D.; SEIQUER, I.; NAVARRO, M. P. MORALES, F. J. Estimation of hydroxymethylfurfural availability in breakfast cereals. Studies in Caco-2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46; p. 1600–1607, 2008.

ANDRADE, C. D. Maillard reaction products: some considerations on their health effects. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 52; n. 1; p.53-60, 2014.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos – Teoria e prática**. 4. Ed. Viçosa: Ed. UFV, 2008. 596p.

BARBOSA, J. H. P., OLIVEIRA, S. L., SEARA, L. T. O papel dos Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do Diabetes. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.** v. 52, n. 6, p. 940-950, 2008.

BASTOS, D. H. M.; SHIBAO, J.; FERREIRA, E. L.; BOMBO, A. J. Produtos da reação de Maillard em alimentos industrializados. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.**, v. 36, n. 3, p. 63-78, 2011.

BASTOS, D. H. M.; MONARO, E.; SIGUEMOTO, E.; SÉFORA, M. Maillard Reaction Products in Processed Food: Pros and Cons. In: VALDEZ, B. (Ed.). **Food Industrial Processes – Methods and Equipment.**, v. 1, cap.15, p. 281-300, 2012.

BELLARDE, F. B. Produção de doce de leite formulado com leite em pó: influência das variáveis de processo no desenvolvimento da cor, textura e propriedades sensoriais. **Tese de doutorado em Tecnologia de Alimentos**. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP. 2001.193p.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do Processamento de Alimentos**. 3.Ed. Campinas: Varela, 1992. 143p.

BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 354, de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico de identidade e qualidade de doce de leite. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 172, p. 37-38, 08 set. 1997. Seção I.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.62 de 29 de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, de Leite Cru Refrigerado, de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel,

em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil** Instrução Normativa 62. 2011. Seção 1, p.13

BRIÃO, V. B.; FOLLMER, L.; SOUZA, M.; RODRIGUES, V. M. Cinética do escurecimento não-enzimático com soluções modelo de açúcares e aminoácidos em pH neutro e ácido. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 1, p. 87-93, 2011.

CAI, W.; HE, J. C.; ZHU, L.; CHEN, X.; WALLENSTEIN, S.; STRIKER, G. E.; VLASSARA, H. Reduced oxidant stress and extended lifespan in mice exposed to a low glycotxin diet - Association with Increased AGER1 Expression. **The American Journal of Pathology**, v. 170, p. 1893-1902, 2007.

Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI). Composto de banco de dados PubChem, CID=237332. 2005. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/237332>>. Acesso em: 11 jan. 2016.

CHARISSOU, A.; AMEUR, A.; ARAGON, I. B. Evaluation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the quantification of carboxymethyllysine in food samples. **Journal of Chromatography**, v. 1140, p. 189-194, 2007.

COLOMBO, M.; PERRONE, I. T.; STEPHANI, R.; SILVA, P. H. F. Avaliação da viscosidade durante a fabricação do doce de leite tradicional adicionado de amido de milho nativo. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, v. 64, n. 370, p. 14-17, 2009.

DEMIATE, I. M.; KONKEL, F. E.; PEDROSO, R. A. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de doce de leite pastoso - composição química. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p.108-114, 2001a.

DEMIATE, I. M.; KONKEL, F. E.; PEDROSO, R. A. Enzymatic determination of starch in *doce de leite* using dialysis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 21, n. 3, p. 339-342, 2001b.

DeMAN, J. M. **Principles of Food Chemistry**. Third Edition. Gaithersburg, Maryland: An aspen publication, 1999. 488p.

FA, M.; DIANA, A.; CARTA, G.; CORDEDDU, L.; MELIS, M. P.; MURRU, E.; SOGOS, V.; BANNI, S. Incorporation and metabolism of c9, t11 and t10, c12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers in rat brain. **Biochim Biophys Acta**, v. 1736, n. 1, p. 61-66, 2005.

FAYLE, S. E.; GERRARD, J. A. **The Maillard Reaction**. United Kingdom: royal society of chemistry, 2002, 120p.

FELLOWS, P.J. Tecnologia do **Processamento de Alimentos – Princípios e Prática**. Tradução Florencia Cladera Oliveira (*et al.*). 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602p.

FENNEMA, O. R.; SRINIVASAN D.; KIRK, L. P. **Química de Alimentos de Fennema**. Tradução Adriano Brandelli (*et al.*). 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900p.

FERREIRA, L. O. Avaliação das características de qualidade de doces de leite comerciais. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, v. 67, n. 387, p. 05-11, 2012.

FERRER, E.; ALEGRIA, A.; FARRÉ, R.; ABELLÁN, P. ROMERO, F. Revision: Indicadores del deterioro de la calidad proteica y del valor nutritivo de la leche. **Food Science and Technology International**, v. 5; n. 6; p. 447-461, 1999.

FERRER, E.; ALEGRÍA, A.; COURTOIS, G.; FARRÉ, R. High-performance liquid chromatographic determination of Maillard compounds in store-brand and name-brand ultra-high-temperature-treated cows' milk. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 599-606, 2000.

FOX, P. F. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. First edition. New York: Thomson Science, 1998. 460p.

FRANCISQUINI, J. D.; OLIVEIRA, L. N.; PEREIRA, J. P. F.; SILVA, P. H. Doce de leite: Características físico-químicas e reológicas. **Revista Higiene Alimentar**, v. 27, n. 218-219, p.1127-1131, 2013a.

FRANCISQUINI, J. D.; OLIVEIRA, L. N.; FERREIRA, A. M.; SILVA, P. H. F. Aspectos tecnológicos e nutricionais do doce de leite: índice de 5-hidroximetilfurfural. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 38, p. 202, 2013b.

GALLINA, D. A.; ROGALSKY, A. D.; ALVES, A. T. S. Comparação de métodos para determinação do extrato seco total em doce de leite pastoso. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, v. 64, n. 370, p. 10-13, 2009.

GAMA, M. A. S.; RAPOSO, N. R. B.; MURY, F. B.; LOPES, F. C. F.; NETO, E. D.; TALIB, L. L.; GATTAZ, W. F. Conjugated linoleic acid-enriched butter improved memory and up-regulated phospholipase A2 encoding-genes in rat brain tissue. **J. Neural Transm.**, v. 122, n. 10, 2015.

GARCIA, F. E. V.; CARDONA, L. J. M. Estimación de la vida útil de un arequipe bajo en calorías. **Revista lasallista de investigación**, v. 6, n. 1, 2008.

GAZE, L. V.; OLIVEIRA, B. R.; FERRAO, L. L.; GRANATO, D.; CAVALCANTI, R. N.; JUNIOR, C. A. C.; CRUZ, A. G.; FREITAS, M. Q. Preference mapping of dulce de leche commercialized in Brazilian markets. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 3, p. 1443–1454, 2015.

GLATT, H.; SCHNEIDER, H. L. Y.; LIU, Y. A cell line for the sensitive detection of genotoxic effects induced by carbohydrate pyrolysis products and other food borne chemicals. **Mutation Res.**, v. 580, p. 41-52, 2005.

GOKMEN, V.; SENYUVA, H. Z. Study of colour and acrylamide formation in coffee, wheat flour and potato chips during heating. **Food Chem.**, v. 99; n. 2; p. 238-243, 2006.

GOLDBERG, T. CAI, W.; PEPPA, M.; DARDAINE, V.; BALIGA, B. S.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. **Journal of the american dietetic association**. v. 104; n. 8; p. 1287- 1291, 2004.

GONÇALVES, G. R. F; OLIVEIRA, J. S.; BONOMO, R. C. F.; NETO, B. A. M.; LEITE, C. X. S.; GOMES, G. M. S. Caracterização físico-química do doce de leite em barra com diferentes concentrações de líquido de cacau. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 16, n. 1, p. 27-32, 2014.

GUIMARÃES, I. C. O.; LEÃO, M. H. M. R.; PIMENTA, C. J.; FERREIRA, L. O.; FERREIRA, E. B. Development and description of light functional *dulce de leche* with coffee. **Ciênc. agrotec.**, v. 36, n. 2, p. 195 -203, 2012.

HOUGH, G.; BRATCHELL, N.; MACDOUGALL, D. B. Sensory profiling of dulce de leche, a dairy based confectionary product. **Journal of Sensory Studies**, v. 7, n. 3; p. 157 – 178, 1992. *apud* BELLARDE, F. B. Produção de doce de leite formulado com leite em pó: influência das variáveis de processo no desenvolvimento da cor, textura e propriedades sensoriais. **Tese de doutorado em Tecnologia de Alimentos**. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP. 2001.193p.

INDI. **Dados estatísticos sobre a produção de doce de leite no estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 2015. Disponível em:<<http://www.indi.mg.gov.br/>>. *apud* COLOMBO, M.; PERRONE, I. T.; STEPHANI, R.; SILVA, P. H. F. Avaliação da viscosidade durante a fabricação do doce de leite tradicional adicionado de amido de milho nativo. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, v. 64, n. 370, p. 14-17, 2009.

IKAN, R. **The Maillard reaction: consequences for the chemical and life sciences**. Hebrew University of Jerusalem, Israel: John Wiley & Sons Ltd, 1996. 214p.

JANZOWSKI, C.; GLAAB, V.; SAMIMI, E.; SCHLATTER, J.; EISENBRAND, G. 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 9, p. 801-809, 2000.

KEENEY, M.; BASSETE, R. Detection of intermediate compounds in the early stages of browning reaction in milk products. **Journal of Dairy Science**, v. 42, n. 6, p. 945-961, 1959.

KONKEL, F. E.; OLIVEIRA, S. M. R.; SIMÕES, D. R. S.; DEMIATE, I. M. Avaliação sensorial de doce de leite pastoso com diferentes concentrações de amido. **Ciênc. Technol. Aliment.**, v. 24, n. 2, p. 249-254, 2004.

KUNKEL, H. G.; WALLENIIUS, G. New hemoglobin in normal adult blood. **American Association for the Advancement of Science, Science**, v. 122, p. 288, 1955.

KUROISHI, A. M.; QUEIROZ, M. B.; ALMEIDA, M. M.; QUAST, L. B. Avaliação da cristalização de mel utilizando parâmetros de cor e atividade de água. **Braz. J. Food Technol.**, v. 15, n. 1, p. 84-91, 2012.

LECHNER, R. Analytische Abgrenzung: Pasteurisierte Milch H-Milch, Sterilmilch. **Deutsche Milch**, v. 33, n. 14, p. 489-494, 1982.

LOBATO, V. Tecnologia de fabricação de derivados do leite na propriedade rural. Departamento de Ciencia de Alimentos, UFLA. **Boletim Técnico**. 2007.

MACHADO, L. M. P. **Uso de soro de queijo e amido de milho modificado na qualidade do Doce de leite pastoso. Tese de doutorado em Tecnologia de Alimentos.** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP. 2005. 170p.

MADRONA, G. S.; ZOTARELLI, M. F.; BERGAMASCO, R.; BRANCO, I. G. Estudo do efeito da adição de soro de queijo na qualidade sensorial do doce de leite pastoso. **Ciênc. Technol. Aliment.**, Campinas, v. 29; n. 4; p. 826-833, 2009.

MARTINS, S. I. F. S.; JONGEN, W. M. F.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11; p. 364–373, 2001.

McSWEENEY, P. L. H. e FOX, P. F. **Advanced Dairy Chemistry Lactose, Water, Salts and Minor Constituents.** University College, Cork, Ireland: Springer Science Business Media. 2009.

MENDES, P. N. Otimização do processo de produção de leite condensado empregando pré-concentração por membranas. **Dissertação de Mestrado em**

**Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.** Universidade Federal de Juiz de Fora, MG. 2011. 57p.

Microsoft Office Excel, 2011.

MILAGRES, M. P.; DIAS, G.; MAGALHÃES M. A.; SILVA, M. O.; RAMOS, A. M. Análise físico-química e sensorial de doce de leite produzido sem adição de sacarose. **Rev. Ceres**, v. 57, n. 4, p. 439-445, 2010.

Ministério do Desenvolvimento, Indústria, e Comercio Exterior (MDIC). Sistema ALICEWeb. Disponível em: <<http://aliceweb.mdic.gov.br/>>. Acesso em: 17 de setembro de 2015.

MONARO, E. L. F. Inibição da Formação de produtos da reação de Maillard por extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em sistemas modelo alimento. **Dissertação de mestrado do programa em nutrição em saúde pública.** Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2012. 102p.

MORALES, F. J.; ROMERO, C.; PÉREZ, S. J. An Enhanced Liquid Chromatographic Method For 5-Hydroxymethylfurfural Determination in UHT Milk. **Chromatographia**, v. 33, n. 1-2, p. 45-48, 1992.

MORALES, F. J.; ROMERO, C.; PÉREZ, S. J. Evaluation of heat induced changes in Spanish commercial Milk: hydroxymethylfurfural and available lysine content. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 31; p. 411-418, 1996.

MORALES, F. J.; PÉREZ, S. J. Study of Hydroxymethylfurfural Formation from Acid Degradation of the Amadori Product in Milk-Resembling Systems. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 3885-3890, 1998.

MOREIRA, K. M. M.; COELHO, L. H.; PERINI, C. C.; RAPACCI, M.; KARAM, L. B. Produção de doce de leite com teor reduzido de lactose por  $\beta$ -galactosidase. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, v. 7, n. 4, p. 375-382, 2009.

MOURA, R. L.; SILVA, A. P.; SILVA, F. G.; LIMA, S. P.; SOUZA, P. A. Avaliação da qualidade físico-química em doces cremosos de goiaba comercializados em Limoeiro do Norte-CE. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 3, p. 303 - 306, 2014.

NEVES, L. N. O. Desenvolvimento e aplicação de metodologias analíticas para avaliação de indicadores de tratamento térmico em leite UHT. **Dissertação de mestrado Programa de pós graduação em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados.** Universidade Federal de Juiz de Fora, 2015. 153 f.

NUNES, C. S.; BAPTISTA, A. O. Implicações da reação de Maillard nos alimentos e nos sistemas biológicos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 96, n. 538, p. 53-59, 2001.

NUNES, M. A. M. Determinação da capacidade antioxidante e parâmetros físico-químicos em smoothies: estabilidade ao longo do tempo de armazenamento. **Dissertação de mestrado**. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto. 2012. 95p.

NURSTEN, H. E. **The Maillard reaction chemistry, biochemistry and implications**. The Royal Society of Chemistry, 2005, 214p.

OLIVEIRA, L. L. O índice 5-hidroximetilfurfural na avaliação do escurecimento não-enzimático em queijo mussarela para pizza produzido com diferentes culturas lácticas. **Dissertação de mestrado do Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Universidade Federal de Viçosa, 1999. 89p.

OLIVEIRA, M. E. C.; FERREIRA, A. F.; PODEROSO, J. C. M.; LESSA, A. C. V.; ARAÚJO, E. D.; CARNELOSSI, M. A. G.; RIBEIRO, G. T. Atividade de água ( $A_w$ ) em amostras de pólen apícola desidratado e mel do estado de Sergipe. **Revista da Fapese**, v. 4, n. 2, p. 27-36, 2008.

OLIVEIRA, R. M. E.; OLIVEIRA, A. R. C.; RIBEIRO, L. P.; PEREIRA, R. PINTO, S. M.; ABREU, R. L. Caracterização química de Doces de leite comercializados a granel em lavras/MG. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, v. 65, n. 377, p. 5-8, 2010.

PASSOS, F. R.; FERNANDES, R. V. B.; LIMA, C. F.; PRADO, R. G.; ROCHA, R. A. R.; SILVA, T. M. Avaliação da qualidade de marcas comerciais de doce de leite pastoso comercializados na região do Alto Paranaíba/MG. **Magistra**, v. 25, n. 3-4, p. 251-259, 2013.

PAVLOVIC, S.; GLÓRIA, M. B. A.; SANTOS, R. C. Reações de Maillard durante o processamento de doce de leite. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**. v. 48, n. 287, p. 27-29, 1993.

PEREDA, J.; FERRAGUT, V.; QUEVEDO, J. M.; GUAMIS, B.; TRUJILLO, A. J. Heat damage evaluation in ultra-high pressure homogenized Milk. **Food Hydrocolloids**, v. 23; p.1974–1979, 2009.

PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P. H. F.; COSTA JUNIOR, L. C. G.; OLIVEIRA, L. L. **Físico-química do leite e derivados – Métodos analíticos**. 2ª edição, Juiz de Fora: Editora Templo. 2001. 234p.

PEREIRA, J. P. F.; BOTELHO, J.; ARAÚJO, L. P. P.; BESSA, M. E.; FURTADO, M. A. M.; PINTO, M. A. O. Monitorização da qualidade de produtos lácteos em juiz de fora e região por meio de análises físico-químicas. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**. v. 65, n. 373, p. 25-29, 2010.

PERRONE, I. T. Tecnologia para a fabricação de doce de leite. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, v. 62, n. 354, p. 43-49, 2007.

PERRONE, I. T.; JÚNIOR, L. C. G. C.; MAGALHÃES, F. A. R. Características tecnológicas, de rendimento e cristalização em doce de leite obtido de mistura de leite e soro de fabricação de queijo. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, v. 63, n. 361, p. 3-8, 2008.

PERRONE, I. T.; STEPHANI, R.; NEVES, B. S. **Doce de leite: Aspectos Tecnológicos**. Juiz de Fora: Do autor. 2011a. 186p.

PERRONE, I. T.; RENHE, I. R. T.; PEREIRA, J. P. F.; COLOMBO, M.; COELHO, J. S.; MAGALHÃES, F. A. R. Influência de diferentes espessantes nas características sensoriais do doce de leite para confeitaria. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, v. 66, n. 379, p. 45:50, 2011b.

PERRONE, I. T.; STEPHANI, R.; NEVES, B. S.; SÁ, J. F. O.; CARVALHO, A. F. Atributos tecnológicos de controle para produção do doce de leite. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, v. 67, n. 385, p. 42-51, 2012.

PIERETTI, G. G.; SEOLLIN, V. J.; BENTO, R. S.; MICHKA, J. M.; SANTOS, R. D.; MADRONA, G. S. Doce de leite pastoso elaborado com açúcar mascavo: avaliação sensorial, físico-química e microbiológica. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, v. 68, n. 390, p. 59-64, 2012.

PINTO, A. P. E. F.; WOLFSCHOON-POMBO, A. 5 - hidroximetil furfural no doce de leite. **Revista do ILCT**, v. 39, n. 236, p. 9-11, 1984.

POULSEN, M. W.; HEDEGAARD, R. V.; ANDERSEN, J. M.; COURTEN, B.; BUGEL, S.; NIELSEN, J.; SKIBSTED, L. H., DRAGSTED, L. O. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. **Food and Chemical Toxicology**. v. 60; p. 10–37, 2013.

ROCHA, L. O. F.; PIMENTA, C. J.; REZENDE, D. A. C. S.; OLIVEIRA, R. M. E. Avaliação físico-química e sensorial de doce de leite elaborado com extrato hidrossolúvel de soja e soro de leite sabor café. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 14, n. 3, p. 251-259, 2012.

ROJAS, A.; MORALES, M. A. Advanced glycation and endothelial functions: A link towards vascular complications in diabetes. **Life Sci.**, v. 76, n. 7, p. 715-730, 2004.

ROSATELLA, A. A.; SIMEONOV, S. P.; FRADE, R. F. M.; AFONSO, C. A. M. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) as a building block platform: Biological properties, synthesis and synthetic applications. **Green Chem.**, v.13, p. 754–793, 2011.

RUFIAN, H. J. A.; DELGADO, A. C. Effect of digestive process on Maillard reaction indexes and antioxidant properties of breakfast cereals. **Food Res. Int.** v. 42, p. 394-400, 2009a.

RUFIAN, H. J. A.; DELGADO, A. C. MORALES, F. J. Assessing the Maillard reaction development during the toasting process of common flours employed by the cereal products industry. **Food Chem.** v. 144, p. 93-99, 2009b.

SÁ, J. F. O.; PERRONE, I. T.; MARTINS, M. F.; SILVA, P. H. F. Qualidade microbiológica de doces de leite pastosos. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, v. 67, n. 386, p. 61-66, 2012a.

SÁ, J. F. O. Caracterização microbiológica de doce de leite, leite Condensado e queijo minas padrão por metodologia clássica e Padronização de multiplex para detecção de patógenos por pcr em tempo real. **Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados**. Universidade Federal de Juiz de Fora, Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados. 2012b. 90p.

SAKKAS, L.; MOUTAFI, A.; MOSCHOPOULOU, E. MOATSOU, G. Assessment of heat treatment of various types of Milk. **Food Chemistry**, v. 159, p. 293–301, 2014.

SANTOS, R. A.; MARQUES, R. C. P. Análise microbiológica e físico-química de doce de leite vendido no comércio informal de currais novos/RN. **Holos**, v. 5, 2010.

SANTOS, J. P. V.; GOULART, S. M.; RAMOS, A. M. Influência da adição de inulina nas características físico-químicas e sensoriais do doce de leite cremoso. **rev. inst. latic. “cândido tostes”**, v. 67, n. 388, p. 35-40, 2012.

SIMONYAN, T. A. Hygienic aspect of hydroxymethylfurfural in caramel substances. **Khlebopek. Konditer. Promst.**, v. 3, p. 17-18, 1972. *apud* ULBRICHT, R. J.; NORTHUP, S. J.; THOMAS, J. A. A review of 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. **Fundamental and applied toxicology**, v. 4, p. 843-853, 1984.

SHIBAO, J. Avaliação do teor de Produtos da reação de Maillard (PRM) em cereais matinais e café. **Dissertação de mestrado da Faculdade de Saúde Pública**. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010. 101p.

SHIBAO, J. R., BASTOS, D. H. M. Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 6, p. 895-904, 2011.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. 01. ed. Juiz de Fora: Templo, 2004.124p.

SILVA, S. J. N.; SCHUCH, P. Z.; VAINSTEIN, M. H.; JABLONSKI, A. Determinação do 5-hidroximetilfurfural em méis utilizando cromatografia eletrocínética capilar micelar. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 28; p. 46-50, 2008.

SILVA, M. S. S. Avaliação reológica e sensorial de doce cremoso produzido com soro de leite de cabra, leite de vaca e polpa de umbu. **Dissertação de mestrado do programa da Pró reitoria de Pós Graduação e Pesquisa**. Universidade de Campina Grande, Unidade Acadêmica de engenharia Agrícola. 2011. 62p.

SILVA, F. L.; FERREIRA, H. A. L.; CARVALHO, A. F.; PERRONE, I. T. Efeito do soro de leite no processo de concentração do doce de leite pastoso. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 394, p. 20-24, 2013.

TAN, K. C. B.; CHOW, W. S.; AI, V. H.; METZ, C.; BUCALA, R.; LAM, K. S. Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 25, n. 6, p. 1055-1059, 2002.

TEIXIDÓ, E. S.; PUIGNON, L.; GALCERAN, M. T. Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods by gas chromatography-mass spectrometry. **J.Chromatogr.**, v. 1135; n.1; p. 85-90, 2006.

TIMM, C. D.; CONCEIÇÃO, R. C. S.; COELHO, F. J. O.; ROOS, T. B.; TEJADA, T. S.; QUEVEDO, P. S.; HENTGES, A.; BRASIL, N. D. A. Avaliação microbiológica de doce de leite pastoso. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 3, n. 66, p. 275-277, 2007.

URIBARRI, J.; WOODRUFF, S.; GOODMAN, S.; CAI, W.; CHEN, X.; PYZIK, R.; YONG, A.; STRIKER, G. E.; VLASSARA, H. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. **Journal of the american dietetic association**. v.110; n. 6; p. 911-916, 2010.

VALENTE, G. F. S.; GASPARDI, A. L. A.; OLIVEIRA, L. A. Utilização do experimento de misturas de vértices extremos para avaliação de doce de leite com soro de leite. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 1, p. 01-08, 2015.

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

VIEIRA, L. C., JÚNIOR, J. B. L. **Tecnologias de fabricação dos doces de leite pastoso em tabletes**. Embrapa Amazônia Oriental, 2004. 3p. (Embrapa Amazônia Oriental. Comunicado Técnico 111).

VIEIRA, M. C.; GALLINA, D. A.; CAVICHIOLO, J. R.; GOMES, R. A. R.; FACHINI, C.; ZACARCHENCO, P. B. S. Produção de doce de leite tradicional, *light* e *diet*: estudo comparativo de custos e viabilidade econômica. **Informações Econômicas**, v. 41, n. 10, 2011.

VISTOLI, G.; MADDIS, D.; CIPAK, A.; ZARKOVIC, N.; CARINI, M.; ALDINI, G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. **Informa Healthcare**. v. 47; n. 1; p. 3–27, 2013.

VLASARA, H., URIBARRI, J.; CAI, W.; STRIKER, G. Advanced glycation end product homeostasis. **Acad.Sci.**, v. 1126, p.46-52, 2008.

VORLOVA, L.; BORKOVCOVÁ, I.; KALÁBOVÁ, K. VEČEREK, V. Hidroxymethylfurfural contents in foodstuffs determined by HPLC method. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 45, n. 1; p. 34-38, 2006.

WONG, N. P.; JENNESS, R.; KEENEY, M.; MARTH, E. H. **Fundamentals of dairy chemistry**. 3. ed. New York: Aspen Publishers, Inc., 1999. 766p.

YILDIZ, F. **Advances in food biochemistry**. New York: CRC Press, 2010. 507p.