

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Carolina Neves Cunha

Estudo da adição de suspensão coloidal de celulose vegetal e vitamina C em iogurtes

Juiz de Fora

2023

Carolina Neves Cunha

Estudo da adição de suspensão coloidal de celulose vegetal e vitamina C em iogurtes

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos

Orientador: Prof. Dr. Ítalo Tuler Perrone
Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Stephani

Juiz de Fora
2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Neves Cunha, Carolina.

Estudo da adição de suspensão coloidal de celulose vegetal e vitamina C em iogurtes / Carolina Neves Cunha. -- 2023.

91 f. : il.

Orientador: Ítalo Tuler Perrone

Coorientador: Rodrigo Stephani

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2023.

1. Iogurte. 2. Vitamina C. 3. Cinética. 4. Escurecimento. 5. Fibras de celulose. I. Tuler Perrone, Ítalo, orient. II. Stephani, Rodrigo, coorient. III. Título.

Carolina Neves Cunha

Estudo da adição de suspensão coloidal de celulose vegetal e vitamina C em iogurtes

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
graduação em Ciências
Farmacêuticas
da Universidade
Federal de Juiz de Fora
como requisito parcial
à obtenção do título de
Mestra em Ciências
Farmacêuticas. Área de
concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos
Ativos.

Aprovada em 04 de abril de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ítalo Tuler Perrone - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Rodrigo Stephani - Coorientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Juliana de Carvalho da Costa
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Alan Frederick Wolfschoon-Pombo
Inovaleite

Dr. Antônio Fernandes de Carvalho
Universidade Federal de Viçosa

Juiz de Fora, 06/03/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Italo Tuler Perroni, Professor(a)**, em 04/04/2023, às 17:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antônio Fernandes de Carvalho, Usuário Externo**, em 05/04/2023, às 13:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana de Carvalho da Costa, Professor(a)**, em 05/04/2023, às 14:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alan Frederick Wolfschoon-Pombo, Usuário Externo**, em 05/04/2023, às 16:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Stephani, Professor(a)**, em 05/04/2023, às 16:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador 1172425 e o código CRC 95C97F34.

Dedico este trabalho a minha família, meus colegas de laboratório e aos meus professores que me inspiraram e me deram o suporte necessário para realização dessa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela maravilhosa oportunidade de viver experiências transformadoras e repletas de aprendizado e superação. Aos meus pais, José Dileu Cunha e Ana Leticia Tolentino Neves Cunha por me apoiarem nos diferentes caminhos que já tomei em minha vida. Agradeço aos meus irmãos, Otávio Neves Cunha e Gabriel Tolentino Neves Cunha, por serem meu porto seguro, por estarem sempre dispostos a me ajudar. Ao meu esposo, Rodrigo Lopes, por ser o meu maior incentivador, por acreditar em mim mais do que eu mesma. Agradeço a minha querida filha Alice Cunha Lopes, por ser minha luz, minha vida, o amor mais puro e sincero que conheço. Obrigada, filha, por ter me acompanhado todos estes anos, por ter me feito companhia em diversas tardes e noites de estudo. Que esta nova conquista seja para você um exemplo do quanto o estudo, disciplina e dedicação são fundamentais para se alcançar um sonho.

Agradeço ao professor Luiz Fernando Cappa de Oliveira, que anos atrás me ofereceu a primeira oportunidade de estar em um laboratório, foi graças a essa oportunidade que tenho seguido minha vida trabalhando com o que amo. Agradeço aos meus orientadores Ítalo Tuler Perrone e Rodrigo Stephani por me conduzirem pelo melhor caminho, por confiarem no meu trabalho e me ajudarem a evoluir em minha trajetória científica. Professora Juliana de Carvalho da Costa, faltam-me palavras para descrever o quanto você tem sido fundamental nesta etapa da minha vida, obrigada por me incentivar, por acreditar em mim, por todos os ensinamentos, sou muito grata pela oportunidade de trabalhar e aprender com você. Agradeço de todo meu coração ao professor Alan Wolfschoon-Pombo por todas as horas dedicadas à melhoria do meu trabalho, pelo carinho e paciência, pela grande oportunidade de aprendizado.

Agradeço à família QUIMTEC e a todos os colegas que me receberam e me ajudaram desde o primeiro dia. Sempre encontrei no laboratório um ambiente amigável e acolhedor, formado por pessoas dispostas a ajudar e contribuir com o crescimento dos colegas. Em especial, gostaria de agradecer a Caroline Barroso, por me acompanhar todos os dias no laboratório, em todos os experimentos, por me ajudar em todos os momentos difíceis, por compartilhar seus conhecimentos, por sempre ter uma palavra de incentivo, por ser um exemplo de dedicação e amor ao

trabalho. Obrigada pela amizade, pela sinceridade e espero que nossa parceria científica e pessoal se estenda por longos anos. Ao meu amigo Igor Lima, gostaria de agradecer a disponibilidade, por aceitar os desafios e por estar sempre disposto a me ouvir e compartilhar suas ideias. Agradeço a Maria Esther Sad pelo empenho e dedicação em todos os experimentos que conduzimos. Agradeço a Natália Alves, Monisa Gouvêa, Jaqueline Celestino, Natalia Casas, Mariana Braga, Vitória Souza Lima, Taynan Landin, Júlia Francisquini, Cristian Medina, João Mattos e Julia Matos por toda ajuda, carinho e amizade.

Agradeço a Selva Maria Guimarães Barreto que conheci durante a graduação em farmácia e se tornou uma grande amiga, obrigada pelos conselhos, pelo incentivo e por me orientar em todas as decisões que tenho tomado desde então. Ter a sua opinião sincera e clara me ajuda a caminhar com mais segurança no caminho que escolhi percorrer.

Por fim, gostaria de agradecer às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo financiamento que possibilitou a realização dos projetos, ao Departamento de Química, à Faculdade de Farmácia, ao Programa de Mestrado Acadêmico para Inovação, a empresa parceira Danone pela colaboração e apoio ao meu mestrado. Agradeço também ao Laboratório de Bioprodutos e Nanobiotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena (Universidade de São Paulo), a Faculdade de Araraquara, especialmente ao professor Hernane Barud pela parceria e à Universidade Federal de Juiz de Fora.

Meu sentimento hoje é de vitória, foi preciso vencer muitas batalhas pessoais e profissionais, não foi fácil, mas tudo valeu a pena. Cheguei até aqui apoiada pelo amor da minha família, guiada pelos meus sonhos, acompanhada por queridos amigos e inspirada por grandes professores. Obrigada a todos.

RESUMO

O leite e seus derivados possuem uma variedade de componentes essenciais, constituindo um alimento com alto valor nutritivo, porém são pobres em fibras e vitamina C. O enriquecimento com ingredientes que supram essas deficiências pode contribuir para formação de um alimento saudável e que atenda as demandas específicas do mercado. Para compreender os processos relacionados ao enriquecimento de derivados lácteos com vitamina C, foi apresentado no Capítulo 1 uma revisão sobre estrutura, estabilidade e reações de escurecimento envolvendo esta vitamina. A parte experimental conta com o desenvolvimento de um método analítico para quantificação de ácido ascórbico por cromatografia líquida de alta eficiência por detecção UV-Vis e estudo da cinética de degradação da vitamina C na matriz láctea de interesse (iogurte). O fenômeno do escurecimento foi avaliado através da identificação de marcadores da reação de Maillard e ensaios colorimétricos, com o objetivo de investigar se a potencialização do escurecimento na presença da vitamina C ocorre via reação não enzimática ou pela via degradativa do ácido ascórbico. Os resultados deste capítulo demonstraram perda do conteúdo de vitamina C de aproximadamente 77%, com relação à concentração inicial, após 21 dias de produção dos iogurtes, além da intensificação do escurecimento em função do tratamento térmico aplicado. O Capítulo 2 trouxe uma abordagem inédita para a matriz do iogurte: a adição de suspensão coloidal de celulose vegetal. O trabalho apresentado avaliou parâmetros físico-químicos de iogurtes produzidos com adição das fibras de celulose vegetal e teve como objetivo discutir as propriedades tecno-funcionais atribuídas a presença destas fibras. Conforme o resultado apresentado neste capítulo foi possível identificar vantagens em relação à estabilidade do produto final, atribuídas a presença das fibras de celulose. Esta dissertação, portanto, contempla capítulos que têm como base o estudo de diferentes aplicações em iogurtes, partindo da adição de compostos bioativos como a vitamina C e celulose vegetal. Assim, foi possível unir uma discussão tecnológica de interesse industrial, com respeito a estabilidade da vitamina C e também, uma aplicação inovadora de interesse acadêmico através da utilização de fibras de celulose vegetal produzidas em escala laboratorial.

Palavras-chave: Iogurte. Vitamina C. Cinética. Escurecimento. Fibras de celulose.

ABSTRACT

Milk and its derivatives have a variety of essential components that constitute a food with high nutritional value. However, even though they are rich in essential nutrients, they are reportedly low in fiber and vitamin C. The enrichment with ingredients that supply these deficiencies contributes to the formation of a healthy food and meets specific market requirements. To understand the processes involved in the fortification of dairy products with vitamin C, an overview of the structure and stability of this vitamin is presented in Chapter 1, followed by an experimental section that includes the development of an analytical method for the quantification of ascorbic acid by high performance liquid chromatography with UV-Vis detection and a kinetic study of this vitamin in yogurt as the dairy matrix of interest. The phenomenon of browning is evaluated by identifying markers of the Maillard reaction and colorimetric assays, the objective was to determine whether the potentiation of browning in the presence of vitamin C occurs via a non-enzymatic reaction or via the ascorbic acid degradation pathway. A loss of vitamin C content of approximately 77% was observed after 21 days of production, in addition to the potentiation of browning as a function of the heat treatment applied. Chapter 2 presents a new approach to the yogurt matrix: the addition of colloidal suspension of vegetable cellulose. The presented work evaluates the physicochemical parameters of yogurts prepared with the addition of cellulose fibers and aims to discuss the techno-functional properties due to the presence of different types of vegetable cellulose. Therefore, it is possible to observe advantages in terms of stability of the final product due to the presence of cellulose fibers. This project combines a technological discussion of industrial interest regarding the stability of vitamin C and an innovative application of academic interest using laboratory-scale plant cellulose fibers.

Keywords: Yogurt. Vitamin C. Kinetics. Browning. Cellulose fibers.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teor de vitamina C em alguns alimentos de fonte vegetal e animal.	19
Tabela 2 - Trabalhos que discutem a relação entre processamento e estabilidade da vitamina C.	24
Tabela 3 - Conteúdo de furfurais: HMF (5-hidroximetilfurfural); F (2-furaldeído), FMC (2-furil-metilcetona); MF (5-metil-2-furaldeído) reportados em produtos lácteos.	31
Tabela 4 - Formulações dos iogurtes e tratamento térmico aplicado. Sendo T1 e T3 adicionados de vitamina C e T2 e T4 os respectivos controles.	32
Tabela 5 - Modo de eluição gradiente aplicado para determinação dos marcadores HMF, F, FMC e MF	39
Tabela 6 - Coeficientes de regressão linear da curva analítica para vitamina C.	42
Tabela 7 - Resultados do ensaio de precisão pelo método da repetibilidade.	44
Tabela 8 - Resultados do ensaio de precisão pelo método da precisão intermediária.	44
Tabela 9 - Resultados do ensaio de exatidão pelo método da recuperação para vitamina C	45
Tabela 10 - Resultados do ensaio de exatidão pelo método da recuperação para os marcadores da RM.	47
Tabela 11 - Desenvolvimento do pH e acidez titulável nos iogurtes durante os dias de estocagem.	48
Tabela 12 - Marcadores da reação de Maillard e Vitamina C. Sendo T1 iogurte com 0,012% vitamina C; T2 iogurte controle, ambos tratados 90 °C por 5 minutos; T3 iogurte com 0,012% vitamina C; T4 iogurte controle, ambos tratados 90 °C por 2h e 43 minutos.	50
Tabela 13 - Porcentagens de perda de conteúdo de vitamina C com relação à análise inicial AT (antes do tratamento térmico).	52
Tabela 14 - Parâmetros de cor avaliados durante o shelf life. T1 iogurte com 0,012% vitamina C; T2 iogurte controle, ambos tratados 90 °C por 5 minutos; T3 iogurte com 0,012% vitamina C; T4 iogurte controle, ambos tratados a 90 °C por 2h e 43 minutos.	55

Tabela 15 - Tabela com valores de probabilidade (>F) da análise de variância com múltiplos fatores independentes (ANOVA) para os parâmetros de colorimetria e BI.	57
Tabela 16 - Dados obtidos através da construção do modelo matemático para degradação da vitamina C em iogurtes.....	58
Tabela 17 - Comparação entre a determinação do teor de vitamina C obtido de maneira de experimental com o valor teórico obtido pelo modelo matemático.....	59
Tabela 18 - Conteúdo de água e pH das suspensões coloidais de celulose vegetal.	64
Tabela 19 - Formulação dos iogurtes controle e adicionados as CNFs.	65
Tabela 20 - Tempo final de fermentação e variação do pH entre início e fim da fermentação (Δ pH).	70
Tabela 21 - Variação dos valores de pH e acidez titulável nos iogurtes durante os dias de estocagem.....	71
Tabela 22 - Evolução do tamanho de partícula nos iogurtes após 1,7,15,30 e 45 dias de produção.	75

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Isômeros do ácido ascórbico com atividade vitamínica (a) e reação de oxidação do ácido L-ascórbico (AA) a ácido deidroascórbico (DHA), seguido da hidrólise do AA (b)..	20
Figura 2 - Fatores que podem afetar a estabilidade da vitamina C presente em alimentos.	23
Figura 3 - Rota de formação dos furfurais a partir da degradação de compostos Amadori, sendo HMF (5-hidroximetilfurfural); F (2-furaldeído), FMC (2-furil-metilcetona); MF (5-metil-2-furaldeído).	30
Esquema 1 - Representação da produção de iogurte.	33
Figura 4 - Cromatograma do branco mostrando a ausência de interferentes (A) e cromatograma da solução padrão de vitamina C (B).	42
Gráfico 1 - Representação gráfica das respostas em função da concentração do analito.	43
Gráfico 2 - Curvas analíticas obtidas para os marcadores da reação de Maillard (HMF,F,FMC e MF).	46
Figura 5 - Cromatograma da solução padrão contendo HMF, F, FMC e MF.	46
Gráfico 3 - Representação gráfica das variações de conteúdo de HMF e vitamina C durante o <i>shelf life</i> . Sendo T1 iogurte com 0,012% vitamina C; T2 iogurte controle, ambos tratados 90 °C por 5 minutos; T3 iogurte com 0,012% vitamina C; T4 iogurte controle, ambos tratados 90 °C por 2h e 43 minutos.	52
Gráfico 4 - Representação gráfica do comportamento pontual dos parâmetros de browning index e croma durante o <i>shelf life</i> para T1 iogurte com 0,012% vitamina C;T2 iogurte controle, ambos tratados 90 °C por 5 minutos; T3 iogurte com 0,012% vitamina C; T4 iogurte controle, ambos tratados termicamente a 90 °C por 2h e 43 minutos.	56
Gráfico 5 - Gráfico de Ln (C/Co) x Tempo de Estocagem para os tratamentos T1 iogurte com 0,012% vitamina C tratado a 90 °C por 5 minutos e T3 iogurte com 0,012% vitamina C tratado a 90 °C por 2h e 43 minutos.	58
Gráfico 6 - Efeito do tratamento térmico na degradação da vitamina C. Em (A) curva de degradação para T1 e T3 isoladamente e em (B) curva de degradação dos dados combinados de T1+T3.	60

Figura 6 - Imagens das fibras: Sendo em (A) suspensão coloidal de celulose vegetal microfibrilada - CMF, (B) suspensão coloidal de celulose vegetal nanofibrilada – CNF, (C) suspensão coloidal de celulose vegetal nanofibrilada pós-tratada - Enzy-CNF.	64
Fluxograma 1 - Fluxograma da produção de iogurte.....	66
Gráfico 7 - Acidificação durante a fermentação do iogurte controle (T1), iogurte adicionado de CMF (T2), iogurte adicionado CNF (T3) e iogurte adicionado de Enzy-CNF (T4).	69
Gráfico 8 - Desenvolvimento do pH e acidez titulável nos iogurtes durante os dias de estocagem, sendo T1 iogurte controle, T2 iogurte adicionado CMF, T3 iogurte adicionado de CNF e T4 iogurte adicionado de Enzy-CNF.	72
Gráfico 9 - Comportamento da sinérese nos iogurtes durante os dias de estocagem, sendo T1 iogurte controle, T2 iogurte adicionado CMF, T3 iogurte adicionado de CNF e T4 iogurte adicionado de Enzy-CNF.	73
Gráfico 10 - Resultados de viscosidade aparente para os iogurtes durante os dias de estocagem, sendo T1 iogurte controle, T2 iogurte adicionado CMF, T3 iogurte adicionado de CNF e T4 iogurte adicionado de Enzy-CNF.	74
Figura 7 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (magnificação 500 x) dos seguintes produtos liofilizados: iogurte controle (T1), iogurte adicionado CMF (T2), iogurte adicionado de CNF (T3) e iogurte adicionado de Enzy-CNF (T4), sendo estes do segundo lote de fabricação.	77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVO GERAL	17
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
2.1.1 Objetivos específicos para o capítulo 1	17
2.1.2 Objetivos específicos para o capítulo 2.....	17
3 ESTUDO DA ADIÇÃO DE VITAMINA C EM IOGURTES: ESTABILIDADE, REAÇÕES DE ESCURECIMENTO E CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO	18
3.1 REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1.1 Aspectos estruturais da vitamina C	19
3.1.2 Atividade vitamínica e potencial terapêutico	21
3.1.3 Estabilidade, quantificação e vias de adição de vitamina C em alimentos.....	22
3.1.4 Alimentos ricos em vitamina C	26
3.1.5 Reações de escurecimento associadas a presença de vitamina C	27
3.1.6 Reações de escurecimento via Maillard.....	28
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.2.1 Formulação e produção dos iogurtes adicionados de vitamina C	32
3.2.2 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação do conteúdo de vitamina C em iogurtes por cromatografia líquida de alta eficiência	34
3.2.3 Modelo matemático para cinética de degradação da vitamina C em iogurtes	37
3.2.4 Determinação dos marcadores da reação de Maillard, HMF (5-hidroximetilfurfural); F (2-furaldeído), FMC (2-furil-metilcetona); MF (5-metil-2-furaldeído) por cromatografia líquida de alta eficiência.....	38
3.2.5 Parâmetros de cor - CIE-LAB.....	40
3.2.6 Determinação de pH e acidez titulável em iogurtes	41
3.2.7 Análise estatística	41
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	41
3.4.1 Desenvolvimento e validação metodologia para quantificação de vitamina C em iogurtes.....	41
3.4.2 Verificação da metodologia analítica para quantificação dos marcadores da reação de Maillard em iogurtes	45
3.4.3 Variações do pH e acidez titulável nos iogurtes produzidos	47
3.4.4 Determinação de conteúdo de vitamina C e marcadores da reação de Maillard, HMF (5-hidroximetilfurfural); F (2-furaldeído), FMC (2-furil-metilcetona); MF (5-metil-2-furaldeído) por cromatografia líquida de alta eficiência, detector UV-Vis (PDA – <i>Photodiode Array Detector</i>)	49
3.4.5 Avaliação dos parâmetros de cor - CIE-LAB.....	53

3.4.6 Cinética de degradação da vitamina C em iogurtes	57
3.5 CONSIDERAÇÕES	60
4. INFLUÊNCIA DE CELULOSE MICRO E NANOFIBRILADA NA PRODUÇÃO E ESTOCAGEM DE IOGURTES.....	62
4.1 REFERENCIAL TEÓRICO	62
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	63
4.2.1 Obtenção das nanofibras e microfibras de celulose vegetal	63
4.2.2 Formulação dos iogurtes adicionados de suspensão coloidal de celulose vegetal.....	63
4.2.3 Produção dos iogurtes adicionados de suspensão coloidal de celulose vegetal.....	65
4.2.4 Curva de Fermentação.....	67
4.2.5 Determinação do pH e acidez titulável em iogurtes	67
4.2.6 Sinérese	67
4.2.7 Viscosidade Aparente e Consistência	67
4.2.8 Distribuição do tamanho de partícula	68
4.2.9 Microscopia eletrônica de varredura	68
4.2.10 Análises estatísticas.....	68
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	68
4.3.1 Curva de fermentação dos iogurtes produzidos	69
4.3.2 Avaliação das variações do pH e acidez titulável nos iogurtes	70
4.3.3 Determinação do efeito de sinérese nos iogurtes	72
4.3.4 Avaliação da viscosidade aparente e consistência	73
4.3.5 Evolução da distribuição do tamanho de partícula	74
4.3.6 Microestrutura dos iogurtes.....	76
4.4 CONSIDERAÇÕES	77
5 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

Entende-se por iogurte um produto lácteo fermentado a partir de culturas iniciadoras de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Segundo a instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007, outras bactérias ácido lácticas podem ser utilizadas, de forma complementar, para contribuírem com as características do produto final. Os produtos lácteos são as principais fontes de probióticos comercializadas, a capacidade tamponante do leite mantém a viabilidade dos microrganismos durante a fermentação e refrigeração. Estão incluídos nestas condições bebidas como os leite fermentados, sobremesas lácteas contendo fermentados e o iogurte (MEYBODI; MORTAZAVIAN; ARAB; NEMATOLLAHI, 2020).

O consumo de alimentos fermentados cresce em função da sua relação com as condições de saúde, por exemplo, melhorias cardiometabólicas. O iogurte, em especial, tem sido associado à diminuição do risco de diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e síndromes metabólicas (CIFELLI; AGARWAL; FULGONI, 2020). É um produto que possui alta aceitabilidade pelos consumidores em função dos benefícios associados às bactérias ácido lácticas e probióticos (DURMUS; CAPANOGLU; KILIC-AKYILMAZ, 2021).

Assim como o leite, o iogurte possui uma variedade de componentes essenciais, constituindo um alimento com alto valor nutritivo. Possuem quantidades expressivas de vitaminas como riboflavina, tiamina e vitaminas lipossolúveis como A, D e E, porém, são pobres em fibras e vitamina C. O enriquecimento com ingredientes que supram essas deficiências contribui para formação de um alimento saudável e atende às demandas específicas do mercado. Produtos enriquecidos com vitaminas têm ganhado espaço no mercado de lácteos com a finalidade de atender às necessidades nutricionais e manutenção da saúde (BRASIL DAIRY TRENDS, 2020).

A instrução normativa nº75 de outubro de 2020 apresenta em seu Anexo II os valores diários de referência (VDR) para fins de rotulagem nutricional dos alimentos em geral, sendo recomendado a ingestão diária de 100 mg de vitamina C e 25 g de fibras alimentares (BRASIL, 2020). O Conselho Federal de Farmácia identificou um aumento de 180% no consumo de vitamina C no período de janeiro a março de 2020 (CFF, 2020), reflexo do período pandêmico da Covid-19 e da preocupação dos consumidores com a saúde. A fim de auxiliar na prevenção do aparecimento de

doenças crônicas relacionadas à dieta, a Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO), agência especializada das Nações Unidas que lidera os esforços internacionais para erradicar a fome no mundo, recomenda o consumo de pelo menos 25 g/dia de fibras na dieta alimentar (OMS, 2023).

Para compreender os processos envolvidos no enriquecimento de derivados lácteos com os compostos bioativos, vitamina C e fibras de celulose, trouxemos neste trabalho duas abordagens. No primeiro capítulo foi realizado um estudo da cinética de degradação da vitamina C em iogurtes e a investigação da sua participação em reações de escurecimento. No segundo capítulo, no qual foi abordado a produção de iogurtes adicionados de fibras de celulose, foram avaliados três tipos fibras: microfibrilada, nanofibrilada e nanofibrilada tratada de forma enzimática. A discussão referiu-se à capacidade destas fibras em modular as características físico-químicas durante a produção e estocagem dos iogurtes. Com estas duas vertentes trabalhamos com o iogurte, derivado de um produto natural, o leite, adicionando a ele dois compostos bioativos que lhe são deficientes, vitamina C e fibras.

2 OBJETIVO GERAL

Produzir dois diferentes produtos, iogurte adicionado de vitamina C e o iogurte adicionado de suspensão coloidal de celulose vegetal e avaliar a estabilidade e as alterações físico-químicas do iogurte adicionado de dois compostos bioativos que lhe são deficientes.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Com base no objetivo geral, são apresentados na seção seguinte os objetivos específicos de cada capítulo.

2.1.1 Objetivos específicos para o capítulo 1

- a) Produzir iogurtes em escala laboratorial adicionados de vitamina C;
- b) Desenvolver e validar metodologia analítica para quantificar o conteúdo de vitamina C por cromatografia líquida de alta eficiência, detector UV-Vis (PDA – *Photodiode Array Detector*);
- c) Estudar a cinética de degradação da vitamina C nos iogurtes produzidos;
- d) Estudar a relação entre a degradação da vitamina C e reações de escurecimento;
- e) Quantificação simultânea dos marcadores da reação de Maillard, HMF (5-hidroxiacetilfurfural); F (2-furaldeído), FMC (2-furil-metilcetona); MF (5-metil-2-furaldeído) em iogurtes, por cromatografia líquida de alta eficiência, detector UV-Vis (PDA – *Photodiode Array Detector*).

2.1.2 Objetivos específicos para o capítulo 2

- a) Produzir em escala laboratorial iogurtes adicionados de três diferentes fibras de celulose vegetal;
- b) Avaliar as características físico-químicas dos iogurtes adicionados de suspensão coloidal de celulose vegetal durante a produção e estocagem.

3 ESTUDO DA ADIÇÃO DE VITAMINA C EM IOGURTES: ESTABILIDADE, REAÇÕES DE ESCURECIMENTO E CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO

Para compreender os processos envolvidos na adição de vitamina C foi realizado um estudo da cinética de degradação da vitamina C e a investigação da sua participação em reações de escurecimento, apresentado neste primeiro capítulo.

3.1 REFERENCIAL TEÓRICO

As vitaminas são compostos fundamentais para a manutenção das funções essenciais do corpo e sua homeostase (RANI; SHARMA; SINGH; GREWAL, 2019). O termo “vitamina” foi utilizado pela primeira vez em 1911 pelo bioquímico polonês Casimir Funk, visando se referir de maneira genérica às substâncias alimentares indispensáveis à saúde. O bioquímico estudava a niacinamida e criou a expressão “amin vital” que deu origem a palavra vitamina. A correlação entre a ingestão de compostos cítricos e a prevenção do escorbuto, doença que acometia marinheiros a bordo durante vários dias, já havia sido feita pelo médico escocês James Lind em 1747. Sendo assim, em 1911 Drummond denominou essa característica que alguns alimentos apresentavam como fator antiescorbútico “C”. Em 1928 o fator antiescorbútico foi isolado pelo cientista húngaro Albert von Szent-Gyorgyi e passou a ser denominado como vitamina C (MANELA-AZULAY; LACERDA; PEREZ; FILGUEIRA *et al.*, 2003).

Vitamina C é um termo geral aplicado aos derivados do ácido ascórbico que exibem atividade biológica, atuando como antioxidante hidrofílico e sendo importante para a prevenção de processos degenerativos causados pelo estresse oxidativo (BARROS; NUNES; GONÇALVES; BENNETT *et al.*, 2011). Os valores de referência para ingestão diária de vitamina C são de 100 mg para adultos, com variações individuais conforme idade, gestação e lactação (BRASIL, 2020).

É um composto obtido principalmente a partir de frutas cítricas e vegetais folhosos, estando presente no leite de mamíferos, como no leite de cabra, vaca e humano (RANI; SHARMA; SINGH; GREWAL, 2019). Os alimentos possuem concentrações muito distintas de vitamina C, a exemplo de frutas como acerola e camu-camu que possuem altos teores de ácido ascórbico, podendo apresentar cerca de 1593,20 mg e 6690,40 mg em 100 g da fruta, respectivamente (GARCIA; BORGES;

VANIN; CARVALHO, 2020). Em contrapartida, o leite, apesar do seu valor nutricional, não apresenta concentrações significativas deste nutriente. O leite de vaca pode ter de 0,02 a 0,94 mg de ácido ascórbico em porções de 100 g (BOUKRIA; HADRAMI; SAMEEN; SAHAR *et al.*, 2020). Na Tabela 1 são apresentados os teores de vitamina C em algumas fontes vegetais e animais.

Tabela 1 - Teor de vitamina C em alguns alimentos de fonte vegetal e animal.

Fontes vegetais			Fontes animais		
Frutas	Teor (mg/100 g)	Hortaliças	Teor (mg/100 g)	Leite	Teor (mg/100g)
Goiaba ^a	302	Brócolis ^a	109	Camelo ^d	2,3 – 18,4
Groselha ^c	181	Pimentão vermelho ^b	140	Vaca ^d	0,02 – 0,94
Kiwi ^b	90	Salsinha ^c	133	Cabra ^d	1,29 – 2,00
Limão ^a	50	Cebolinha ^b	58	Ovelha ^d	4,16 – 4,30
Laranja ^a	47	Ervilhas verdes ^c	40	Bufala ^d	2,5
Melão ^b	40	Chicória verde ^c	24	Burra ^e	5,7
Amora ^c	21	Rúcula ^c	15	Humano ^e	6

Fonte: Adaptada de: ^a(FIORUCCI; FLORA; SOARES; CAVALHEIRO, 2002); ^b(VILLAGRÁN; MUÑOZ; DÍAZ; TRONCOSO *et al.*, 2019), ^c(MIESZCZAKOWSKA-FRAC; CELEJEWSKA; PLOCHARSKI, 2021), ^d(BOUKRIA; HADRAMI; SAMEEN; SAHAR *et al.*, 2020) e ^e(VINCENZETTI; SANTINI; POLZONETTI; PUCCIARELLI *et al.*, 2021).

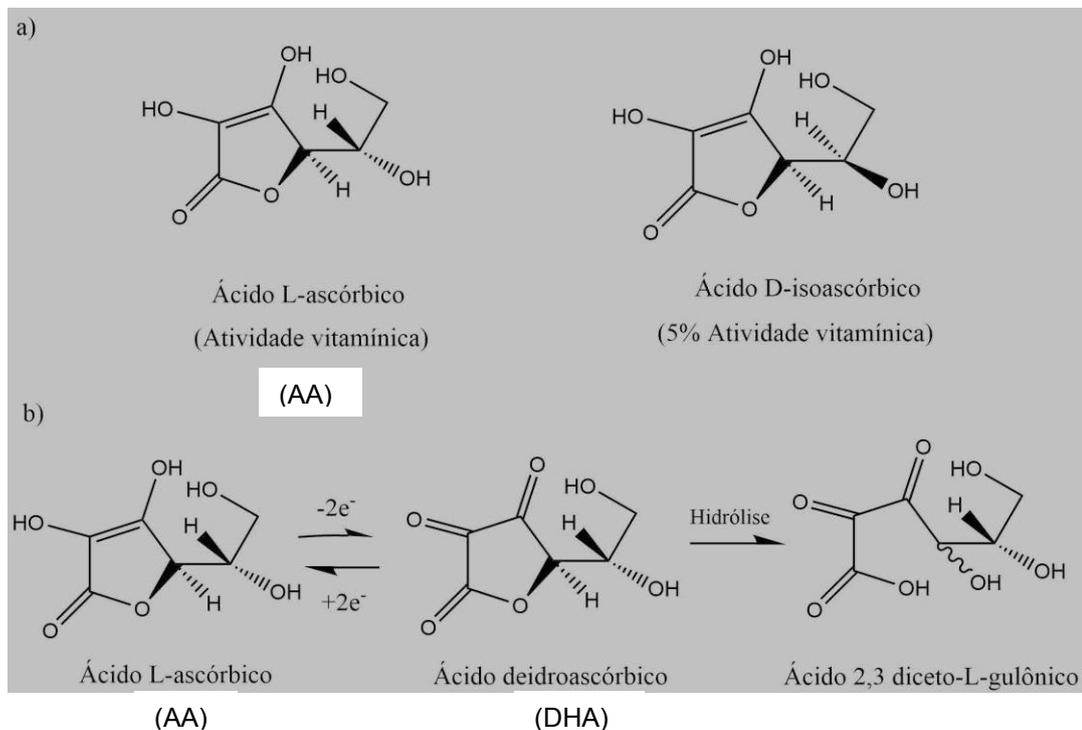
A fim de atender a demandas do mercado com relação à melhorias na saúde e imunidade, os fabricantes de lácteos têm investido em produtos com alto teor de vitamina C (ITAL, 2020). Porém, a vitamina C é um dos componentes mais afetados durante o prazo de validade de frutas, vegetais e outros alimentos. Além disso, a sua determinação em alimentos é crítica em função da dificuldade de manter sua estabilidade durante o processamento e ao longo do prazo de validade do produto (ROSA; GODOY; NETO; CAMPOS *et al.*, 2007). A degradação do ácido ascórbico ou vitamina C, pode ocorrer pela presença de luz, oxigênio e variações de temperatura, sendo que produtos que sofrem aquecimento em etapas de produção podem estar suscetíveis a reações de escurecimento, potencializada pela adição de vitamina C (BOUQUELET, 2016).

3.1.1 Aspectos estruturais da vitamina C

A vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico, possui dois centros quirais, formando dois pares de estereoisômeros, que são: os ácidos L-ascórbico (AA)

e D-ascórbico e os ácidos D-isoascórbico e L-isoascórbico, representadas na Figura 1a. Destes ácidos, apenas os AA e o D-isoascórbico possuem atividade vitamínica, sendo que o último possui apenas 5% de atividade. (ROSA; GODOY; NETO; CAMPOS *et al.*, 2007). O AA participa de uma reação de caráter reversível, sendo oxidado a ácido deidroascórbico (DHA), este possui atividade vitamínica considerada semelhante ao AA, pois no organismo pode ser reduzido a ácido L-ascórbico através da ação de enzimas (MANELA-AZULAY; LACERDA; PEREZ; FILGUEIRA *et al.*, 2003). Assim, o conteúdo total de vitamina C é representado pelo ácido L-ascórbico na sua forma reduzida (AA) e oxidada (DHA) (CHEBROLU; JAYAPRAKASHA; YOO; JIFON *et al.*, 2012). O DHA pode participar da reação reversível representada na Figura 1b, mas também pode ser hidrolisado em ácido 2,3 diceto-L-gulônico (DGA), sendo que, condições de pH neutro e temperatura à 37°C favorecem esta reação de hidrólise, resultando na abertura irreversível do anel da lactona e perda de função vitamínica (FIGUEROA-MÉNDEZ; RIVAS-ARANCIBIA, 2015).

Figura 1 - Isômeros do ácido ascórbico com atividade vitamínica (a) e reação de oxidação do ácido L-ascórbico (AA) a ácido deidroascórbico (DHA), seguido da hidrólise do AA (b).



Fonte: Adaptada de (ROSA; GODOY; NETO; CAMPOS *et al.*, 2007).

Njus *et al.* (2020) descrevem em seu trabalho a reação de oxidação do ácido ascórbico, segundo os autores, o deidroascorbato possivelmente existe como um hemiacetal bicíclico e não como a estrutura de tricarbonil. A estrutura tricarbonil, seria o produto esperado quando dois átomos de hidrogênio são retirados do ácido ascórbico em uma oxidação típica, mas a vitamina C possui um comportamento antioxidante atípico. Este radical seria energeticamente desfavorecido e, em consequência disto, a oxidação do ácido ascórbico ocorreria por mecanismos que evitem a passagem por este radical desfavorável energeticamente.

3.1.2 Atividade vitamínica e potencial terapêutico

A reversibilidade entre as estruturas químicas AA e DHA (Figura 1b) é a propriedade química mais importante da vitamina C, sendo este o fundamento da sua atividade fisiológica no organismo (ROSA; GODOY; NETO; CAMPOS *et al.*, 2007). Esta capacidade funciona como um sistema oxirredutor capaz de transportar o oxigênio dentro das células, permitindo sua participação em processos celulares de oxirredução, o que lhe confere um papel essencial como antioxidante (RANI; SHARMA; SINGH; GREWAL, 2019). A sua ação antioxidante pode ser representada por duas formas de atuação, a primeira como um agente redutor, coexistindo como ácido ascórbico totalmente reduzido ou ânion ascorbato. Já a sua segunda forma se caracteriza pelo fato do monodeidroascorbato também ser uma estrutura capaz de reagir com outros radicais livres, diminuindo as reações em cadeia destes radicais (NJUS; KELLEY; TU; SCHLEGEL, 2020).

A vitamina C atua como coenzima em reações de hidroxilação, sendo fundamental para a formação das fibras colágenas existentes em praticamente todos os tecidos do corpo humano. Dessa forma, é necessária para a manutenção normal do tecido conjuntivo, assim como para recompor tecidos danificados em função da estimulação da síntese do colágeno (MANELA-AZULAY; LACERDA; PEREZ; FILGUEIRA *et al.*, 2003). A deficiência de vitamina C resulta no escorbuto, uma doença caracterizada por gengivas doloridas e esponjosas, fragilidade dos vasos sanguíneos, edemas nas articulações e anemia. Os sintomas podem ser justificados

pela alteração na via de hidroxilação do colágeno, resultando em um tecido conjuntivo defeituoso (LINSTER; SCHAFTINGEN, 2007).

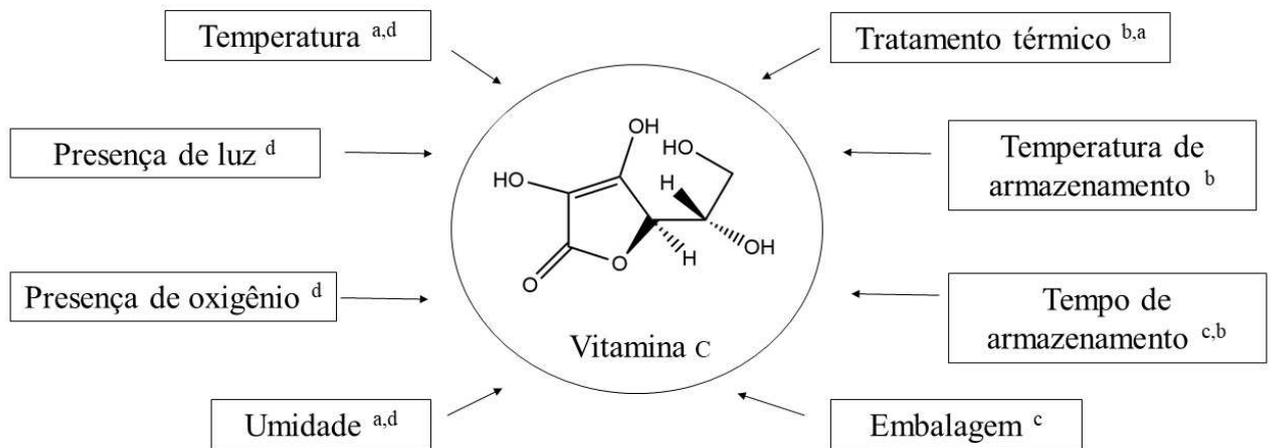
Como apontado anteriormente, boa parte do papel desempenhado pela vitamina C no organismo está relacionada com sua ação antioxidante, demonstrando importante atuação no sistema imune e prevenção de doenças cardiovasculares, bem como, apresentando ações imunoestimulantes, anti-inflamatórias e efeito antimutagênico (JESUS; ROCHA; CAMPOS; SANTANA *et al.*, 2021).

A relevância do uso de ácido ascórbico para melhora de resfriados começou a ser discutida por Pauling em 1970, estudos realizados mostraram que a ingestão de 1000 mg de vitamina C poderia reduzir em até 45% a incidências de resfriados (RANI; SHARMA; SINGH; GREWAL, 2019). Outros estudos demonstram que a ingestão de doses altas de vitamina C evita o desenvolvimento de formas graves de resfriados (FIORUCCI; FLORA; SOARES; CAVALHEIRO, 2002). A vitamina C possivelmente desempenha um importante papel na melhora da imunidade inata e aumenta a resposta imune celular, melhorando a integridade da barreira epitelial e contribuindo para o sistema de defesa do corpo contra patógenos externos (ABOBAKER; ALZWI; ALRAIED, 2020). Estudos recentes também consideram a administração de vitamina C em pacientes acometidos pela COVID-19, com a intenção de que ela possa atenuar uma resposta excessiva do sistema imune (BAE; KIM, 2020).

3.1.3 Estabilidade, quantificação e vias de adição de vitamina C em alimentos

Com relação à estabilidade, temos que a vitamina C é um dos componentes mais afetados durante o prazo de validade de frutas, vegetais e outros alimentos, sendo por isso utilizado como indicativo da qualidade de alimentos (CARNEIRO; AGUIAR; SILVA; RICHTER *et al.*, 2020). Na Figura 2 são apresentados diversos fatores que podem afetar a estabilidade da vitamina C nos alimentos, entre eles os processos de refrigeração, tipo de processamento térmico e armazenamento em embalagens transparentes (BERTIN; SCHULZ; AMANTE, 2016).

Figura 2 - Fatores que podem afetar a estabilidade da vitamina C presente em alimentos.



Fonte: Elaborada pela autora (2023). ^a(BERTIN; SCHULZ; AMANTE, 2016), ^b(RAHMAN; AL-RIZEIQI; GUIZANI; AL-RUZAIQI *et al.*, 2015), ^c(GLIGUEM; BIRLOUEZ-ARAGON, 2005) ^d(YAN; DAVACHI; RAVANFAR; DADMOHAMMADI *et al.*, 2021).

Aspectos como esterilização, embalagem e armazenamento podem afetar a estabilidade da vitamina C em produtos lácteos como, por exemplo, em leites fortificados. Sendo esta vitamina um composto suscetível a oxidação, a qualidade da embalagem e sua permeabilidade em relação ao oxigênio é de grande relevância para manutenção das características do produto (GLIGUEM; BIRLOUEZ-ARAGON, 2005). A pressão de homogeneização também pode interferir na estabilidade da vitamina C no leite. Sendo que, uma melhor preservação pôde ser observada para as pressões de homogeneização acima de 100 MPa em comparação com amostras não pasteurizadas e homogeneizadas a 40 MPa. Os autores também relataram que houve uma diminuição do conteúdo da vitamina C imediatamente após o processamento térmico e durante o armazenamento dos produtos (SHARABI; OKUN; SHPIGELMAN, 2018). Na Tabela 2 estão representados alguns estudos que relacionam a estabilidade da vitamina C mediante diversos tipos de processamento.

Tabela 2 - Trabalhos que discutem a relação entre processamento e estabilidade da vitamina C

Referência	Matriz	Processamento	Efeito
(CÁNOVAS; GEA-BOTELL; BORRÁS; MARTÍ <i>et al.</i> , 2020)	Alimentos para bebês à base de fruta	Armazenamento em diversas temperaturas.	A retenção de AA foi maior em alimentos armazenados sob refrigeração
(ZNA MIROWSKA; SZAJNAR; PAWLOS, 2021)	Leite fermentado enriquecido com vitamina C	Fermentação e estabilidade durante o armazenamento.	Durante o armazenamento a redução do teor de vitamina C foi de 5 a 8%
(MUSTAPA; AHMAD, 2019)	Mamão (<i>Carica papaya</i> L)	Métodos de secagem: secagem ao sol (SD), estufa (OD), liofilização (FD) e ultracongelção (DF).	Os processos de secagem tiveram impacto na retenção de vitamina C, o mais favorável foi a FD, menos favorável foi a SD
(RAHMAN; AL-RIZEIQI; GUIZANI; AL-RUZAIQI <i>et al.</i> , 2015)	Pimentão fresco e liofilizado	Armazenamento em diferentes temperaturas.	Diminuição gradual da vitamina C foi observada nas diferentes temperaturas testadas
(GLIGUEM; BIRLOUEZ-ARAGON, 2005)	Leites fortificados	Esterilização, embalagem e estocagem.	A degradação da vitamina C foi influenciada pelo tipo de embalagem
(YAN; DAVACHI; RAVANFAR; DADMOHAMMADI <i>et al.</i> , 2021)	Gomas de vitamina.	Microencapsulação de vitamina C dentro de gel de caseína.	A vitamina C encapsulada na goma apresentou melhor retenção de conteúdo e cor em diferentes temperaturas, umidade e condições de luz
(GARCIA; BORGES; VANIN; CARVALHO, 2020)	Pós de acerola e camu-camu	Secagem por <i>spray dryer</i> , avaliando a estabilidade durante o armazenamento.	A vitamina C se apresentou estável nos pós produzidos por secagem por pulverização
(SARMENTO; PINTO; CRAVEIRO; DE FREITAS <i>et al.</i> , 2019)	logurte enriquecido com camu-camu	Armazenamento por 28 dias sob refrigeração.	Relatado perda de aproximadamente 30% do conteúdo de AA durante o armazenamento
(ZHONG; TAN; LANGRISH, 2019)	Isolado de proteína de soro de leite (WPI) e ácido ascórbico	Armazenamento e processamento.	Verificou-se que a temperatura de armazenamento afeta significativamente as reações de Maillard entre WPI e ácido ascórbico

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A estratégia analítica para determinação do conteúdo total de vitamina C, ocorre através da redução do DHA ao AA por meio de um agente redutor. Para isso, a extração do ácido ascórbico de uma amostra é realizada em pH baixo, a fim de garantir a sua estabilidade, sendo recomendado o uso do agente redutor tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP). A análise da forma reduzida de vitamina C é frequentemente realizada utilizando-se da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica (MAZUREK; WŁODARCZYK-STASIAK, 2021). Para análise do ácido ascórbico na forma de insumo farmacêutico, o método oficial indicado pela Farmacopeia Brasileira é a titulação utilizando-se solução volumétrica de iodo (ANVISA, 2019).

A vitamina C pode ser adicionada a matriz alimentar também em sua forma de sais de ascorbato, em geral, ascorbato de sódio ou cálcio, ou na forma lipofílica na forma de palmitato de ascorbil (HIATT; FERRUZZI; TAYLOR; MAUER, 2011). De acordo com Ismail & Mauer (2019), a principal via de degradação do ácido ascórbico é a via oxidativa, na qual o íon ascorbato é oxidado no radical ascorbil e, posteriormente, oxidado a ácido deidroascórbico. Em termos de estrutura química, o ascorbato de sódio se encontra na primeira etapa da via de degradação oxidativa do ácido ascórbico, sendo que a energia calculada para remover o elétron do ascorbato de sódio e do ácido ascórbico seria de 30 kcal/mol e 188 kcal/mol, respectivamente. Portanto, há menor obstáculo energético para degradação do ascorbato de sódio em comparação com o ácido ascórbico. Com relação à solubilidade, o ascorbato de sódio é mais solúvel que o ácido ascórbico, 3,13 e 1,89 mol/kg a 25 °C, respectivamente. Assim, na presença de uma mesma quantidade de água a hidrólise pode prosseguir de maneira mais rápida para o ascorbato, devido a maior solubilidade do sal (ISMAIL; MAUER, 2019).

Na tentativa de melhorar a estabilidade do ácido ascórbico, a técnica de microencapsulação pode ser uma alternativa viável em matrizes alimentares (LEE; AHN; LEE; KWAK, 2004). Sistemas encapsulados funcionam como reservatórios que contém a substância ativa revestida, constituídos por uma camada de um agente encapsulante que tem função protetora, isolando a substância ativa e evitando o efeito de sua exposição inadequada (GARCIA; BORGES; VANIN; CARVALHO, 2020). Esta técnica pode ser empregada em insumos alimentícios com o objetivo de reduzir a reatividade e aumentar a estabilidade (SOUZA; SIQUEIRA; AMORIM; MORAIS *et al.*, 2015). Segundo Carneiro *et al.* (2020) resultados positivos foram obtidos através da

aplicação desta técnica em compostos obtidos a partir de extratos de subprodutos industriais de acerola.

Souza *et al.* (2015) utilizaram a técnica *spray drying* para desenvolver micropartículas de galactomanana com alta eficiência de encapsulação da vitamina C, para investigar a sua capacidade antioxidante. Garcia *et al.* (2020) também utilizaram a técnica do *spray drying* para produzir pós de acerola e camu-camu, os quais apresentaram bons resultados de estabilidade e atividade antioxidante.

3.1.4 Alimentos ricos em vitamina C

A vitamina C pode ser adicionada na forma sintética ou derivada de alimentos. Estudos comparativos de biodisponibilidade em estado estacionário em humanos mostraram não haver diferenças significativas entre vitamina C sintética ou natural. Porém, apesar da semelhante biodisponibilidade demonstrada nestes estudos, a ingestão de vitamina C como parte de um alimento completo é preferível, pois leva ao consumo de outros nutrientes (CARR; VISSERS, 2013).

Uma das fontes de vitamina C derivadas de alimentos é a acerola, um fruto tropical que possui grande potencial nutricional, principalmente em função do seu alto conteúdo de vitamina C e outros compostos bioativos. Devido a estas características os frutos de acerola são interessantes candidatos para desenvolvimento de novos alimentos funcionais e suplementos dietéticos (TARUN BELWAL; DEVKOTA; HASSAN; AHLUWALIA *et al.*, 2018; XU; SHEN; ZHENG; XU *et al.*, 2020). Porém, o conteúdo de vitamina C é dependente do estágio de maturação do fruto, uma vez que frutos ainda verdes e imaturos podem apresentar maior teor de ácido ascórbico.

Durante o amadurecimento do fruto a ação de enzimas como ascorbato oxidase e peroxidases, podem levar a diminuição do conteúdo desta vitamina (DA FRANCA; ALVES FILHO; RIBEIRO; EVANGELISTA *et al.*, 2020). A exemplo disso, temos que o conteúdo de vitamina C em frutas de acerola maduras ($12,25 \pm 1,61$ mg/g) teve um declínio significativo em relação às frutas imaturas ($23,86 \pm 2,35$ mg/g) (XU; SHEN; ZHENG; XU *et al.*, 2020). O período de armazenamento também pode interferir no conteúdo total de vitamina C. O teor desta vitamina foi avaliada em bebida contendo suco de acerola e água de coco, o resultado mostrou que após 180 dias de armazenamento, em temperatura ambiente, o conteúdo de vitamina C representava 47,5% do seu valor inicial (DA S. LIMA; MAIA; DE SOUSA; DO PRADO *et al.*, 2009).

O conteúdo de vitamina C em leites fermentados por *Lactobacillus rhamnosus* foi avaliado comparando diferentes fontes de adição ao fermentado, sendo elas a vitamina C em pó, acerola em pó e pó orgânico de roseira brava (*Rosa canina* L.). Entre eles, a menor redução de conteúdo de vitamina C após 21 dias de armazenamento, ocorreu para o fermentado que utilizou a roseira brava. Esta menor redução do conteúdo de vitamina C pode estar relacionada a presença de compostos fenólicos, como taninos, ácidos fenólicos e antocianinas presentes nesta planta (ZNA MIROWSKA; SZAJNAR; PAWLOS, 2021).

3.1.5 Reações de escurecimento associadas a presença de vitamina C

O processo de degradação de vitaminas depende das condições de processamento, tais como temperatura, presença de oxigênio, luz, pH, umidade e duração do tratamento térmico (SUCUPIRA; XEREZA; SOUSA, 2012). A vitamina C é altamente instável, sendo suscetível a processos de degradação que levam a perda do valor nutricional e alteração de cor. Estruturalmente, a vitamina C, pode agir como um carboidrato redutor e, em presença de aminoácidos, proteínas e peptídeos, pode participar de reações de escurecimento não enzimático (SMUDA; GLOMB, 2013).

A degradação da vitamina C pode resultar em vários compostos de degradação. Na presença de aminoácidos podem combinar-se, resultando na formação de pigmentos marrons. O hidroximetilfurfural (HMF) pode estar entre um dos produtos da decomposição do ácido ascórbico, sendo sugerido como um precursor de pigmentos marrons. Em sucos, a oxidação pode ocorrer principalmente durante o processamento e a degradação anaeróbica durante o armazenamento (DA S. LIMA; MAIA; DE SOUSA; DO PRADO *et al.*, 2009). Em condições aeróbicas, o ácido ascórbico é transformado em ácido dehidroascórbico, que passa a ácido 2,3 dicetogulônico e, finalmente, HMF. Esta contribuição na reação de Maillard (RM) também pode ser considerada uma causa adicional para a diminuição do conteúdo de ácido ascórbico nos alimentos (SUCUPIRA; XEREZA; SOUSA, 2012).

A degradação da vitamina C em suco de laranja foi avaliada durante 40 dias de armazenamento, sendo quantificados também os teores de HMF, 5-metilfurfural e 2-metilfurfural. Os resultados demonstraram que simultaneamente a diminuição do conteúdo de ácido ascórbico, houve o aumento das concentrações de HMF, 5-metilfurfural e 2-metilfurfural. Assim, o acúmulo de HMF poderia ser utilizado como

indicador da degradação do ácido ascórbico no suco de laranja (RANDHAWA; JAVED; AHMAD; AMJAD *et al.*, 2020).

A presença de vitamina C em produtos alimentícios, em especial produtos lácteos, os torna propensos a reação de Maillard, afetando a qualidade final do produto. Em leites fortificados com ácido ascórbico, a presença de grupos amino e carbonila podem tornar o produto suscetível a redução da lisina disponível e à formação de produtos da reação de Maillard (TROISE; VITIELLO; TSANG; FIORE, 2016). Alterações de cor via Maillard foram avaliadas em isolado de proteína do soro de leite (WPI) e ácido ascórbico, considerando que o limite inferior para percepção da reação de Maillard seria de 1:100 (ácido ascórbico: WPI). Conforme o estudo, a temperatura de armazenamento pode afetar de forma significativa as reação entre WPI e ácido ascórbico, sendo que a taxa de reação de Maillard seria alta para pós secos por pulverização, mesmo em temperatura de 20 °C (ZHONG; TAN; LANGRISH, 2019). O processamento térmico das proteínas do soro do leite, presentes em formulação infantil também pode contribuir para diminuição da qualidade nutricional deste produto. O aumento deste tipo de tratamento para o concentrado de proteína de soro de leite (WPC) possivelmente leva a um aumento dos produtos da reação de Maillard (LUND; BECHSHOFT; RAY; LUND, 2022).

Os estudos citados anteriormente apontam que a degradação da vitamina C pode resultar em compostos que, em diferentes matrizes, podem atuar como precursores para formação de pigmentos marrons. Em alguns trabalhos o acúmulo do hidroximetilfurfural (HMF) foi relatado como um indicador da perda de conteúdo de vitamina C.

3.1.6 Reações de escurecimento via Maillard

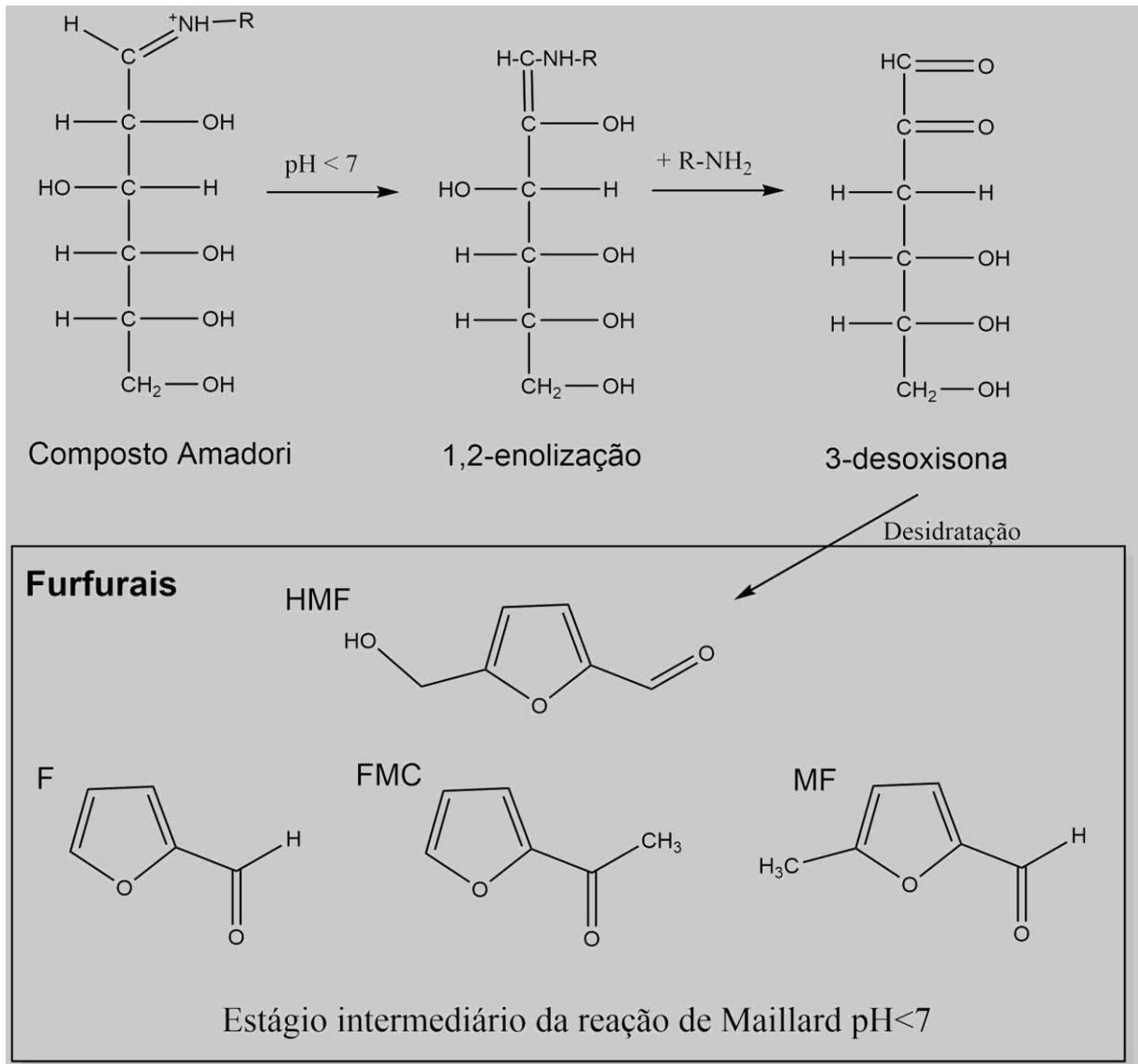
A reação de Maillard foi descoberta em 1912 por Louis Camille Maillard, enquanto trabalhava com aminoácidos e açúcares. Foi observado que após o aquecimento formava-se um produto castanho, sendo caracterizados como melanoidinas, a partir de então esta reação tem sido amplamente estudada (STEPHANI; MESA; PERRONE; FREDERICK *et al.*, 2022). A RM é caracterizada por uma cascata de reações químicas entre proteínas, aminoácidos e agentes redutores que levam a formação de produtos marrons. Açúcares redutores como a galactose,

frutose, glicose, lactose e maltose, coexistem com proteínas nos alimentos e por isto são estudados nestas reações (ZHONG; TAN; LANGRISH, 2019).

Esta reação pode ser induzida pelo tratamento térmico, produzindo cor, sabor e subprodutos indesejáveis. Em função disto, é considerada uma das reações químicas mais importantes no processamento e armazenamento de produtos lácteos. A reação é iniciada pela condensação de um açúcar redutor com um grupo amino (aminoácido ou proteína) levando a formação de uma base de Schiff. Em seguida ocorrem rearranjos que levam a formação de outras estruturas, como as melanoidinas (LUND; BECHSHOFT; RAY; LUND, 2022).

A RM pode ser dividida em três estágios: inicial, intermediário e avançado, sendo respectivamente marcadas pela formação de furosina, furfurais e produtos finais de glicação avançada (AGEs). Os furfurais presentes no estágio intermediário podem ser monitorados para avaliar as alterações causadas pelo tratamento térmico no leite (LI; SHEN; LU; YANG *et al.*, 2022). O estágio intermediário da reação de Maillard pode ser marcado por uma diminuição do pH, que pode influenciar mudanças estruturais (LUND; BECHSHOFT; RAY; LUND, 2022). Em pH menor que 7, os furfurais são os principais produtos formados, seguindo a rota 1,2 enolização, demonstrada na Figura 3. São gerados a partir da degradação do composto Amadori (lactosil-lisina) formado no estágio inicial de RM (LI; SHEN; LU; YANG *et al.*, 2022).

Figura 3 - Rota de formação dos furfurais a partir da degradação de compostos Amadori, sendo HMF (5-hidroximetilfurfural); F (2-furaldeído), FMC (2-furil-metilcetona); MF (5-metil-2-furaldeído).



Fonte: Adaptada de LI; SHEN; LU; YANG *et al.* (2022)

Na Tabela 3 estão descritos para diversas matrizes lácteas, os teores dos principais marcadores do estágio intermediário da RM, sendo estes: HMF (5-hidroximetilfurfural); F (2-furaldeído), FMC (2-furil-metilcetona); MF (5-metil-2-furaldeído). A quantificação destes compostos em alimentos é de suma importância, visto que, a comunidade europeia e o Codex Alimentarius descrevem como valor diário aceitável (*Acceptable Daily Intake -ADI*) 0,5 mg/kg para furfurais. O F e HMF têm sido relatados em alimentos tratados termicamente, como resultado da

degradação de açúcares via reação de Maillard. Em função disto, estes aldeídos aromáticos podem ser utilizados como potenciais indicadores para avaliar as consequências do tratamento térmico ou do tempo armazenamento em vários alimentos (KAMALABADI; GHAEMI; MOHAMMADI; ALIZADEH, 2015).

Tabela 3 - Conteúdo de furfurais: HMF (5-hidroximetilfurfural); F (2-furaldeído), FMC (2-furil-metilcetona); MF (5-metil-2-furaldeído) reportados em produtos lácteos.

Amostras	HMF (mg/kg)	F (mg/kg)	FMC (mg/kg)	MF (mg/kg)
Leite cru ^a	0,11	nq	nq	0,09
Leite UHT ^a	0,63	0,03	nq	0,05
Leite esterilizado (121 °C/15 min) ^a	1,52	0,15	0,03	0,02
Leite esterilizado (121 °C/30 min) ^a	4,78	0,4	0,07	0,03
logurte reconstituído ^b	1,101–1,483	0,046–0,052	0,006–0,011	0,032–0,039
Leite reconstituído ^b	nq - 0,227	0,01 - 0,306	nq - 0,009	0,002 - 0,311
Fórmula infantil ^b	0,006 -0,366	0,014 - 0,028	0,002 - 0,004	0,006 - 0,009
Leite fermentado sabor natural ^a	0,032–0,167	0,016–0,058	nq – 0,022	0,006–0,014
Leite em pó integral ^a	0,305	0,013	0,004	0,004

Fonte: Adaptada de ^a (LI; SHEN; LU; YANG *et al.*, 2022) e ^b (CUI; SHI; TANG; XIE *et al.*, 2020)
nq: Não quantificável.

Algumas estratégias têm sido discutidas para evitar a RM, como a utilização da epicatequina, um polifenol presente em vegetais como o chá verde, uvas e cacau. A epicatequina atuaria como um agente capaz de capturar grupos α -dicarbolinas como o glicoxal e metilglicoxal, compostos que aceleram a reação. O trans-resveratrol e ácido cafeíco também poderiam ser utilizados para aprisionamento das α -dicarbonilas (LUND; RAY, 2017). Compostos fenólicos como as catequinas podem ser encontrados em grandes quantidades nos chás de *Camellia sinensis*, conhecido como chá verde (PEREIRA; KNOR; VELLOSA; BELTRAME, 2014). O resveratrol é um polifenol natural encontrado em uvas que participa de mecanismos antioxidantes (GU; WANG; WU; GE *et al.*, 2021). Para controlar as reações de Maillard, além de considerar a capacidade de captura do grupo α -dicarbonil pelos compostos polifenóis, é necessário considerar possíveis efeitos indesejados causados pelo polifenol escolhido, sendo que estes efeitos irão limitar a quantidade de polifenol a ser adicionada (LUND; RAY, 2017).

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Nas seções seguintes serão apresentados o esquema de produção dos iogurtes adicionados de vitamina C, seguido das técnicas utilizadas para avaliar a estabilidade deste bioativo e possíveis reações de escurecimento.

3.2.1 Formulação e produção dos iogurtes adicionados de vitamina C

Quatro formulações de iogurtes foram preparadas a partir da reconstituição de leite em pó desnatado de baixo tratamento térmico da marca Land O'Lakes® e adição de vitamina C marca Synth®, sendo elas: T1 e T3 = 99,988% m/m leite e 0,012% vitamina C, T2 e T4= 100% m/m leite. As misturas foram feitas em cubas de inox com capacidade de 900 g, conforme descrito na Tabela 4. Estas foram submetidas a diferentes tratamentos térmicos, T1 e T2 foram tratadas a 90 °C por 5 minutos, condições convencionais na etapa de pasteurização do leite para produção de iogurtes e T3 e T4 receberam o tratamento térmico modificado, 90 °C por 2h e 43min. Esta alteração foi realizada com a intenção de iniciar RM, porém sem provocar intensa variação na cor final do produto. Estas temperaturas foram determinadas através da análise do gráfico (temperatura x tempo) para leite que apresenta as variações de cor, descrito por Kessler (2002). A temperatura de 90 °C por 2h e 43min se encontra em uma região limítrofe com relação à alteração de cor no leite conforme o tratamento térmico aplicado, a temperatura 90 °C por 5 minutos se encontra em uma região na qual não foi observado alteração de cor no leite (KESSLER, 2002).

Tabela 4 - Formulações dos iogurtes e tratamento térmico aplicado. Sendo T1 e T3 adicionados de vitamina C e T2 e T4 os respectivos controles.

Formulações	Leite* (g)	Vitamina C (g)	Tratamento térmico
T1	899,89	0,109	90 °C por 5 minutos
T2	900,00	0	
T3	899,89	0,109	90 °C por 2h e 43min
T4	900,00	0	

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

*Leite em pó desnatado de baixo tratamento térmico reconstituído

Os iogurtes foram produzidos através da adição de cultura iniciadora contendo *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (YoFlex® Mild 1.0) na concentração de 0,2 U. Após tratamento térmico amostras foram resfriadas e fermentadas a 42 ± 1 °C, sendo a fermentação dos leites interrompida em pH 4,6. Em seguida as amostras foram resfriadas até 20 ± 1 °C em refrigerador 7 ± 1 °C, após atingir a temperatura de 20 ± 1 °C a quebra do gel foi realizada manualmente através de movimentos circulares por 20 segundos, com o auxílio de uma espátula de material plástico. Os iogurtes foram armazenados por 21 dias em temperatura de 7 ± 2 °C em recipientes plásticos em volumes aproximados de 100 g por embalagem. As amostras foram analisadas antes do tratamento térmico (AT), depois do tratamento térmico (DT) após 1, 7, 14, 21 dias de produção, a fim de avaliar as características de pH, acidez titulável, teor de vitamina C, HMF (5-hidroximetilfurfural), F (2-furaldeído), FMC (2-furil-metilcetona) e MF (5-metil-2-furaldeído). O experimento consistiu em quatro lotes de produções das formulações para iogurtes e o esquema da produção está representado no Esquema 1.

Esquema 1 - Representação da produção de iogurte.

Leite em pó desnatado reconstituído	
Formulações T1 = 99,988% leite; 0,012% vitamina C T2= 100% leite	Formulações T3 = 99,988% leite; 0,012% vitamina C T4= 100% leite
Tratamento Térmico 90 °C por 5 minutos	Tratamento Térmico 90 °C por 2h e 43 minutos
Resfriamento $42^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$	
Adição da cultura iniciadora <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> e <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	
Fermentação até pH 4,6 42 ± 1 °C	
Resfriamento / Quebra do gel 20 ± 1 °C	
Estocagem à 7 ± 2 °C	

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

3.2.2 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação do conteúdo de vitamina C em iogurtes por cromatografia líquida de alta eficiência

O desenvolvimento do método e preparo das amostras foi realizado conforme adaptações da metodologia analítica da AOAC Official Method 2012.22. Para validar o método foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e recuperação, seguindo os critérios da RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. A seguir serão descritos os métodos utilizados para avaliação de todas as figuras de mérito, conforme a legislação vigente para validação do método analítico. Todos os dados analíticos foram gerados pelo software Waters Empower™ e tratados estatisticamente no software Microsoft Excel®.

3.2.2.1 Condições cromatográficas para determinação do teor de vitamina C

Foi empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa com coluna Synergi™ 4 µm Fusion-RP 80 Å, 250 x 4,6 mm e equipamento da marca Waters, modelo 1525, detector UV-Vis (PDA – *Photodiode Array Detector*). O tempo requerido para cada análise foi de 8 minutos, volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de 265 nm.

3.2.2.2 Reagentes

Foram utilizados reagentes com alto grau de pureza, sendo o padrão de ácido L-ascórbico grau analítico, *Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride* (TCEP), ácido tricloroacético (TCA), decilamina, acetato de sódio trihidratado, ácido fosfórico e acetonitrila específica para cromatografia líquida de alta eficiência, todos da marca Sigma-aldrich®. A água utilizada foi produzida pelo sistema Milli-Q do Laboratório CENTRALBIO na Faculdade de Farmácia-Universidade Federal de Juiz de Fora.

3.2.2.3 Preparo das amostras, padrões e soluções

O preparo das amostras foi realizado a partir de adaptações do método indicado na AOAC Official Method 2012.22. Em um tubo de ensaio foi adicionado 1 g

de iogurte, seguido da adição de 1 mL de TCEP 250 µg/mL, 0,5 mL de TCA 15% (m/v) e 0,5 mL de água Mili-Q. A solução foi centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos, em seguida uma alíquota 0,2 mL do sobrenadante foi transferida para um eppendorf, neste foi adicionado 0,2 mL de solução tampão acetato de sódio pH 5,4 e 1,6 mL de fase móvel. A solução foi centrifugada a 2680g por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro de seringa 0,45 µm para posterior injeção no cromatógrafo UV/PDA. Entre as soluções utilizadas neste preparo, o TCA tem a função de clarificação da amostra, precipitando proteínas e gorduras e o TCEP é o agente redutor. A função deste é favorecer a reação reversível em favor da redução do ácido deidroascórbico ao ácido L-ascórbico, mostrada anteriormente, sendo possível determinar o conteúdo total de vitamina C.

As soluções padrões, soluções diluentes e fase móvel foram preparadas exatamente como descrito AOAC Official Method 2012.22.

3.2.2.3 Seletividade

A seletividade foi comprovada através da equivalência do tempo de retenção para o ácido ascórbico como padrão externo e também presente nas amostras, bem como pelo aumento da área do pico em amostras fortificadas.

3.2.2.4 Linearidade

A linearidade foi verificada pela construção de três curvas analíticas na faixa de 0,25 - 10 µg/mL, através de soluções padrão de ácido ascórbico nas concentrações 0,25; 0,5; 1,0; 3,0; 7,5 e 10,0 µg/mL. A relação linear foi avaliada através do coeficiente de correlação (r) e a avaliação do ajuste feita pela aplicação do Teste F, pelo teste de Grubbs foi feita a verificação da ausência de valores discrepantes. A avaliação do coeficiente de correlação é importante, porém não conclusivo. A linearidade deve ser avaliada também por meio do teste F, na análise de variância de regressão (INMETRO, 2016).

3.2.2.5 Sensibilidade: limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)

O Limite de detecção (LD) representa a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O Limite de Quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. A determinação destes parâmetros foi baseada em parâmetros da curva analítica, conforme equações 1 e 2.

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC} \quad \text{Equação (1)}$$

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC} \quad \text{Equação (2)}$$

Sendo:

σ : desvio padrão

IC: Inclinação da curva

3.2.2.6 Precisão e Exatidão

Estes parâmetros foram expressos por meio da repetibilidade e da precisão intermediária a fim de avaliar amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação em uma única corrida analítica. Foram realizadas nove determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, sendo elas, três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas em cada nível. Para a medida da repetibilidade foram considerados resultados obtidos em uma rodada de experimento e para precisão intermediária resultados obtidos em rodadas diferentes. A precisão pode ser expressa numericamente através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV) (RIBANI; BOTTOLI; COLLINS; JARDIM *et al.*, 2004). As equações utilizadas para o cálculo do DPR estão descritas a seguir.

$$s = \frac{\sqrt{\sum (xi - xm)^2}}{n - 1} \quad \text{Equação (3)}$$

$$DPR(\%) \text{ ou } CV(\%) = \frac{s}{xm} \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

Sendo:

\bar{x}_m : média das determinações

x_i : valor individual de uma medição

n : número de medições.

3.2.2.7 Taxa de recuperação da vitamina C em iogurtes

A recuperação foi expressa pela relação percentual da concentração experimental do analito (CA) e a concentração teórica do analito adicionado (CTA), conforme equação 5 (ANVISA, 2017). A matriz avaliada, iogurte, foi fortificada com solução padrão de vitamina C, a fim de avaliar o quanto do analito pode estar sendo retido pela matriz ou perdido durante o preparo de amostra.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{CA (\text{amostra adicionada}) - CA (\text{amostra})}{CTA} \times 100 \quad \text{Equação (5)}$$

3.2.3 Modelo matemático para cinética de degradação da vitamina C em iogurtes

A cinética de degradação de componentes nutricionais que afetam a qualidade final do produto, pode ser de ordem zero, primeira ou segunda ordem, a ordem da reação é dada comparando valores de $n = 0, 1$ ou 2 , conforme a equação 6 (BADIN; QUEVEDO-LEON; IBARZ; RIBOTTA *et al.*, 2021; GABAS; TELIS-ROMERO; MENEGALLI, 2003; GAMBOA-SANTOS; MEGIAS-PEREZ; SORIA; OLANO *et al.*, 2014; ZHANG; LUO; WANG; GU *et al.*, 2021).

$$\frac{dC}{dt} = -KC^n \quad \text{Equação (6)}$$

Para aplicação da equação no iogurte, temos que C é a concentração do ácido ascórbico no tempo t e K é a constante de velocidade da reação. As formas integradas de ordem zero e primeira são mostradas nas equações 7 e 8. Nas quais C_0 representa a concentração inicial de ácido ascórbico.

$$\text{Ordem zero: } C = C_0 - Kt \quad \text{Equação (7)}$$

Primeira ordem: $C = C_0 e^{-Kt}$ Equação (8)

Para determinar o valor da constante de velocidade K, o conteúdo de vitamina C foi determinado após 1;5;7;10;14;18 e 21 dias de produção para cada tratamento térmico aplicado. Os valores experimentais foram plotados graficamente de modo a simular a cinética de ordem zero e primeira ordem. O modelo que melhor se ajustou aos dados foi determinado através da avaliação dos coeficientes de regressão e correlação.

Para ordem zero foi traçado o gráfico $C - C_0$ em função do tempo, e para reação de primeira ordem o valor de K foi obtido traçando um gráfico $\ln \frac{C}{C_0}$ pelo tempo, sendo o valor de K equivalente ao coeficiente angular da curva. A partir da obtenção do valor de K foi possível substituir o seu valor na equação 8 ou 9, conforme o modelo ajustado, e assim obter uma equação que permitiu estimar o conteúdo de vitamina C em variados tempos.

3.2.4 Determinação dos marcadores da reação de Maillard, HMF (5-hidroximetilfurfural); F (2-furaldeído), FMC (2-furil-metilcetona); MF (5-metil-2-furaldeído) por cromatografia líquida de alta eficiência

A presença dos marcadores da reação de Maillard foi avaliada nas etapas prévias e após o tratamento térmico e também durante os dias 1,7,14 e 21 de produção dos iogurtes. O método utilizado para identificar e quantificar estes analitos foi adaptado do trabalho desenvolvido por Pinto (2023) que investigou a presença de HMF, F, FMC e MF também em amostras lácteas. Para aplicação do método, foi determinado a taxa de recuperação dos marcadores da RM na matriz de interesse, o iogurte. Para todas as análises realizadas foram construídas curvas analíticas, sendo utilizado como critério de aceitação o coeficiente de determinação ($R^2 > 0,99$). Todos os dados analíticos foram gerados pelo software Waters Empower™ e tratados estatisticamente no software Microsoft Excel®.

3.2.4.1 Condições cromatográficas para determinação de conteúdo dos marcadores HMF, F, FMC e MF

Foi empregado a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa com coluna Waters Spherisorb (150 mm ×4,6 mm; tamanho de partícula de 3 µm) e equipamento da marca Waters, modelo 1525, detector UV-Vis (PDA – Photodiode Array Detector). O tempo requerido para cada análise foi de 10 minutos, volume de injeção de 20 µL, temperatura de 30 °C e comprimento de onda de 284 nm. A análise foi feita em modo de eluição gradiente conforme Tabela 5.

Tabela 5 - Modo de eluição gradiente aplicado para determinação dos marcadores HMF, F, FMC e MF

Tempo (min)	Fluxo (mL.min⁻¹)	Água (%)	Acetonitrila (%)
0	1,0	95,5	4,5
5	1,0	80,0	20,0
9	1,0	95,5	4,5
10	1,0	95,5	4,5

Fonte: (PINTO, 2023)

3.2.4.1 Reagentes

Foram utilizados reagentes com alto grau de pureza, sendo os padrões, HMF (5-hidroximetilfurfural); F (2-furaldeído), FMC (2-furil-metilcetona) e MF (5-metil-2-furaldeído) de grau analítico, acetonitrila específica para cromatografia líquida de alta eficiência, todos da marca Sigma-aldrich®. A água utilizada foi produzida pelo sistema Milli-Q do Laboratório CENTRALBIO na Faculdade de Farmácia-Universidade Federal de Juiz de Fora.

3.2.4.1 Preparo das amostras, padrões e soluções

Em um eppendorf foi adicionado 1 g de amostra e 0,2 mL de água Milli-Q, a solução foi misturada em vórtex por 20 segundos. Em seguida, foi adicionado 0,3 mL TCA 55% (m/v) e novamente misturado em vórtex por 20 segundos, posteriormente a solução foi centrifugada a 2680g por 10 minutos. Após isto, 0,5 mL do sobrenadante foi coletado, transferido para eppendorf seguindo da adição de 0,1 mL de água Milli-Q e 0,3 mL TCA 55% (m/v). As soluções foram novamente agitadas em vórtex por 20 segundos, centrifugadas a 2680g por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro de seringa 0,22 µm, para posterior injeção no HPLC-UV/PDA. As

soluções padrões, soluções diluentes e fase móvel foram preparadas exatamente como descrito por Pinto (2023).

3.2.4.3 Avaliação taxa de recuperação dos marcadores HMF, F, FMC e MF em iogurte

A recuperação foi expressa pela relação percentual da concentração experimental do analito (CA) e a concentração teórica do analito adicionado (CTA), conforme equação 5. A matriz avaliada, iogurte, foi fortificada com soluções padrões de HMF, F, FMC e MF e submetidas ao preparo de amostras indicado no item anterior 3.2.4.1. O iogurte foi fortificado de modo a obter como concentração final 1,8 µg/mL de HMF e 0,72 µg/mL dos marcadores F, FMC e MF.

3.2.5 Parâmetros de cor - CIE-LAB

Os dados de cor foram obtidos com o colorímetro portátil da marca Konica Minolta, modelo CR-400, operado segundo o sistema da CIE (*Commission International de l'Eclairage*). O instrumento foi calibrado com uma placa branca padrão e foram medidos os parâmetros L* a* e b*. O valor de L* representa a luminosidade que varia de 0 (preto) a 100(branco), a* e b* são as coordenadas cromáticas (-a =verde, +a = vermelho, -b = azul e +b = amarelo) (BADIN; QUEVEDO-LEON; IBARZ; RIBOTTA *et al.*, 2021). Cada determinação de cor foi feita em triplicata, browning index (BI) e cromaticidade (croma) foram calculados conforme as equações 9, 10 e 11 (YU; ZHONG; GUO; XIE *et al.*, 2020) (BADIN; QUEVEDO-LEON; IBARZ; RIBOTTA *et al.*, 2021) (PATHARE; OPARA; AL-SAID, 2012).

$$X = \frac{(a^* + 1,750L)}{(5,645L + a^* - 3,012b^*)} \quad \text{Equação (9)}$$

$$BI = \frac{[100(X - 0,31)]}{0,17} \quad \text{Equação (10)}$$

$$Croma = (a^2 + b^2)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Equação (11)}$$

3.2.6 Determinação de pH e acidez titulável em iogurtes

O pH e acidez titulável foi medido antes e após o tratamento térmico e também nos dias 1, 7, 14, 21 após a produção do iogurte, as determinações foram feitas em triplicata. O pH foi medido com determinador de pH (PG 1400, GEHAKA®) e acidez titulável pelo método potenciométrico conforme ISO/TS 11869:2012.

3.2.7 Análise estatística

Foram produzidos quatro lotes de cada iogurte, as análises estatísticas foram realizadas em um nível de significância de 0,05 através do teste Tukey aplicado com auxílio do Software R® versão 4.1.2 (The R Foundation for Statistical Computing). Os testes de correlação foram aplicados para avaliar a relação entre os resultados obtidos de pH, acidez titulável, colorimetria, conteúdo de vitamina C e marcadores de Maillard. Os parâmetros avaliados nos ensaios de validação obtidos pelo software Waters Empower™ e tratados estatisticamente pelo Software Microsoft Excel®.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nas seções seguintes serão discutidos os resultados referentes a quantificação, estabilidade e reações de escurecimento da vitamina C em iogurtes.

3.4.1 Desenvolvimento e validação metodologia para quantificação de vitamina C em iogurtes

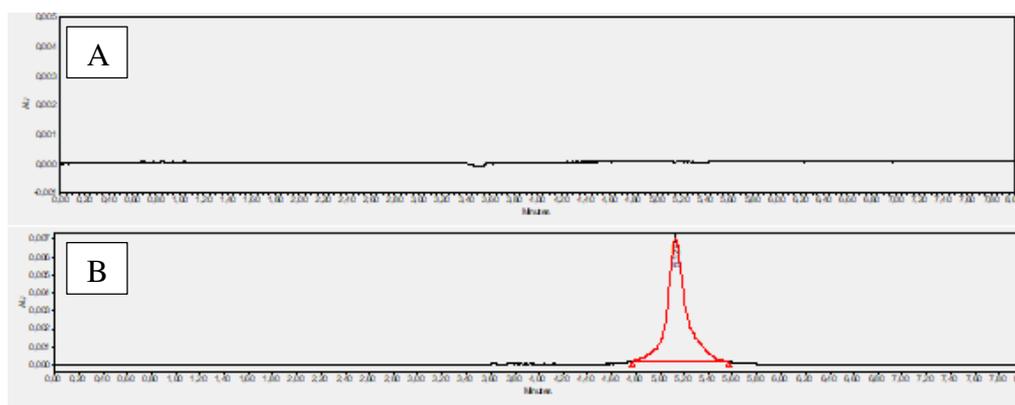
A seguir os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e recuperação, avaliados conforme os critérios da RDC nº 166, de 24 de julho de 2017.

3.4.1.1 Seletividade e linearidade

A seletividade foi comprovada através da equivalência do tempo de retenção para o ácido ascórbico como padrão externo e também presente nas amostras, bem como pelo aumento da área do pico em amostras fortificadas. A seletividade também foi avaliada para as soluções utilizadas no preparo de amostra e fase móvel, sendo

comprovada pela ausência de resposta analítica no tempo de retenção do ácido ascórbico, conforme apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Cromatograma do branco mostrando a ausência de interferentes (A) e cromatograma da solução padrão de vitamina C (B).



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

A linearidade foi verificada na faixa de 0,25 - 10 $\mu\text{g/mL}$ de soluções padrão de ácido ascórbico, foram avaliados os coeficientes de regressão angular (a) e linear (b) e também o coeficiente de correlação (r). Os valores estão apresentados na Tabela 6, e foram calculados com auxílio do Software Microsoft Excel®. Quanto mais próximo de 1,0 o coeficiente de correlação estiver, menor a incerteza. Segundo o INMETRO, o valor de (r) deve ser maior que 0,9 e segundo a ANVISA, maior que 0,99. (RIBANI; BOTTOLI; COLLINS; JARDIM *et al.*, 2004).

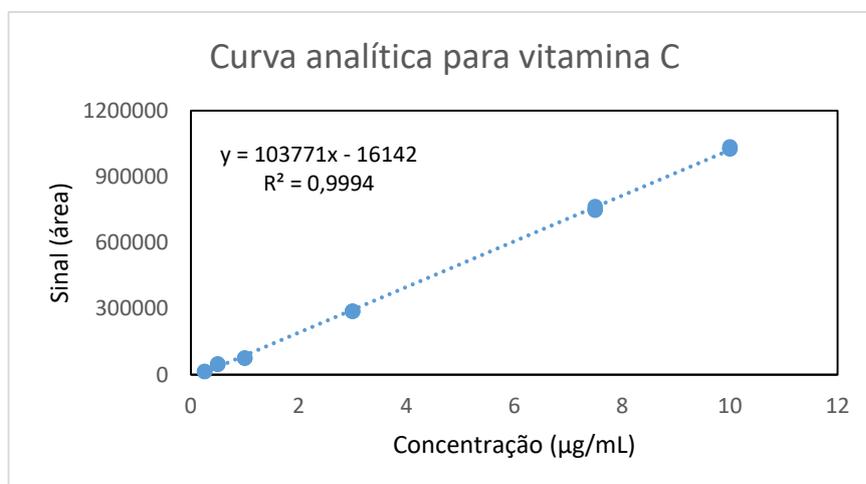
Tabela 6 - Coeficientes de regressão linear da curva analítica para vitamina C.

a	b	r
Coef. angular	Coef. linear	Coef. correlação
103771	-16142	0,9996

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Para a curva analítica construída, os valores de r foram $>0,99$ em 6 níveis. Pelo teste F, foi verificada a linearidade dos dados e pelo teste de Grubbs foi feita a verificação da ausência de valores discrepantes. O Gráfico 1 representa a curva analítica a partir da média da triplicata das concentrações 0,25; 0,5; 1,0; 3,0; 7,5 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$.

Gráfico 1 - Representação gráfica das respostas em função da concentração do analito.



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Nota: R^2 representa o coeficiente de determinação, calculado pelo do Software Microsoft Excel® através da função "RQUAD".

3.4.1.2 Limite de Detecção e Quantificação

A determinação dos limites de detecção e quantificação foi baseada em parâmetros da curva analítica, conforme equações 1 e 2. Sendo estes respectivamente 0,031 $\mu\text{g/mL}$ e 0,094 $\mu\text{g/mL}$.

Os valores calculados estatisticamente para LQ e LD garantem a sensibilidade do método, fator de grande importância considerando a intenção em aplicar o método para avaliação da taxa de degradação da vitamina C.

3.4.1.3 Precisão e Exatidão

A precisão avalia resultados obtidos em ensaios isolados de uma amostra em condições pré-definidas, ela pode ser avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR), também chamado de coeficiente de variação (CV). Em geral, para métodos que avaliam compostos em macroquantidades espera-se um valor de DPR menor que 2% e para análise de elementos traços até 20% (RIBANI; BOTTOLI; COLLINS; JARDIM *et al.*, 2004). A repetibilidade, também designada por precisão intra-ensaio, exprime a precisão nas mesmas condições de funcionamento durante um curto espaço de tempo. A precisão intermédia expressa variações dentro do laboratório, por exemplo,

em dias diferentes. A exatidão de um procedimento analítico expressa a proximidade entre os valores obtidos e o valor de referência aceito como verdadeiro (ICH, 1995).

Nas Tabelas 7 e 8 estão expressos os resultados obtidos para estes ensaios. Os valores de DPR estão de acordo com o critério de aceitação ($DPR < 2$) e um intervalo de 90 a 110% para medida de exatidão do método.

Tabela 7 - Resultados do ensaio de precisão pelo método da repetibilidade

Concentrações avaliadas	Desvio Padrão Relativo (%)	Exatidão (%)
Baixa - 2 µg/mL	0,89	98,68 – 101,18
Média - 5 µg/mL	0,72	98,88 – 100,87
Alta - 8 µg/mL	0,43	99,40 – 100,62

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Tabela 8 - Resultados do ensaio de precisão pelo método da precisão intermediária

Concentrações avaliadas	Desvio Padrão Relativo (%)	Exatidão (%)
Baixa - 2 µg/mL	0,98	98,19 – 101,38
Média - 5 µg/mL	1,44	98,01 – 102,46
Alta - 8 µg/mL	0,65	96,42 – 101,19

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Avaliando os resultados podemos considerar que o método validado é preciso e exato, podendo ser aplicado para quantificação de vitamina C na matriz estudada.

3.4.1.4 Taxa de Recuperação

A taxa de recuperação nos fornece informações sobre a porcentagem do analito que fica retido na amostra ou se perde durante o método de preparo. Essa avaliação é necessária sempre que a determinação for feita em matrizes complexas. Segundo a ANVISA, uma matriz complexa é aquela que contém um número indefinido de substâncias não monitoradas, que não podem ser obtidas sem a presença do analito. O leite possui componentes como proteínas, gorduras, sais e açúcares que

podem interagir com o analito de forma a prejudicar sua quantificação e identificação em pequena quantidade, sendo importante avaliar a taxa de recuperação.

A recuperação foi expressa pela relação percentual da concentração experimental do analito (CA) e a concentração teórica do analito adicionado (CTA), conforme equação 3. O ensaio foi realizado em duplicata e como resultado a taxa de recuperação média foi de 91,96% conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados do ensaio de exatidão pelo método da recuperação para vitamina C

Replicata	Recuperação %
A	90,35
B	93,57
Média	91,96

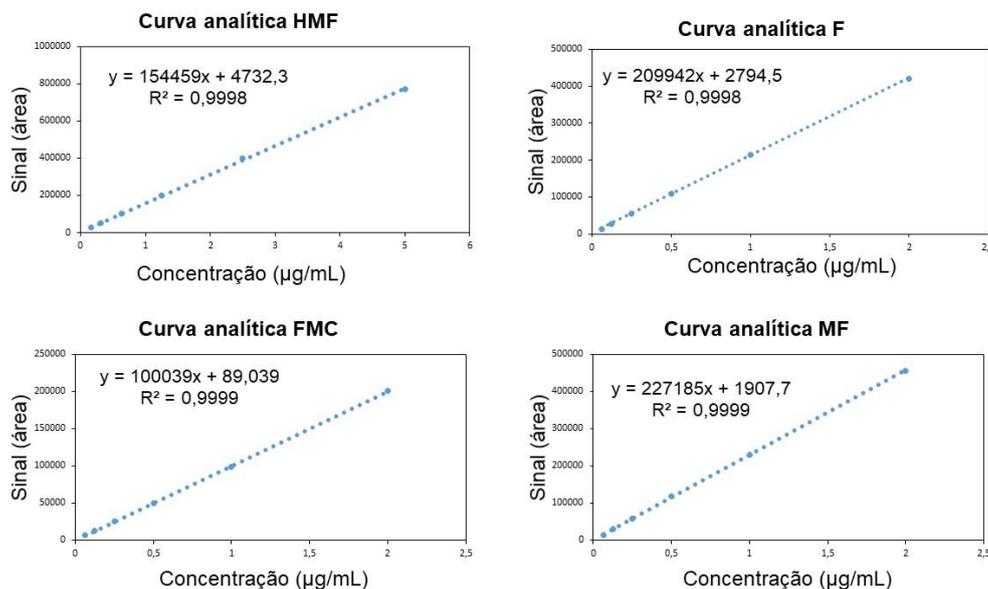
Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Considerando os resultados estatísticos, o método desenvolvido e validado conforme adaptações da metodologia analítica da AOAC Official Method 2012.22, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta mostrou-se adequado para quantificação de vitamina C em iogurte. O tratamento estatístico demonstrou que o método pode ser considerado preciso, seletivo, linear em uma ampla faixa de trabalho e exato com recuperação maior que 90%. O método também pode ser considerado sensível, apresentando limites de detecção e quantificação compatíveis com a curva analítica e a natureza das amostras analisadas.

3.4.2 Verificação da metodologia analítica para quantificação dos marcadores da reação de Maillard em iogurtes

Foi verificada a relação linear na faixa de 0,156- 5 µg/mL para HMF e 0,062- 2 µg/mL para F, FMC e MF. Por análise do coeficiente de determinação (R^2) todas as curvas apresentaram comportamento linear, conforme apresentado no Gráfico 2.

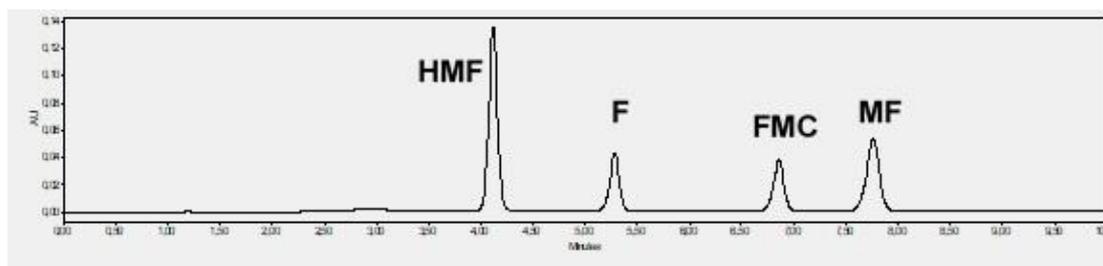
Gráfico 2 - Curvas analíticas obtidas para os marcadores da reação de Maillard (HMF, F, FMC e MF)



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

O cromatograma obtido para análise simultânea dos 4 marcadores da RM analisados é apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Cromatograma da solução padrão contendo HMF, F, FMC e MF



Fonte: (PINTO, 2023)

3.4.2.2 Taxa de recuperação do método para quantificação de HMF, F, FMC e MF em iogurtes

A Tabela 10 apresenta os resultados das porcentagens de recuperação, calculados conforme equação 3, para cada analito na matriz em estudo.

Tabela 10 - Resultados do ensaio de exatidão pelo método da recuperação para os marcadores da RM

Analito	Recuperação %
HMF	102,79 ± 5,37
F	91,55 ± 1,27
FMC	81,50 ± 1,26
MF	90,44 ± 0,19

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A determinação da taxa de recuperação é aplicada quando a matriz pode interferir na identificação, separação e quantificação da amostra. Este ensaio tem a função de identificar possíveis perdas de conteúdo dos analitos de interesse durante o preparo da amostra ou efeito de retenção da matriz. Por esta razão, mesmo utilizando um método para quantificação dos marcadores previamente validado, é imprescindível a verificação da taxa de recuperação de cada um dos marcadores em iogurte. Para todos os marcadores foi obtido uma alta taxa de recuperação para a matriz avaliada.

3.4.3 Variações do pH e acidez titulável nos iogurtes produzidos

As formulações foram analisadas antes (AT) e depois (DT) da aplicação dos tratamentos térmicos e nos dias 1, 7, 14 e 21 após a produção dos iogurtes, os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Desenvolvimento do pH e acidez titulável nos iogurtes durante os dias de estocagem.

Propriedades	Dias de estocagem	T1*	T2	T3	T4
pH	AT**	6,62 ± 0,08 ^{Aa}	6,68 ± 0,05 ^{Aa}	6,62 ± 0,08 ^{Aa}	6,68 ± 0,05 ^{Aa}
	DT	6,45 ± 0,07 ^{Bab}	6,49 ± 0,06 ^{Ba}	6,38 ± 0,04 ^{Bc}	6,39 ± 0,06 ^{Bbc}
	D1	4,33 ± 0,07 ^{Cbc}	4,32 ± 0,07 ^{Cc}	4,40 ± 0,05 ^{Ca}	4,39 ± 0,05 ^{Cab}
	D7	4,32 ± 0,04 ^{Cbc}	4,30 ± 0,05 ^{Cc}	4,38 ± 0,04 ^{Ca}	4,36 ± 0,03 ^{Cab}
	D14	4,23 ± 0,04 ^{Dc}	4,23 ± 0,03 ^{Cc}	4,32 ± 0,03 ^{Da}	4,28 ± 0,01 ^{Db}
	D21	4,22 ± 0,03 ^{Dc}	4,22 ± 0,03 ^{Cc}	4,32 ± 0,02 ^{Da}	4,28 ± 0,01 ^{Db}
Acidez titulável (g de ácido lático/100g)	AT	0,15 ± 0,01 ^{Cb}	0,16 ± 0,01 ^{Ca}	0,15 ± 0,01 ^{Cb}	0,16 ± 0,01 ^{Ca}
	DT	0,15 ± 0,01 ^{Cbc}	0,15 ± 0,01 ^{Cc}	0,17 ± 0,01 ^{Ca}	0,17 ± 0,01 ^{Cab}
	D1	0,80 ± 0,03 ^{Bb}	0,81 ± 0,02 ^{Bb}	0,82 ± 0,01 ^{Bab}	0,84 ± 0,02 ^{Ba}
	D7	0,89 ± 0,01 ^{Aa}	0,89 ± 0,01 ^{Aa}	0,89 ± 0,05 ^{Aa}	0,92 ± 0,01 ^{Aa}
	D14	0,91 ± 0,03 ^{Aa}	0,90 ± 0,03 ^{Aa}	0,91 ± 0,03 ^{Aa}	0,91 ± 0,04 ^{Aa}
	D21	0,88 ± 0,01 ^{Ac}	0,89 ± 0,01 ^{Ac}	0,91 ± 0,02 ^{Ab}	0,93 ± 0,01 ^{Aa}

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

* T1 iogurte com 0,012% vitamina C; T2 iogurte controle, ambos tratados 90 °C por 5 minutos; T3 iogurte com 0,012% vitamina C; T4 iogurte controle, ambos tratados 90 °C por 2h e 43 minutos. ** (AT) antes do tratamento térmico; (DT) depois do tratamento térmico

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma coluna e médias seguidas da mesma letra minúscula da linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os valores de pH se apresentam estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey, entre os tempos AT e DT para todas as amostras, indicando que o tratamento térmico tem influência no valor do pH. No leite as micelas de caseínas, constituídas basicamente por moléculas de caseínas, água e sais minerais, se transformam conforme as condições em que são submetidas, inclusive a temperatura. (SILVA; CASANOVA; PINTO; CARVALHO *et al.*, 2019). Uma das funções do tratamento térmico do leite previamente a fermentação é provocar a desnaturação das proteínas do soro e contribuir com a viscosidade do produto final.

Após a fermentação, nos tempos D1 e D7 é possível observar a redução dos valores de pH e aumento da acidez, isto ocorre em função da continuidade de atuação das bactérias lácticas mesmo após a finalização do processo de fermentação. Após este período é possível observar uma estabilização dos valores de pH e acidez. A

presença da vitamina C não afetou estes parâmetros, já que os tratamentos T1 e T3 não são estatisticamente diferentes dos demais em nenhum tempo de análise.

3.4.4 Determinação de conteúdo de vitamina C e marcadores da reação de Maillard, HMF (5-hidroxiacetilfurfural); F (2-furaldeído), FMC (2-furil-metilcetona); MF (5-metil-2-furaldeído) por cromatografia líquida de alta eficiência, detector UV-Vis (PDA – *Photodiode Array Detector*)

Furanos como HMF, F, FMC e MF são produtos intermediários da reação de Maillard encontrados como compostos livres (não ligados a proteínas), em que o HMF em particular tem sido usado como um indicador de danos causados pelo calor em produtos lácteos (LUND; BECHSHOFT; RAY; LUND, 2022). Na Tabela 12 estão apresentados os teores de HMF, F, FMC e MF quantificados antes e depois do tratamento térmico e após a produção dos iogurtes dos tempos D1, D7, D14 e D21. Com relação à formação de HMF não houve diferença estatística significativa entre as amostras T1, T2, T3 e T4 antes do tratamento térmico (AT), sugerindo que a presença da vitamina C em T1 e T3 não afetou a formação inicial deste marcador. Em DT, análise depois do tratamento térmico, os iogurtes T1 e T2 apresentaram valores de conteúdo de HMF estatisticamente distintos de T3 e T4, indicando que o tratamento térmico de 2h e 43 minutos teve influência significativa neste parâmetro. Os teores de HMF no primeiro dia após a fermentação (D1) são os maiores observados durante todo *shelf life*, após o tempo D7 estes valores diminuem até o último tempo monitorado, D21. Este perfil sugere que após o tratamento térmico a RM é iniciada. Entre D1 e D7 identificamos a presença do HMF como um parâmetro que marca a etapa intermediária da reação, após esta etapa outros compostos são formados utilizando furfurais como precursores.

Tabela 12 - Marcadores da reação de Maillard e Vitamina C. Sendo T1 iogurte com 0,012% vitamina C; T2 iogurte controle, ambos tratados 90 °C por 5 minutos; T3 iogurte com 0,012% vitamina C; T4 iogurte controle, ambos tratados 90 °C por 2h e 43 minutos

Analitos	Trat.	AT	DT	D1	D7	D14	D21
HMF livre (mg/100g)	T1	0,021 ± 0,015 ^{Aab}	0,030 ± 0,010 ^{Aab}	0,049 ± 0,039 ^{Aa}	0,023 ± 0,024 ^{Aab}	0,009 ± 0,007 ^{Ab}	0,010 ± 0,001 ^{Ab}
	T2	0,031 ± 0,011 ^{Aab}	0,028 ± 0,013 ^{Aab}	0,053 ± 0,032 ^{Aa}	0,015 ± 0,013 ^{Ab}	0,007 ± 0,001 ^{Ab}	0,006 ± 0,005 ^{Ab}
	T3	0,021 ± 0,015 ^{Ac}	0,105 ± 0,020 ^{Bab}	0,126 ± 0,062 ^{Ba}	0,059 ± 0,025 ^{ABbc}	0,048 ± 0,008 ^{Bc}	0,052 ± 0,006 ^{Bc}
	T4	0,031 ± 0,011 ^{Ac}	0,094 ± 0,023 ^{Bab}	0,173 ± 0,061 ^{Ba}	0,073 ± 0,006 ^{Babc}	0,048 ± 0,014 ^{Bbc}	0,043 ± 0,009 ^{Bbc}
F livre (mg/100g)	T1	ND	ND	ND	ND	0,040 ± 0,096 ^A	ND
	T2	ND	<LOQ	<LOQ	ND	0,012 ± 0,013 ^A	ND
	T3	ND	ND	ND	ND	0,024 ± 0,026 ^A	ND
	T4	ND	<LOQ	0,023 ± 0,025	ND	0,027 ± 0,029 ^A	ND
FMC livre (mg/100g)	T1, T2, T3 e T4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MF livre (mg/100g)	T1, T2, T3 e T4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Vitamina C (mg/100g)	T1	9,23 ± 1,37 ^{Aa}	7,83 ± 0,91 ^{Aa}	5,96 ± 1,00 ^{Ab}	4,58 ± 1,21 ^{Ab}	3,05 ± 0,13 ^{Ac}	1,97 ± 0,15 ^{Ac}
	T2	0,62 ± 0,17 ^{Ba}	0,61 ± 0,21 ^{Ba}	0,67 ± 0,17 ^{Ba}	0,66 ± 0,20 ^{Ba}	0,72 ± 0,05 ^{Ba}	0,90 ± 0,24 ^{ABa}
	T3	9,23 ± 1,37 ^{Aa}	7,93 ± 1,05 ^{Aa}	5,99 ± 0,94 ^{Ab}	4,66 ± 1,06 ^{Abc}	3,17 ± 0,85 ^{Accd}	2,40 ± 0,33 ^{Ad}
	T4	0,62 ± 0,17 ^{Ba}	0,57 ± 0,17 ^{Ba}	0,73 ± 0,06 ^{Ba}	0,72 ± 0,23 ^{Ba}	0,75 ± 0,16 ^{Ba}	0,80 ± 0,30 ^{Ba}

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Sendo: MF (5-hidroximetilfurfural); F (2-furaldeído), FMC (2-furil-metilcetona); MF (5-metil-2-furaldeído).

(AT) antes do tratamento térmico; (DT) depois do tratamento térmico. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma coluna e médias seguidas da mesma letra minúscula da linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. HMF (LD): 0,004 mg/100g; HMF (LQ): 0,012 mg/100g; F (LD): 0,002 mg/100g F (LOQ): 0,009 mg/100g; FMC (LD): 0,002 mg/100g; FMC (LQ): 0,007 mg/100g; MF (LD): 0,004 mg/100g; MF (LQ): 0,013 mg/100g. ND: não detectado

Não foi detectada a presença do furfural antes do tratamento térmico (AT) para nenhuma das amostras. Após o tratamento térmico (DT) a presença deste marcador foi identificada nas amostras T2 e T4, porém em valores menores que o limite de quantificação do método (LQ = 0,009 mg/ 100 g). No tempo D1 este marcador pode ser quantificado para a amostra T4, iogurte controle no qual o leite foi tratado termicamente a 90 °C por 2 horas e 43 minutos. O teor de furfural pode ser medido também no tempo D14, porém a sua formação não ocorre de maneira similar em todas as amostras analisadas, apresentando grandes variações de conteúdo dentro do mesmo tratamento. Os marcadores FMC e MF não foram detectados em nenhuma das análises realizadas

Outro estudo mostra que, em leite fermentado marrom (*brown fermented milk*) o teor de HMF aumentou significativamente em função do escurecimento e do processo de fermentação. A análise dos furfurais em amostras de leite, leite em pó e leite em pó reconstituído mostrou que os teores destes marcadores estão diretamente relacionados ao tratamento térmico e ao processo de fermentação (LI; SHEN; LU; YANG *et al.*, 2022).

No trabalho desenvolvido por Cui *et al.* (2020) avaliou-se a presença de HMF, F, FMC e MF em diversas matrizes lácteas comerciais por GC–MS/MS, sendo observado que temperaturas mais altas de tratamento térmico podem levar a maiores níveis de furfurais. Leites em pó reconstituídos apresentaram maiores valores de furfural que o leite. Maiores teores de furfurais também foram encontrados em iogurtes reconstituídos em comparação com o leite em pó reconstituído, sendo relatado valores de até 3,430 mg/kg de HMF. Segundo os autores, leites fermentados apresentam maiores teores de furfurais que o leite, em função da reação de Maillard que ocorre durante a fermentação (CUI; SHI; TANG; XIE *et al.*, 2020).

Com relação ao conteúdo de vitamina C nos tratamentos T1 e T3, foi observado uma taxa de degradação similar para as duas condições. Reduções da concentração deste composto ocorreram em todos os tempos avaliados. Ao final de 21 dias de produção, os iogurtes apresentaram uma perda média de 77% com relação a concentração inicial. Estes resultados demonstram a instabilidade da vitamina C com relação ao tratamento térmico, fermentação e período de estocagem. As porcentagens de perda em todos os períodos avaliados são mostradas na Tabela 13.

Tabela 13 - Porcentagens de perda de conteúdo de vitamina C com relação à análise inicial AT (antes do tratamento térmico).

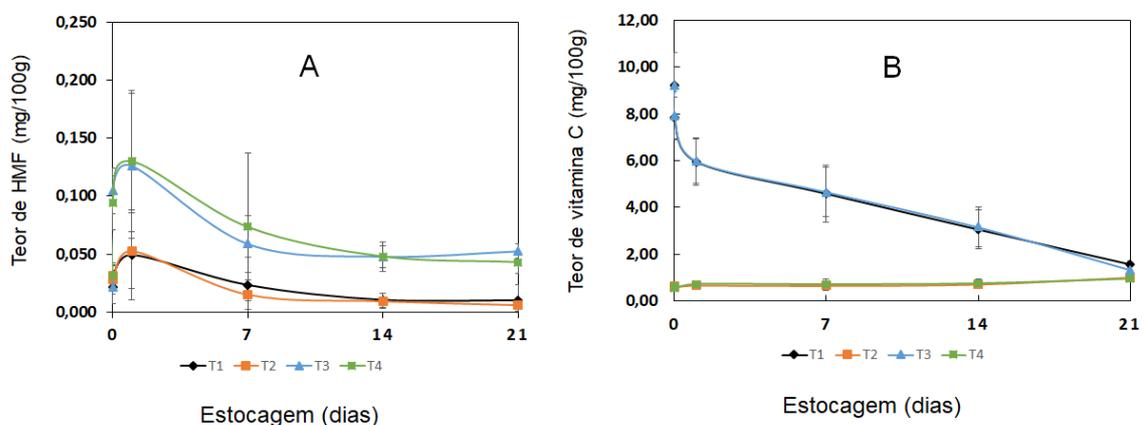
Tratamento	DT(%)	D1(%)	D7(%)	D14(%)	D21(%)
T1	15,1	35,4	50,4	66,9	78,6
T3	14,1	34,1	49,5	65,6	76,0
Média	14,6	34,8	49,9	66,3	77,3

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Os tratamentos T2 e T4 não sofreram adição de vitamina C e os valores detectados são referentes a vitamina C presente naturalmente no leite, no qual ela é encontrada em pequenas quantidades. Os valores não apresentaram diferenças estatísticas significativas durante os tempos avaliados.

A representação gráfica dos teores de HMF e vitamina C são mostrados no Gráfico 3. No gráfico A é possível observar a forte relação entre a formação de HMF e o tempo de tratamento térmico, as linhas referentes aos tratamentos T3 e T4 demonstram maior conteúdo deste marcador durante todo período avaliado. Através das barras de erro é possível concluir que a presença da vitamina C, nos tratamentos T1 e T3, não afetou a formação de HMF. No gráfico B, podemos observar a perda gradual e constante da vitamina C em T1 e T3, não havendo diferença entre os tratamentos térmicos aplicados.

Gráfico 3 - Representação gráficas das variações de conteúdo de HMF (A) e vitamina C (B) durante o *shelf life*. Sendo T1 iogurte com 0,012% vitamina C; T2 iogurte controle, ambos tratados 90 °C por 5 minutos; T3 iogurte com 0,012% vitamina C; T4 iogurte controle, ambos tratados 90 °C por 2h e 43 minutos.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Em trabalho realizado com amostras de morangos desidratados, o conteúdo de vitamina C e de indicadores iniciais da RM (2-furoilmetilaminoácidos- 2-FM-AA) foi avaliado em diferentes condições de processamento. Foi observado a redução do conteúdo de vitamina C e aumento na formação destes indicadores da RM (GAMBOA-SANTOS; MEGIAS-PEREZ; SORIA; OLANO *et al.*, 2014). Em suco de laranja, o teor de HMF foi relatado como indicativo da degradação de ácido ascórbico. O teor inicial da vitamina C reduziu conforme condições de armazenamento, temperatura e tempo, e o conteúdo de furfurais aumentou (RANDHAWA; JAVED; AHMAD; AMJAD *et al.*, 2020). Apesar do suco de laranja e o iogurte terem pH menor que 7, o que favoreceria a mesma rota intermediária na RM, nos tratamentos avaliados neste trabalho não foi possível estabelecer uma correlação entre a vitamina C e furfurais. A diferente composição com relação ao conteúdo de proteínas, aminoácidos e açúcares, entre suco e o iogurte, provavelmente favoreceu diferentes caminhos na reação de Maillard e formação de diferentes compostos.

3.4.5 Avaliação dos parâmetros de cor - CIE-LAB

A cor dos alimentos é um dos primeiros atributos de qualidade avaliados pelos consumidores, sendo fundamental para aceitação do produto. A aparência do alimento, manifestada em relação à sua cor, pode ser determinante na aceitação ou não do produto pelo comprador (PATHARE; OPARA; AL-SAID, 2012). Os parâmetros de cor podem ser correlacionados com outras propriedades físico-químicas. Em função disto e da rapidez e simplicidade, esta técnica tem sido utilizada como medida indireta de atributos de qualidade em alimentos, como sabor, conteúdo de pigmentos e cor (BADIN; QUEVEDO-LEON; IBARZ; RIBOTTA *et al.*, 2021). As especificações de padrões de observação para uso em colorimetria e fotometria são todas providas pela CIE (*Commission International de l'Eclairage*). O sistema CIE define cor baseado em três elementos: a luminosidade ou claridade, a tonalidade e a saturação ou cromaticidade (CIE, 2023).

Como representado a seguir na Tabela 14, o valor de L* que se refere a luminosidade da amostra, apresenta diferenças estatisticamente significativas para os tratamentos T1, T2, T3 e T4 entre a medida DT (depois do tratamento térmico) e o tempos D1, D7, D14 e D21, indicando a influência do tratamento térmico e da fermentação neste parâmetro. Os iogurtes não apresentaram diferenças significativas

em um mesmo tempo de análise. Sugerindo que este parâmetro foi afetado de maneira similar para os dois tratamentos térmicos, tendo pouca influência a presença da vitamina C. O mesmo comportamento de L^* foi observado para coordenada cromática a^* (-a = verde, +a = vermelho). Com relação ao parâmetro b^* (azul (-) ao amarelo (+)) diferenças estatisticamente significativas foram observadas em função do tratamento térmico. Por exemplo, em DT os parâmetros observados para T1 e T2 são semelhantes entre si, porém diferentes de T3 e T4, sugerindo que o tempo do tratamento térmico teve influência direta nesta coordenada cromática.

As coordenadas de cor L^* , a^* e b^* são coordenadas que podem ser utilizadas para cálculos de outros parâmetros que auxiliam na interpretação dos resultados obtidos nos ensaios de colorimetria, como índice de escurecimento ou *browning index* (BI) e o croma. O Croma é usado para determinar o grau de diferença de uma tonalidade, quanto maiores os valores de croma, maior é a intensidade da cor das amostras. O BI é um dos indicadores mais utilizados em produtos alimentícios que contém açúcar, ele indica mudanças na cor com relação ao escurecimento, sendo definido como a pureza da cor marrom (PATHARE; OPARA; AL-SAID, 2012). Através dos dados apresentados na Tabela 14 é possível observar a correlação destes dois parâmetros, BI e Croma, com o tratamento térmico aplicado nas amostras. Avaliando a estatística aplicada em cada tempo de análise, depois do tratamento térmico (DT), as amostras T1 e T2 (5min/ 90 °C) se relacionam estatisticamente de maneira semelhante, porém são significativamente diferentes de T3 e T4 (2 horas e 43min/ 90 °C).

Bandin *et al.* (2021) descreve a relação entre o aquecimento e os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* , em amostras de tomates triturados, através da medição de cor utilizando o instrumento Konica Minolta CR-400. Foram observados resultados adversos nas coordenadas colorimétricas a^* , b^* e L^* , segundo os autores a mudança de cor pode ser associada pela degradação dos carotenoides, escurecimento não enzimático ou reações de Maillard. A análise de cor foi avaliada também em leite e iogurte cozidos, produtos que sofreram a adição de glicose 5% (m/m) e passaram por cozimento prolongado em alta temperatura (98 °C por 210min), com o objetivo de aumentar a formação de uma cor acastanhada. A estes, foram adicionados resveratrol, com a intenção de inibir a formação de produtos finais de glicação avançada. Como resultados de cor foram observados para o iogurte cozido L^* de $93,59 \pm 0,54$ a $95,28 \pm 0,61$; a^* $9,08 \pm 0,03$ a $9,21 \pm 0,04$, b^* $14,08 \pm 0,22$ a $14,51 \pm$

0,16 e BI $62,87 \pm 0,07$ a $63,14 \pm 0,02$ (YU; ZHONG; GUO; XIE *et al.*, 2020). Em amostras de proteína de soro de leite (WPC), utilizado em uma fórmula infantil, foram encontrados valores de $-2,41 \pm 0,13$ para a^* e $-2,92 \pm 0,41$ para b^* (LUND; BECHSHOFT; RAY; LUND, 2022).

Tabela 14 - Parâmetros de cor avaliados durante o *shelf life*. T1 iogurte com 0,012% vitamina C; T2 iogurte controle, ambos tratados 90 °C por 5 minutos; T3 iogurte com 0,012% vitamina C; T4 iogurte controle, ambos tratados a 90 °C por 2h e 43 minutos

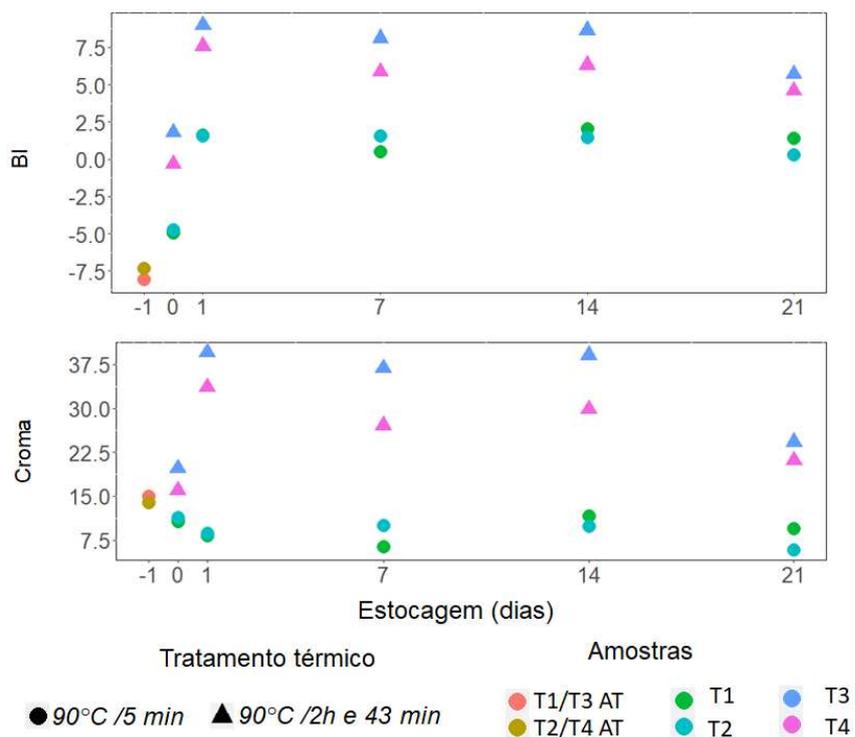
Leitura	Tempo	T1*	T2	T3	T4
L*	AT	$77,64 \pm 2,30^{Ca}$	$79,67 \pm 2,35^{Ba}$	$77,64 \pm 2,30^{Ca}$	$79,67 \pm 2,35^{Ba}$
	DT	$80,36 \pm 1,31^{BCa}$	$80,30 \pm 1,59^{Ba}$	$78,72 \pm 1,83^{BCa}$	$78,23 \pm 2,53^{Ba}$
	D1	$83,07 \pm 2,38^{ABa}$	$83,92 \pm 1,76^{ABa}$	$82,20 \pm 2,48^{Aa}$	$83,76 \pm 0,68^{Aa}$
	D7	$81,68 \pm 3,04^{ABa}$	$83,57 \pm 2,58^{Aa}$	$81,21 \pm 3,42^{ABa}$	$82,45 \pm 2,14^{Aa}$
	D14	$84,24 \pm 0,50^{Aa}$	$84,30 \pm 1,15^{Aa}$	$82,30 \pm 1,57^{Aab}$	$83,45 \pm 1,41^{Ab}$
	D21	$82,30 \pm 3,29^{ABa}$	$83,55 \pm 0,70^{Aa}$	$81,44 \pm 2,01^{ABa}$	$82,03 \pm 2,97^{Aa}$
a^*	AT	$-4,57 \pm 0,38^{Ba}$	$-4,35 \pm 0,34^{Ba}$	$-4,57 \pm 0,38^{Da}$	$-4,35 \pm 0,34^{Ca}$
	DT	$-4,37 \pm 0,20^{Bab}$	$-4,55 \pm 0,25^{Bb}$	$-4,22 \pm 0,16^{Ca}$	$-4,47 \pm 0,23^{Cab}$
	D1	$-2,30 \pm 0,73^{Aa}$	$-2,45 \pm 0,70^{Aa}$	$-1,78 \pm 0,21^{Aa}$	$-2,01 \pm 0,34^{Aa}$
	D7	$-2,42 \pm 0,41^{Aab}$	$-2,64 \pm 0,41^{Ab}$	$-2,12 \pm 0,26^{ABa}$	$-2,57 \pm 0,19^{Bab}$
	D14	$-2,87 \pm 0,13^{Ac}$	$-2,91 \pm 0,16^{Ac}$	$-2,35 \pm 0,11^{Bb}$	$-2,69 \pm 0,08^{Bb}$
	D21	$-2,87 \pm 0,59^{Aa}$	$-2,91 \pm 0,41^{Aa}$	$-2,35 \pm 0,16^{Ba}$	$-2,69 \pm 0,31^{Ba}$
b^*	AT	$-2,50 \pm 1,53^{Ba}$	$3,38 \pm 1,19^{Ba}$	$-2,50 \pm 1,53^{Ca}$	$3,38 \pm 1,19^{Ca}$
	DT	$-0,98 \pm 1,24^{Ba}$	$-1,31 \pm 1,34^{Ca}$	$3,84 \pm 2,10^{Bb}$	$2,50 \pm 2,80^{Bb}$
	D1	$2,75 \pm 1,84^{Aa}$	$3,01 \pm 1,66^{Aa}$	$7,97 \pm 2,69^{Ab}$	$8,11 \pm 1,62^{Ab}$
	D7	$2,00 \pm 1,99^{Ac}$	$2,63 \pm 1,83^{Abc}$	$7,04 \pm 3,40^{ABa}$	$5,85 \pm 2,55^{Aab}$
	D14	$3,78 \pm 0,72^{Aa}$	$3,17 \pm 0,59^{Aa}$	$8,48 \pm 0,90^{Ab}$	$7,19 \pm 1,44^{Ab}$
	D21	$2,72 \pm 2,70^{Aa}$	$2,25 \pm 1,23^{Aa}$	$6,60 \pm 3,51^{ABb}$	$5,45 \pm 2,58^{ABab}$
BI (<i>brownin g index</i>)	AT	$-7,33 \pm 1,89^{Ca}$	$-2,24 \pm 1,30^{Ca}$	$-7,33 \pm 1,89^{Ba}$	$-8,24 \pm 1,30^{Ca}$
	DT	$-5,12 \pm 1,37^{Ba}$	$-5,49 \pm 1,45^{Ba}$	$0,91 \pm 2,76^{Ab}$	$-1,06 \pm 3,34^{Ab}$
	D1	$1,25 \pm 1,56^{Aa}$	$1,43 \pm 1,36^{Aa}$	$8,30 \pm 3,11^{Bb}$	$8,15 \pm 1,84^{Cb}$
	D7	$0,23 \pm 2,07^{Aa}$	$0,78 \pm 1,82^{Aab}$	$6,83 \pm 4,34^{ABc}$	$4,85 \pm 3,01^{ABbc}$
	D14	$1,98 \pm 0,77^{Ac}$	$1,20 \pm 0,57^{Ac}$	$7,11 \pm 3,88^{Ba}$	$6,38 \pm 1,77^{CBb}$
	D21	$0,97 \pm 2,77^{Ab}$	$0,37 \pm 1,11^{Ab}$	$6,10 \pm 4,48^{ABa}$	$4,31 \pm 2,99^{ABab}$
Croma	AT	$14,63 \pm 2,85^{Aa}$	$15,84 \pm 2,83^{Aa}$	$14,63 \pm 2,85^{Ba}$	$15,84 \pm 2,83^{Ba}$
	DT	$10,72 \pm 0,93^{ABc}$	$11,82 \pm 0,96^{ABbc}$	$18,21 \pm 6,03^{ABa}$	$16,20 \pm 4,60^{Bab}$
	D1	$8,13 \pm 6,45^{ABa}$	$8,94 \pm 6,57^{Ba}$	$36,56 \pm 20,48^{ABb}$	$36,09 \pm 13,77^{Ab}$
	D7	$6,72 \pm 4,63^{Bb}$	$8,45 \pm 4,78^{Bb}$	$32,10 \pm 14,45^{Aa}$	$23,26 \pm 10,03^{ABab}$
	D14	$11,51 \pm 6,45^{ABc}$	$9,42 \pm 2,39^{Bc}$	$34,53 \pm 10,80^{ABa}$	$30,38 \pm 6,19^{ABb}$
	D21	$10,27 \pm 6,45^{ABb}$	$6,72 \pm 4,78^{Bb}$	$29,93 \pm 14,45^{ABa}$	$21,26 \pm 12,37^{ABab}$

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Sendo: (AT) antes do tratamento térmico; (DT) depois do tratamento térmico. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma coluna e médias seguidas da mesma letra minúscula da linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O Gráfico 4 representa os valores médios dos parâmetros de colorimetria, BI e croma, em função do tempo, agrupados por tratamento térmico e *amostra*. No eixo X os pontos em -1 representam os controles, com e sem adição de vitamina C antes do tratamento térmico, os demais pontos no mesmo eixo representam as amostras após serem tratadas termicamente e durante o *shelf life*. É possível observar para amostra T3, que o tratamento térmico de 2h e 43min combinado com a adição de vitamina C teve maior participação nas alterações de cor, conforme os índices BI e croma.

Gráfico 4 - Representação gráfica do comportamento pontual dos parâmetros de browning index e croma durante o *shelf life* para T1 iogurte com 0,012% vitamina C; T2 iogurte controle, ambos tratados 90 °C por 5 minutos; T3 iogurte com 0,012% vitamina C; T4 iogurte controle, ambos tratados termicamente a 90 °C por 2h e 43 minutos



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Foi aplicado análise de variância de múltiplos fatores (ANOVA) aos parâmetros BI e croma, com o objetivo de esclarecer qual fator tem maior relação com os resultados observados. Foram consideradas três situações variáveis, sendo elas: tempo de estocagem, tratamento térmico aplicado e a presença de vitamina C. Sendo

que, quando $p < 0,05$ o impacto da variável é relevante. Os dados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Tabela com valores de probabilidade ($>F$) da análise de variância com múltiplos fatores independentes (ANOVA) para os parâmetros de colorimetria e BI

Parâmetro	Tempo estocagem	Tratamento térmico	Presença da vitamina C
BI	<2e-16 ***	<2e-16 ***	0.0124 *
Croma	0.0055 **	<2e-16 ***	0.0901 .

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Nota: Legenda: 0 '****' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Os dados da Tabela 15 indicam que o BI tem forte correlação com a aplicação do tratamento térmico e o tempo de estocagem, em relação à presença de vitamina C existe uma dependência, porém menos significativa. No que se refere a diferença de tonalidade, indicada pelo índice de croma, o tratamento térmico teve a maior influência, seguido do tempo de estocagem. A presença da vitamina C não foi significativa para este parâmetro, conforme a estatística utilizada.

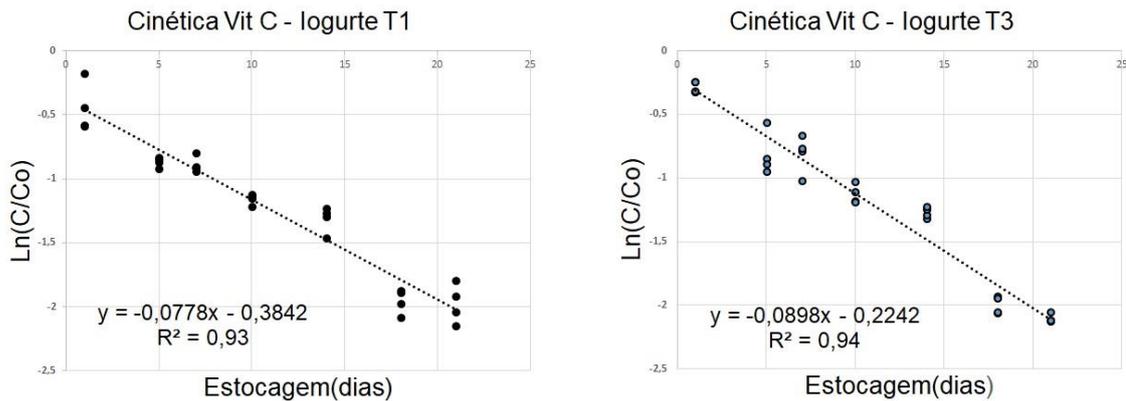
3.4.6 Cinética de degradação da vitamina C em iogurtes

Conhecer a cinética de degradação da vitamina C conforme as condições de processamento do produto é uma importante estratégia para prever o teor desta vitamina durante a estocagem. Com esta informação é possível adequar o valor para fins de rotulagem e optar por processos que minimizem as perdas de qualidade (GABAS; TELIS-ROMERO; MENEGALLI, 2003).

No Gráfico 5 estão representados os gráficos referentes a cinética de degradação da vitamina C nos iogurtes T1 e T3. Foram avaliados 7 tempos de análise, sendo eles 1,5,7,10,14,18 e 21 dias após a de produção, os resultados mostraram que o teor de vitamina C diminuiu com tempo, em ambos os tratamentos térmicos. A degradação da vitamina C seguiu uma cinética de primeira ordem, apresentando coeficientes de correlação (r) e determinação (R^2) maiores que 0,9 e coeficiente angular (K) próximo de zero, mostrados na Tabela 16. Tais parâmetros são

indicativos de uma boa adequação ao modelo cinético (BADIN; QUEVEDO-LEON; IBARZ; RIBOTTA *et al.*, 2021).

Gráfico 5 - Gráfico de $\ln(C/C_0)$ x Tempo de Estocagem para os tratamentos T1 iogurte com 0,012% vitamina C tratado a 90 °C por 5 minutos e T3 iogurte com 0,012% vitamina C tratado a 90 °C por 2h e 43 minutos



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Tabela 16 - Dados obtidos através da construção do modelo matemático para degradação da vitamina C em iogurtes

Trat.	K	R ²	r	ERM (%)	Equação
T1*	-0,0778	0,93	-0,97	10,4	$C = C_0 \times e^{(-0,0778.t)}$
T3	-0,0898	0,94	-0,97	11,4	$C = C_0 \times e^{(-0,0898.t)}$

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

*T1 iogurte com 0,012% vitamina C tratado a 90 °C por 5 minutos e T3 iogurte com 0,012% vitamina C tratado a 90 °C por 2h e 43 minutos. ERM: Erro relativo médio.

A partir do modelo matemático aplicado foi possível obter para cada processo de fabricação dos iogurtes uma equação que estima o conteúdo de vitamina C em qualquer tempo de armazenamento, estas equações estão descritas na Tabela 16. Através das equações foram calculados os valores teóricos do teor de vitamina C, nos mesmos tempos em que estes teores foram determinados de maneira experimental. A Tabela 17 apresenta estes dados, seguido da porcentagem de erro relativo entre o valor teórico e experimental. Os dados demonstram que o modelo matemático pode ser aplicado para estimar o conteúdo de vitamina C em iogurtes durante a estocagem com uma margem de erro máxima de 31%. Este erro relativo pode ser justificado pela

complexidade da matriz, na equação desenvolvida consideramos apenas a degradação da vitamina C, porém no iogurte outros constituintes podem interferir nesta taxa de degradação. Ainda assim, é possível aplicar o modelo matemático como uma ferramenta de auxílio no controle de qualidade dos produtos durante a estocagem. A partir dele é possível obter um valor aproximado da perda de conteúdo de vitamina C, e quando viável, estabelecer o quanto pode ser dosado no produto para compensar a perda já prevista.

Tabela 17 - Comparação entre a determinação do teor de vitamina C obtido de maneira de experimental com o valor teórico obtido pelo modelo matemático

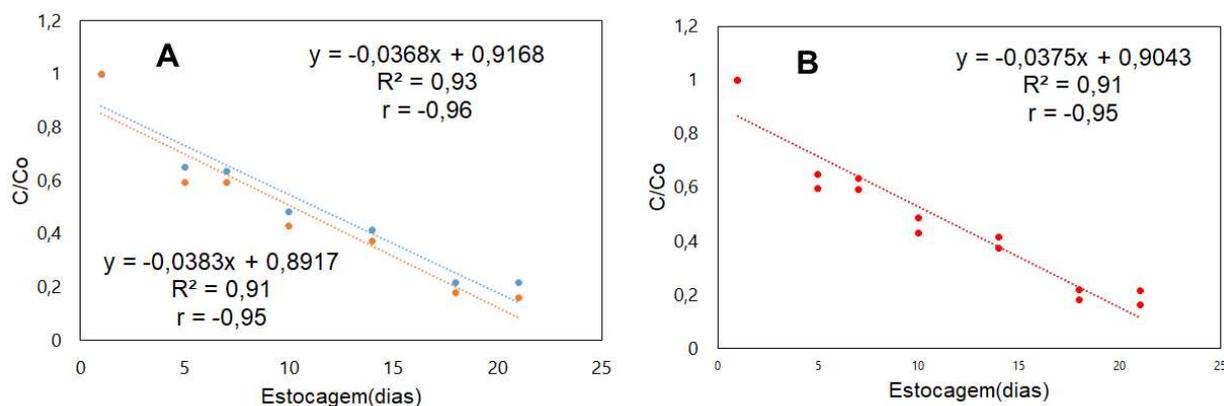
Tratamento	tempo	C calculado (teórico)	C medido (Experimental.)	Erro relativo (%)
T1	1	5,10	5,51	8,17
	5	3,73	3,57	4,28
	7	3,20	3,50	9,40
	10	2,53	2,67	5,59
	14	1,85	2,29	23,48
	18	1,36	1,21	11,03
	21	1,08	1,19	10,89
T3	1	5,87	6,42	9,35
	5	4,10	3,82	6,86
	7	3,42	3,81	11,26
	10	2,62	2,76	5,60
	14	1,83	2,39	31,04
	18	1,28	1,16	9,02
	21	0,97	1,04	6,71

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Sendo: T1 iogurte com 0,012% vitamina C tratado a 90 °C por 5 minutos e T3 iogurte com 0,012% vitamina C tratado a 90 °C por 2h e 43 minutos.

O efeito do tratamento térmico foi avaliado através dos gráficos representados no Gráfico 6. Foi realizada análise de covariância entre os coeficientes angulares demonstrados na Gráfico 6A. Este parâmetro não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) entre tratamentos a 90 °C por 5 minutos (T1) e 90 °C por 2 horas e 43min (T3). Por serem estatisticamente similares, as médias dos teores de vitamina C nos tratamentos T1 e T3 podem ser representadas graficamente por uma única equação, conforme Gráfico 6B.

Gráfico 6 - Efeito do tratamento térmico na degradação da vitamina C. Em (A) curva de degradação para T1 e T3 isoladamente e em (B) curva de degradação dos dados combinados de T1+T3



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Outros trabalhos avaliaram a cinética de degradação da vitamina C como uma reação de primeira ordem. Amostras de tomates triturados submetidos a diferentes temperaturas (BADIN; QUEVEDO-LEON; IBARZ; RIBOTTA *et al.*, 2021), ameixas desidratadas submetidas a diferentes condições de temperatura e umidade relativa (GABAS; TELIS-ROMERO; MENEGALLI, 2003) e morangos sob processo de secagem (GAMBOA-SANTOS; MEGIAS-PEREZ; SORIA; OLANO *et al.*, 2014), em todos estes casos a degradação da vitamina C seguiu como primeira ordem.

3.5 CONSIDERAÇÕES

Os resultados deste capítulo demonstraram que o método validado satisfaz o objetivo principal de quantificar a vitamina C na matriz do iogurte, obtendo boa sensibilidade, avaliada através dos limites de detecção e quantificação, e também pode ser considerado preciso e exato. O método aplicado para análise dos marcadores da RM também atendeu ao objetivo, foi possível identificar dois componentes, HMF e F, em baixas concentrações e em diferentes tempos de análise. Quanto a estabilidade da vitamina C, esta se mostrou extremamente sensível aos dois tratamentos térmicos aplicados e ao período de estocagem. Nos tratamentos em que houve adição deste bioativo foi observada perda de aproximadamente 77% ao final de 21 dias de análise. Através dos ensaios de colorimetria, foi possível concluir que a vitamina C pode ser relacionada a fenômenos de escurecimento, porém, sua

participação ocorre através das próprias vias de degradação, não havendo dados que comprovem sua influência na formação dos indicadores da reação de Maillard. Já que não foi observado uma relação direta entre a perda de vitamina C e aumento da concentração de HMF, F, FMC e MF. A amplificação do fenômeno de escurecimento pela via Maillard mostrou-se fortemente relacionada ao tratamento térmico aplicado, as amostras T3 e T4 que foram submetidos ao maior tempo na temperatura de 90 °C apresentaram os maiores conteúdos de HMF. Foi possível desenvolver um modelo matemático que estima o conteúdo de vitamina C em diferentes pontos do *shelf life* para os iogurtes produzidos neste estudo. Assim, o desenho do modelo pode ser aplicado a outras linhas de produção de iogurtes adicionados de vitamina C, com o intuito de identificar possíveis perdas durante o armazenamento e buscar estratégias para manter a qualidade final dos produtos.

4. INFLUÊNCIA DE CELULOSE MICRO E NANOFIBRILADA NA PRODUÇÃO E ESTOCAGEM DE IOGURTES

Este segundo capítulo avalia a capacidade das fibras microfibrilada, nanofibrilada e nanofibrilada tratada de forma enzimática em modular as características físico-químicas durante a produção e estocagem dos iogurtes.

4.1 REFERENCIAL TEÓRICO

Iogurte é um produto lácteo fermentado a partir de culturas iniciadoras de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, possui excelente valor nutricional, é considerado um alimento que integra uma alimentação saudável. (MARY; MUTTURI; KAPOOR, 2022). Assim como outros alimentos fermentados, sofreu um aumento de 4% em sua produção entre 1995 e 2019. A popularidade destes alimentos está em constante aumento devido aos benefícios oferecidos à saúde. A adição de fibras pode contribuir de maneira positiva com propriedades dos iogurtes, como a capacidade de retenção de água e melhorar as propriedades texturais (HASHIM; KHALIL; AFIFI, 2009).

Nanofibras podem ser uma alternativa interessante para as tradicionais fibras de celulose, mantendo as mesmas propriedades, porém reforçando a reologia, área de superfície e relação de aspecto (NECHYPORCHUK; BELGACEM; BRAS, 2016). Para produzir nanofibras de celulose (CNF) é necessário um grande cisalhamento mecânico por sistemas de alta pressão ou ultra-refinador de disco (SPENCE; VENDITTI; ROJAS; HABIBI *et al.*, 2011), exigindo uma elevada entrada de energia. Especialmente em sistemas de alta pressão, o entupimento do equipamento é uma questão recorrente. O tratamento químico foi proposto para resolver estes problemas, por exemplo, oxidação por TEMPO (SAITO; HIROTA; TAMURA; KIMURA *et al.*, 2015). No entanto, é bem conhecido que alguns produtos químicos e co-produtos podem ser tóxicos, limitando a aplicação final do CNF obtido por produtos químicos. A aplicação de enzimas é uma alternativa substituta aos tratamentos químicos, são moléculas bioquímicas seguras e não produzem co-produtos de risco biológico (ARANTES; DIAS; BERTO; PEREIRA *et al.*, 2020). As CNFs obtidas por via enzimática mostraram grandes propriedades, por exemplo, estabilidade térmica elevada, reologia, transmitância e também reduziram a energia de incorporação

(BERTO; MATTOS; ROJAS; ARANTES, 2021; NECHYPORCHUK; PIGNON; BELGACEM, 2015; ZHOU; ST. JOHN; ZHU, 2019).

Para o iogurte, vale ressaltar a importância do controle dos parâmetros físico-químicos, pH e acidez são aspectos críticos, pois tem importante contribuição para sua coagulação, desenvolvimento dos microrganismos e vida útil (BOUKRIA; HADRAMI; SAMEEN; SAHAR *et al.*, 2020). Com base nas considerações apresentadas, este estudo busca avaliar o efeito da adição de fibras de celulose vegetal microfibrilada e nanofibrilada nas características tecno-funcionais dos iogurtes.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Nas seções seguintes serão apresentados o esquema de produção dos iogurtes adicionados de fibras de celulose, seguido das técnicas utilizadas para avaliar suas características físico-químicas.

4.2.1 Obtenção das nanofibras e microfibras de celulose vegetal

As suspensões coloidais de celulose vegetal foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório de Bioprodutos e Nanobiotecnologia, na Escola de Engenharia de Lorena (Universidade de São Paulo). Três CNFs diferentes foram produzidas por estratégias diferentes, utilizando pasta kraft branqueada de eucalipto como substrato inicial: (i) celulose nanofibrilada (CNF) e (ii) celulose microfibrilada (CMF) foram isoladas exclusivamente por desfibrilação mecânica utilizando ultra-refinador de disco (Berto *et al.*, 2019), e (iii) celulose nanofibrilada pós tratada enzimaticamente (Enzy-CNF) foi uma combinação de desfibrilação mecânica e pós-tratamento enzimático da CNF. A enzima aplicada foi uma endoglucanase comercial (FiberCare®), utilizando 50 EGU/g, em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6, 1% do substrato (bases secas), 3 h de reação, a 50 °C em rotação orbital (250 rpm). Para inativar a enzima, a mistura de reação foi fervida num banho de água durante 30 min.

4.2.2 Formulação dos iogurtes adicionados de suspensão coloidal de celulose vegetal

O leite integral pasteurizado obtido no comércio local de Juiz de Fora - MG a marca Da Fazenda® foi adicionado de suspensão coloidal de celulose vegetal,

presentes nas formas microfibrilada, nanofibrilada e nanofibrilada tratada, imagens das fibras e características físico-químicas como pH e conteúdo de água estão apresentados respectivamente na Figura 6 e Tabela 18.

Figura 6 - Imagens das fibras: Sendo em (A) suspensão coloidal de celulose vegetal microfibrilada - CMF, (B) suspensão coloidal de celulose vegetal nanofibrilada – CNF, (C) suspensão coloidal de celulose vegetal nanofibrilada pós-tratada - Enzy-CNF



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Tabela 18 - Conteúdo de água e pH das suspensões coloidais de celulose vegetal

Fibras	Umidade (%)	Teor de sólidos (%)	pH
CMF	98,80 ± 0,01	1,2 ± 0,01	6,28 ± 0,04
CNF	98,88 ± 0,04	1,2 ± 0,04	6,11 ± 0,03
Enzy-CNF	98,74 ± 0,13	1,29 ± 0,13	5,42 ± 0,11

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Com estas fibras foram preparadas 4 formulações, sendo elas: T1= 9% m/m sacarose, 81% m/m leite e 10% m/m água (controle); T2 = 9% m/m sacarose, 81% m/m leite e 10% CMF; T3= 9% m/m sacarose, 81% m/m leite e 10% m/m CNF e T4= 9% m/m sacarose, 81% m/m leite e 10% m/m Enzy-CNF, conforme descritas na Tabela 19. Na formulação do iogurte controle foi adicionada água na mesma proporção em que foi adicionada às suspensões de celulose vegetal, já que estas apresentaram alto conteúdo de água demonstrado anteriormente na Tabela 18. As formulações foram homogêneas a 200 bar sendo, 50 bar no 2° estágio e 150 bar no 1° estágio, com temperatura de entrada de 80 °C. Posteriormente as misturas passaram por tratamento térmico a uma temperatura de 90 °C por cinco minutos, seguida de resfriamento até 42 °C.

Tabela 19 - Formulação dos iogurtes controle e adicionados as CNFs.

iogurte	Leite (g)	Sacarose (g)	Suspensão coloidal de celulose vegetal (g)	Água (g)
T1*	729	81	0	90
T2	729	81	90	0
T3	729	81	90	0
T4	729	81	90	0

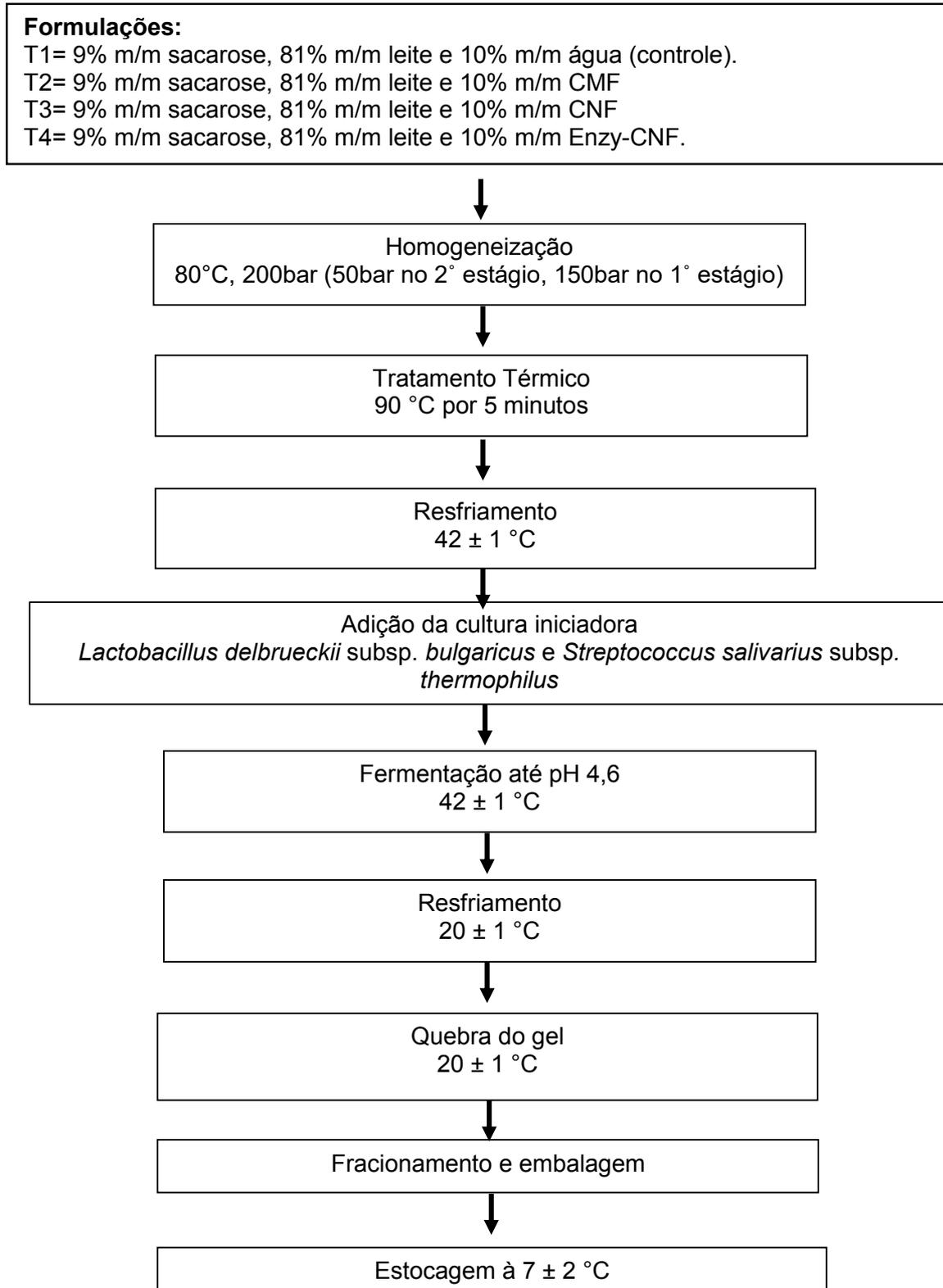
Fonte: Elaborada pela autora (2023)

*T1 iogurte controle, T2 iogurte adicionado de CMF, T3 iogurte adicionado CNF e T4 iogurte adicionado de Enzy-CNF.

4.2.3 Produção dos iogurtes adicionados de suspensão coloidal de celulose vegetal

Iogurtes foram produzidos através da adição de cultura iniciadora contendo *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (YoFlex® Mild 1.0) na concentração de 0,2 U. As amostras foram fermentadas a $42^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ com monitoramento constante dos valores pH em cada tratamento, a fermentação dos leites foi interrompida em pH 4,6. Em seguida as amostras foram resfriadas até $20 \pm 1^{\circ} \text{C}$ em refrigerador $8 \pm 1^{\circ} \text{C}$, após atingir a temperatura de $20 \pm 1^{\circ} \text{C}$ a quebra do gel foi realizada manualmente através de movimentos circulares por 20 segundos, com o auxílio de uma espátula de material plástico. Os iogurtes foram armazenados por 60 dias em temperatura de $7 \pm 2^{\circ} \text{C}$ em recipientes plásticos em volumes aproximados de 100g por embalagem. As amostras foram analisadas após 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de produção, a fim de avaliar as características de pH, acidez titulável, viscosidade relativa, consistência, sinérese, distribuição do tamanho de partículas e microscopia eletrônica de varredura. O experimento consistiu em três produções das formulações para iogurtes e o fluxograma da produção está representado na Fluxograma 1.

Fluxograma 1 - Fluxograma da produção de iogurte



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

4.2.4 Curva de Fermentação

A alteração do pH durante o processo de fermentação foi monitorada utilizando o pHmetro multicanais Consort D130 system. O conteúdo de 900g das formulações foi colocado em cubas com capacidade para 1000 mL, sendo estas adaptadas para uso em banho maria à 42 ± 1 °C. Em cada cuba foi inserido o eletrodo e o pH foi medido a cada minuto, sua determinação foi realizada através do software Acquisition System.

4.2.5 Determinação do pH e acidez titulável em iogurtes

O pH e acidez titulável foram medidos nos dias 1, 7, 15, 30, 45 e 60 após a produção do iogurte, as determinações foram realizadas em duplicatas. O pH foi medido com determinador de pH (PG 1400, GEHAKA®) e acidez titulável pelo método potenciométrico conforme ISO/TS 11869:2012.

4.2.6 Sinérese

A sinérese foi calculada nos dias 1, 7, 15, 30, 45 e 60 após a produção do iogurte, conforme o método descrito por Kieserling *et al.* (2019) com modificações. Amostras de iogurte foram centrifugadas por 15 minutos a 10 ± 2 °C em 428,4g. As medidas foram realizadas em triplicata e a sinérese determinada conforme a equação 13.

$$\text{Sinérese}(\%) = \frac{\text{Massa do sobrenadante (g)}}{\text{Massa da amostra de iogurte}} \times 100 \quad \text{Equação (12)}$$

4.2.7 Viscosidade Aparente e Consistência

As medições de viscosidade foram realizadas em um Viscosímetro Rotativo Microprocessado Q860M21 (Quimis®) utilizando rotor 3 a 35 rpm. As análises foram realizadas em duplicata nos dias 1, 7, 15, 30, 45 e 60 após a produção do iogurte. A determinação da consistência dos iogurtes foi realizada um dia após o preparo em consistômetro de Bostwick. Foi medida distância percorrida por 80 mL das amostras

a temperatura de 10 ± 1 °C, em um intervalo de tempo de 25 segundos, metodologia adaptada de Umbelino *et al.* (2001).

4.2.8 Distribuição do tamanho de partícula

As análises de distribuição do tamanho das partículas para os iogurtes foram realizadas por difração a laser (Beckman Coulter LS 13 320, Miami, FL, EUA) acoplado ao módulo líquido aquoso (Beckman Coulter, Miami, FL, EUA).

4.2.9 Microscopia eletrônica de varredura

A microestrutura das amostras foi analisada em microscópio eletrônico de varredura (Hitachi TM 3000, Hitachi Ltd., Tokyo, Japão). Como preparo de amostra, uma fina camada do iogurte foi aplicada em uma fita adesiva de carbono dupla face fixada sob um *stub*, sendo este em seguida congelado a temperatura de $-60^{\circ} \pm 2$ °C e liofilizado. As análises de microestrutura foram realizadas no período de 60 dias após a produção, o tamanho médio dos poros das amostras de iogurtes foi calculado para as imagens com ampliação de 500x, utilizando para isto o software Image J 1.53e (National Institutes of Health, USA).

4.2.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas em um nível de significância de 0,05 através do teste Tukey aplicado com auxílio do Software R[®] versão 4.1.2 (The R Foudation for Statistical Computing). Os testes de correlação foram aplicados para avaliar a relação entre os resultados obtidos de pH, acidez titulável, sinérese, consistência, viscosidade aparente e distribuição do tamanho de partículas.

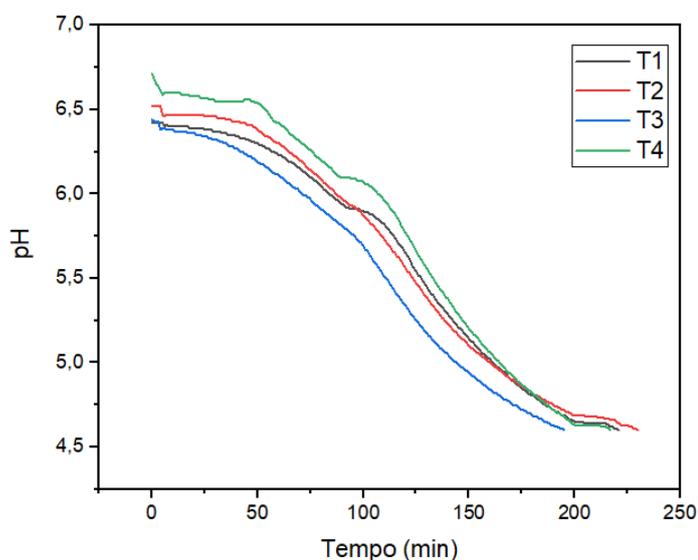
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nas seções seguintes serão discutidos os resultados referentes a produção e estocagem dos iogurtes adicionados de fibras de celulose.

4.3.1 Curva de fermentação dos iogurtes produzidos

Durante a fermentação láctica ocorre a diminuição do pH em função da produção de ácido láctico a partir da lactose, pela atuação da cultura leiteira iniciadora (GOMES; CARNEIRO; STEPHANI; CARVALHO *et al.*, 2022). A medida que se aproxima do ponto isoelétrico da caseína em pH 4,5, ocorre a dissolução do fosfato de cálcio coloidal e a carga resultante na superfície das micelas de caseínas chega a zero, resultando na formação de uma rede tridimensional composta pelas proteínas do leite. A taxa de acidificação é um fator que precisa ser considerado, principalmente em iogurtes fortificados com fibras alimentares (MARY; MUTTURI; KAPOOR, 2022). As curvas de fermentações dos iogurtes adicionados de suspensão coloidal de celulose vegetal e o iogurte controle apresentaram perfis semelhantes, conforme demonstrado na Gráfico 7. As formulações T1, T2 e T4 apresentaram tempos de fermentação distintos, porém não significativos estatisticamente ($p>0,05$).

Gráfico 7 - Acidificação durante a fermentação do iogurte controle (T1), iogurte adicionado de CMF (T2), iogurte adicionado CNF (T3) e iogurte adicionado de Enzy-CNF (T4)



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

O pH inicial para os quatro tratamentos não apresentou diferença significativa entre as formulações, o pH de 4,6 foi utilizado como indicativo para a finalização do

processo de fermentação, o tempo de duração variou de 195 a 221 minutos, conforme Tabela 20.

Tabela 20 - Tempo final de fermentação e variação do pH entre início e fim da fermentação (Δ pH)

Tratamento	T1*	T2	T3	T4
Tempo final (min)	221	230	195	217
Δ pH	1,82	1,92	1,87	2,11

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

*T1 iogurte controle, T2 iogurte adicionado CMF, T3 iogurte adicionado de CNF e T4 iogurte adicionado de Enzy-CNF.

A variação do pH entre o início e fim da fermentação traz informações quanto ao processo de formação do gel. A presença das fibras de celulose levou a diferentes valores de Δ pH, possivelmente afetando a velocidade da reação de acidificação e formação da estrutura em rede do gel de iogurte.

4.3.2 Avaliação das variações do pH e acidez titulável nos iogurtes

Os iogurtes analisados durante 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) para acidez titulável e pH. Esse comportamento indica que a adição dos diferentes tipos de suspensão coloidal de celulose vegetal não afetou parâmetros de acidez e variação do pH durante o *shelf life*, resultados estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 - Variação dos valores de pH e acidez titulável nos iogurtes durante os dias de estocagem

Propriedades	Dias de estocagem	T1	T2	T3	T4
pH	1	4,42 ± 0,08 ^{Ab}	4,55 ± 0,08 ^{Ab}	4,53 ± 0,13 ^{Aab}	4,41 ± 0,08 ^{Ab}
	7	4,28 ± 0,04 ^{Ba}	4,39 ± 0,04 ^{Ba}	4,41 ± 0,11 ^{Aa}	4,29 ± 0,03 ^{Ba}
	15	4,22 ± 0,02 ^{Bc}	4,34 ± 0,02 ^{BCab}	4,38 ± 0,10 ^{Aa}	4,28 ± 0,03 ^{Bbc}
	30	4,24 ± 0,04 ^{Bb}	4,39 ± 0,05 ^{Ba}	4,36 ± 0,13 ^{Aa}	4,32 ± 0,10 ^{ABab}
	45	4,29 ± 0,07 ^{Ba}	4,36 ± 0,06 ^{Ba}	4,37 ± 0,12 ^{Aa}	4,33 ± 0,09 ^{ABa}
	60	4,23 ± 0,07 ^{Bb}	4,29 ± 0,03 ^{Cab}	4,36 ± 0,14 ^{Aa}	4,26 ± 0,09 ^{Bab}
Acidez titulável (g de ácido lático/100g)	1	0,65 ± 0,03 ^{Aa}	0,61 ± 0,02 ^{Aab}	0,58 ± 0,05 ^{Ab}	0,66 ± 0,02 ^{Aa}
	7	0,69 ± 0,03 ^{Aa}	0,67 ± 0,01 ^{Aab}	0,64 ± 0,04 ^{Ab}	0,68 ± 0,02 ^{Aab}
	15	0,72 ± 0,11 ^{Aa}	0,71 ± 0,11 ^{Aa}	0,67 ± 0,07 ^{Aa}	0,67 ± 0,09 ^{Aa}
	30	0,68 ± 0,05 ^{Aa}	0,65 ± 0,06 ^{Aa}	0,66 ± 0,06 ^{Aa}	0,68 ± 0,06 ^{Aa}
	45	0,66 ± 0,04 ^{Aa}	0,64 ± 0,05 ^{Aa}	0,65 ± 0,04 ^{Aa}	0,66 ± 0,05 ^{Aa}
	60	0,65 ± 0,05 ^{Aa}	0,61 ± 0,03 ^{Aa}	0,62 ± 0,06 ^{Aa}	0,65 ± 0,04 ^{Aa}

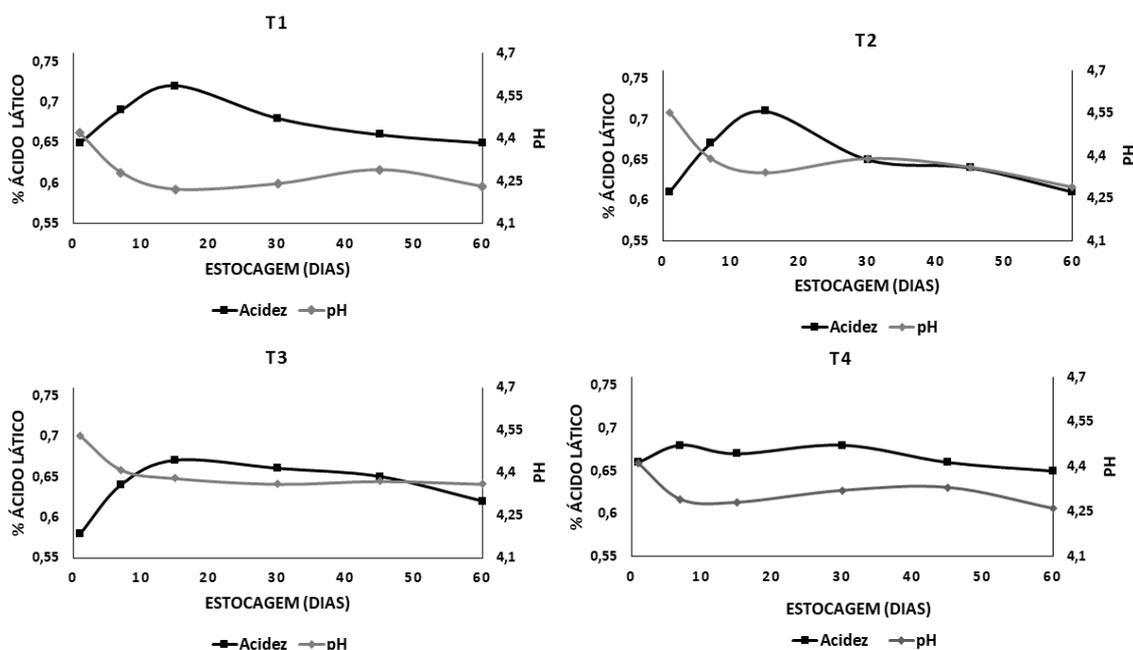
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Sendo: T1 iogurte controle, T2 iogurte adicionado CMF, T3 iogurte adicionado de CNF e T4 iogurte adicionado de Enzy-CNF

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma coluna e médias seguidas da mesma letra minúscula da linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Apesar de não observarmos diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os valores de pH e acidez titulável, no Gráfico 8 é possível observar que até 15 dias há uma variação maior nos valores avaliados. Isto ocorre em função da continuidade de atuação das bactérias lácticas mesmo após a finalização do processo de fermentação. Após este período é possível observar uma estabilização dos valores de pH e acidez.

Gráfico 8 - Desenvolvimento do pH e acidez titulável nos iogurtes durante os dias de estocagem. Sendo T1 iogurte controle, T2 iogurte adicionado CMF, T3 iogurte adicionado de CNF e T4 iogurte adicionado de Enzy-CNF.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

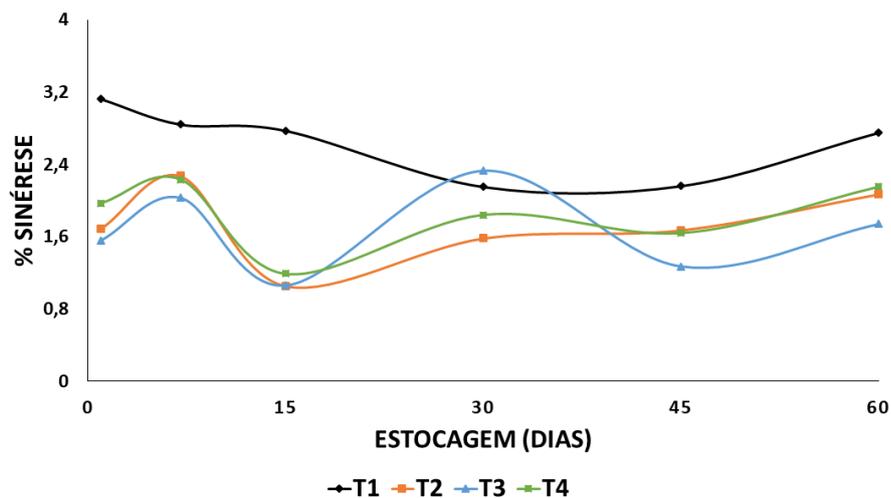
4.3.3 Determinação do efeito de sinérese nos iogurtes

A sinérese é uma característica indesejável que ocorre quando o soro se acumula na superfície do iogurte (DONG; LIAO; XIE; CHEN *et al.*, 2022). Os resultados da sinérese para as amostras de iogurtes após 1,7,15,30,45 e 60 dias de produção estão apresentados a seguir no Gráfico 9. Durante o período avaliado, os iogurtes adicionados de celulose vegetal apresentaram menor sinérese com diferença significativa na avaliação com 15 dias. De maneira geral, os diferentes tratamentos com fibras de celulose diminuíram o efeito de sinérese. Comportamento similar foi observado em iogurtes com adição de diferentes concentrações de fibra de laranja (0,1 e 1%), nos quais a adição das fibras reduziu o efeito de sinérese (KENNETH KIESERLING; TUYET M. VU; STEPHAN DRUSCH; SCHALOW, 2019). Outro trabalho avaliou a influência da adição de fibra solúvel de cenoura, concluindo que a

incorporação da fibra diminuiu significativamente a sinérese nos iogurtes (DONG; LIAO; XIE; CHEN *et al.*, 2022).

Gráfico 9 - Comportamento da sinérese nos iogurtes durante os dias de estocagem.

Sendo T1 iogurte controle, T2 iogurte adicionado CMF, T3 iogurte adicionado de CNF e T4 iogurte adicionado de Enzy-CNF

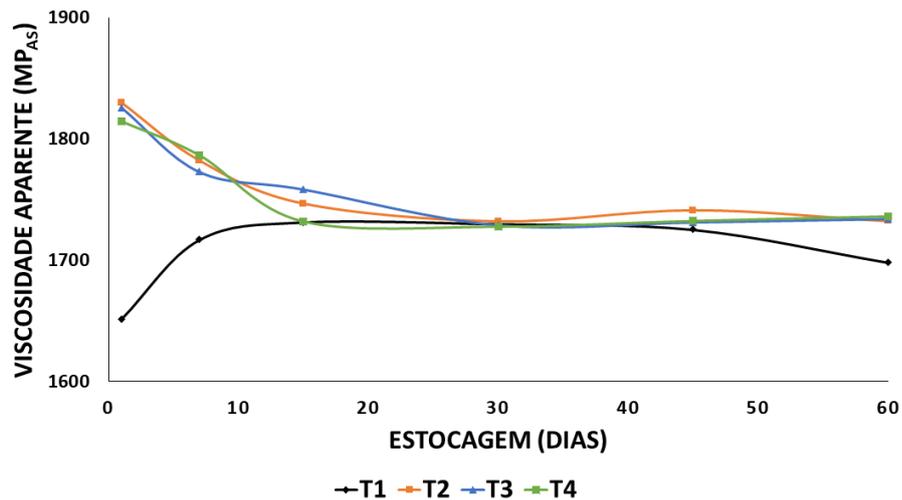


Fonte: Elaborada pela autora (2023).

4.3.4 Avaliação da viscosidade aparente e consistência

As medidas de viscosidade aparente apresentaram valores iniciais maiores para tratamentos que sofreram adição das três suspensões coloidais de celulose vegetal em relação ao tratamento controle T1, como representado no Gráfico 10. A estatística aplicada entre os quatro tratamentos no primeiro dia de produção aponta uma diferença significativa entre os iogurtes com adição de celulose vegetal e o controle. Após 7 dias de produção não há diferenças significativas nos valores de viscosidade aparente para o mesmo tratamento e nem entre os quatro tratamentos.

Gráfico 10 - Resultados de viscosidade aparente para os iogurtes durante os dias de estocagem. Sendo T1 iogurte controle, T2 iogurte adicionado CMF, T3 iogurte adicionado de CNF e T4 iogurte adicionado de Enzy-CNF



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A medida da consistência utilizando consistômetro de Bostwick foi realizada após 1 dia de produção dos iogurtes. O iogurte controle percorreu a maior distância ($11,25 \pm 0,94 \text{ cm} \cdot 25\text{s}^{-1}$), seguido consecutivamente dos iogurtes: T4, T3 e T2 ($9,92 \pm 0,38 \text{ cm} \cdot 25\text{s}^{-1}$; $9,58 \pm 0,49 \text{ cm} \cdot 25\text{s}^{-1}$; $9,33 \pm 1,03 \text{ cm} \cdot 25\text{s}^{-1}$). Estes resultados corroboram com o observado nas medidas de viscosidade aparente para o tempo D1. A estatística aplicada mostrou que o espaço percorrido pelo iogurte controle T1 foi significativamente distinto dos demais tratamentos para $p < 0,05$.

4.3.5 Evolução da distribuição do tamanho de partícula

A distribuição do tamanho de partícula foi avaliada durante o *shelf life* dos quatro tratamentos. Para as medidas em Dv10 apresentada na Tabela 22, é possível observar que apenas no tempo inicial o iogurte controle possui resultados em Dv10 estatisticamente diferentes dos resultados nos demais tempos. Para os outros tratamentos em que houve adição da suspensão coloidal de celulose vegetal esta diferença não ocorre. Em Dv90, observando a evolução do tamanho de partícula, é possível notar diferença significativa entre a análise inicial e os demais tempos apenas

para o controle. Indicando que as fibras conferiram uma estabilidade inicial ao tamanho das partículas nos tratamentos T2, T3 e T4. Desta forma, a presença das fibras contribuiu para a formação da estrutura do gel, comparativamente o tratamento T4 foi o que apresentou maior similaridade com o tratamento controle T1 no tempo de 60 dias em Dv90.

Tabela 22 - Evolução do tamanho de partícula nos iogurtes após 1,7,15,30 e 45 dias de produção

Tamanho de partículas	Dias de estocagem	Evolução do tamanho de partícula			
		T1	T2	T3	T4
Dv10 (µm)	1	12,60 ± 1,27 ^{Bab}	12,17 ± 0,62 ^{Aab}	10,82 ± 2,60 ^{Ab}	13,45 ± 2,17 ^{Aa}
	7	13,78 ± 1,05 ^{ABa}	11,80 ± 0,42 ^{Abc}	11,23 ± 1,70 ^{Ac}	13,20 ± 0,92 ^{Aab}
	15	13,41 ± 0,66 ^{ABa}	13,01 ± 1,57 ^{Aa}	12,32 ± 1,71 ^{Aa}	13,33 ± 2,49 ^{Aa}
	30	14,00 ± 0,40 ^{Aa}	12,71 ± 1,11 ^{Aab}	11,97 ± 1,82 ^{Ab}	14,10 ± 0,51 ^{Aa}
	45	13,38 ± 1,25 ^{Aa}	13,42 ± 1,70 ^{Aab}	12,03 ± 1,65 ^{Ab}	14,47 ± 1,10 ^{Aa}
	60	13,95 ± 0,73 ^{Aa}	12,40 ± 2,20 ^{Aab}	12,04 ± 1,31 ^{Ab}	13,39 ± 1,24 ^{Aab}
Dv90 (µm)	1	45,41 ± 4,75 ^{Bb}	57,26 ± 6,48 ^{Aa}	58,22 ± 11,42 ^{Aa}	54,63 ± 7,66 ^{Aab}
	7	48,49 ± 4,51 ^{ABa}	58,06 ± 11,11 ^{ABa}	61,93 ± 15,73 ^{Aa}	54,49 ± 8,98 ^{Aa}
	15	48,19 ± 2,51 ^{ABb}	61,94 ± 7,42 ^{ABa}	61,24 ± 12,60 ^{Aa}	50,94 ± 10,80 ^{Aab}
	30	50,51 ± 3,23 ^{ABb}	61,97 ± 11,50 ^{ABa}	62,52 ± 17,05 ^{Aa}	53,94 ± 9,15 ^{Aa}
	45	50,59 ± 3,52 ^{ABb}	59,05 ± 3,29 ^{ABab}	63,58 ± 16,74 ^{Aa}	53,54 ± 2,54 ^{Aab}
	60	54,49 ± 9,99 ^{Aa}	58,13 ± 4,37 ^{Ba}	64,61 ± 17,33 ^{Aa}	52,85 ± 5,02 ^{Aa}

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

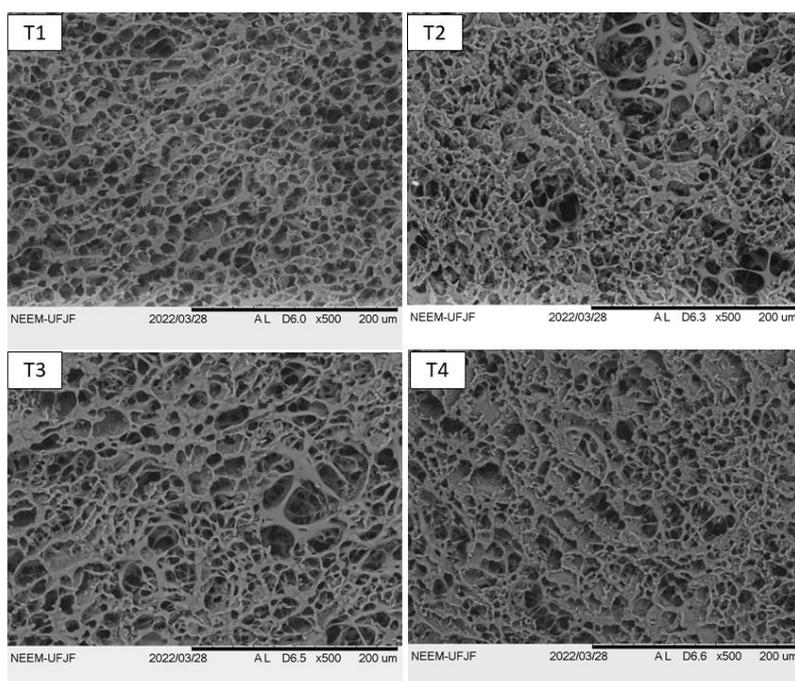
Sendo: T1 iogurte controle, T2 iogurte adicionado CMF, T3 iogurte adicionado de CNF e T4 iogurte adicionado de Enzy-CNF

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma coluna e médias seguidas da mesma letra minúscula da linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.3.6 Microestrutura dos iogurtes

A micrografia dos géis de iogurte, apresentada na Figura 7, demonstra uma rede formada pelas caseínas com poros abertos, uma estrutura típica para iogurtes. A microestrutura do gel de iogurtes também pode ser afetado pela desnaturação da β -lactoglobulina durante a pasteurização, possibilitando a formação de complexos entre essa proteína e a κ -caseína e os glóbulos de gordura que são incorporados à rede proteica (GOMES; OLIVEIRA; RENHE; STEPHANI *et al.*, 2021). Para os tratamentos T2, T3 e T4, nos quais as fibras foram adicionadas, é possível observar uma microestrutura diferente com a formação de uma rede mais heterogênea em comparação com o iogurte controle. Esta formação, com diferentes tamanhos de poros, pode ser relacionada a uma possível interferência das fibras de celulose no processo de formação da rede proteica dos iogurtes T2, T3 e T4. Entre estes tratamentos, o T4 composto pela suspensão coloidal de celulose nanofibrilada-pós tratada, possui o perfil da estrutura de rede proteica mais semelhante ao tratamento T1, controle. A formação de rede tridimensional de agregados de caseína com poros maiores e canais de tamanhos heterogêneos também foi observado em iogurtes adicionados com bagaço de *cranberry*, rico em fibras alimentares (VARNAITE; KERSIENE; SIPAILIENE; KAZERNAVICIUTE *et al.*, 2022). Foi relatado para iogurtes com adição de pó de fibra de cenoura a formação de rede com estrutura aberta e com maiores agregados, enquanto a microestrutura apareceu mais homogênea e sem grânulos nos iogurtes sem adição de fibras (VÉNICA; SPOTTI; PAVÓN; MOLLI *et al.*, 2019). Foi realizada a análise estatística para avaliar as diferenças entre os tamanhos de poro dos três lotes produzidos, não havendo diferença significativa entre as medidas ($p > 0,05$).

Figura 7 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (magnificação 500 x) dos seguintes produtos liofilizados: iogurte controle (T1), iogurte adicionado CMF (T2), iogurte adicionado de CNF (T3) e iogurte adicionado de Enzy-CNF (T4), sendo estes do segundo lote de fabricação.



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

4.4 CONSIDERAÇÕES

A adição das suspensões coloidais de celulose vegetal contribuiu para formação da rede proteica, conferindo estabilidade ao gel de iogurte. Os tratamentos T2, T3 e T4 apresentaram algumas propriedades superiores em comparação com iogurte controle, sendo possível observar isto nos resultados de viscosidade, consistência e sinérese. Os resultados observados na análise de microscopia eletrônica de varredura demonstram que os iogurtes fortificados com fibras apresentaram uma rede de caseína mais heterogênea em relação ao iogurte controle, fato que pode ter contribuído para os resultados de viscosidade e consistência. O mesmo pode ser indicado pela análise de distribuição do tamanho de partícula, na qual houve estabilidade inicial do tamanho das partículas em Dv90. Parâmetros físico-

químicos como pH e acidez não foram afetados pela presença das fibras, sendo este um ponto positivo, considerando que são aspectos de importante contribuição para coagulação, desenvolvimento dos microrganismos e vida útil dos iogurtes. De forma geral, todas as fibras contribuíram positivamente para o produto final, evidenciando sua atuação como hidrocolóide na imobilização da água e consequente diminuição do efeito de sinérese. Avaliando a contribuição individual de cada tipo de fibras, é possível concluir que a suspensão coloidal de celulose vegetal nanofibrilada Enzy-CNF se destaca em relação a outras duas, CMF e CNF, por manter as características estruturais similares ao iogurte controle e simultaneamente conferir ao sistema maior estabilidade.

5 CONCLUSÃO

Através do trabalho desenvolvido foi possível fazer uma discussão tecnológica relacionada a estabilidade da vitamina C e sua contribuição em reações de escurecimento. Como resultado podemos verificar a instabilidade desta vitamina, ocasionando grande perda de conteúdo durante o tempo de armazenamento do produto. Para monitorar esta degradação, foi desenvolvido um modelo matemático para cinética de degradação da vitamina C em iogurtes. Com o modelo desenvolvido é possível estimar o teor da vitamina em qualquer dia durante o período de armazenamento. As equações cinéticas obtidas se aplicam às condições em que os iogurtes foram produzidos neste trabalho, porém a forma como foi desenvolvido o modelo pode ser projetada para situações de produções industriais. Com relação às reações de escurecimento, podemos observar que o processo de degradação da vitamina C contribui para alteração de cor no produto, porém o tratamento térmico é fator que tem maior contribuição na formação dos intermediários da RM. O estudo destes intermediários não é comumente avaliado em iogurtes, em função das próprias características do produto, como o pH mais ácido, que não favorece a reação de Maillard. Porém, observamos que uma vez iniciada a RM estes compostos se formam e aumentam a partir da fermentação, provocando alteração de cor.

O segundo capítulo apresentou uma abordagem acadêmica pautada na deficiência de fibras, inerente da matriz láctea e na recomendação da OMS quanto ao consumo ideal diário de fibras. O trabalho foi desenvolvido em parceria com outros centros acadêmicos, a Universidade de Araraquara e a USP de Lorena. As fibras utilizadas na forma de suspensões coloidais foram produzidas pelo Laboratório de Bioprodutos e Nanobiotecnologia, na Escola de Engenharia de Lorena (Universidade de São Paulo). O fato delas serem produzidas sob condições controladas garante a reprodutibilidade de suas características e o processo de tratamento enzimático ao qual a Enzy-CNF foi submetida assegura quanto a segurança para aplicação em alimentos. Os resultados mostraram que mesmo adicionadas em pequenas quantidades, as fibras contribuíram com a estabilidade final do iogurte e diminuição do efeito de sinérese. As alterações na rede proteica foram confirmadas pelas micrografias dos géis de iogurte.

Desta forma, o trabalho desenvolvido em dois capítulos independentes conseguiu abordar assuntos de interesse industrial e acadêmico. Avaliando a aplicação de dois compostos bioativos, vitamina C e fibra de celulose, em uma matriz láctea, o iogurte.

REFERÊNCIAS

ABOBAKER, A.; ALZWI, A.; ALRAIED, A. H. A. Overview of the possible role of vitamin C in management of COVID-19. **Pharmacol Rep**, 72, n. 6, p. 1517-1528, Dec 2020.

ANVISA. Volume II – Monografias. Insumos Farmacêuticos e Especialidades. **Farmacopeia Brasileira, 6ª edição**, p. IF011-000, 2019.

ANVISA, A. N. d. V. S.-. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. **Diário Oficial da União nº141, de 25 de julho de 2017**, Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências., 2017.

ARANTES, V.; DIAS, I. K. R.; BERTO, G. L.; PEREIRA, B. *et al.* The current status of the enzyme-mediated isolation and functionalization of nanocelluloses: production, properties, techno-economics, and opportunities. **Cellulose**, 27, n. 18, p. 10571-10630, 2020.

BADIN, E. E.; QUEVEDO-LEON, R.; IBARZ, A.; RIBOTTA, P. D. *et al.* Kinetic Modeling of Thermal Degradation of Color, Lycopene, and Ascorbic Acid in Crushed Tomato. **Food and Bioprocess Technology**, 14, n. 2, p. 324-333, 2021.

BAE, M.; KIM, H. Mini-Review on the Roles of Vitamin C, Vitamin D, and Selenium in the Immune System against COVID-19. **Molecules**, 25, n. 22, Nov 16 2020.

BARROS, A. I. R. N. A.; NUNES, F. M.; GONÇALVES, B.; BENNETT, R. N. *et al.* Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). **Food Chemistry**, 128, n. 1, p. 165-172, Sep 1 2011.

BERTIN, R. L.; SCHULZ, M.; AMANTE, E. R. Estabilidade de Vitaminas no Processamento de alimentos. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, 34, n. 2, p. 1-14, 2016.

BERTO, G. L.; MATTOS, B. D.; ROJAS, O. J.; ARANTES, V. Single-Step Fiber Pretreatment with Monocomponent Endoglucanase: Defibrillation Energy and Cellulose Nanofibril Quality. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, 9, n. 5, p. 2260-2270, 2021.

BOUKRIA, O.; HADRAMI, E. M. E.; SAMEEN, A.; SAHAR, A. *et al.* Biochemical, Physicochemical and Sensory Properties of Yoghurts Made from Mixing Milks of Different Mammalian Species. **Foods**, 9, n. 11, p. 1-19, 2020.

BOUQUELET, S. Réactions de brunissement - Dégradation de la vitamine C. **SEMM, Université de Lille, Sciences et Technologies**, 2016.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA-IN Nº 46, DE 23 DE OUTUBRO DE 2007. Regulamento técnico de identidade de qualidade de leites fermentados. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2007.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA-IN Nº 75, DE 8 DE OUTUBRO DE 2020. Estabelece os requisitos técnicos para declaração da rotulagem nutricional nos alimentos embalados. **Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada**, 2020.

CÁNOVAS, J. A.; GEA-BOTELL, S.; BORRÁS, F.; MARTÍ, N. *et al.* Vitamin C loss kinetics and shelf life study in fruit-based baby foods during post packaging storage. **Food Packaging and Shelf Life**, 23, 2020.

CARNEIRO, A. P. d. G.; AGUIAR, A. L. L. d.; SILVA, R. B. C. d.; RICHTER, A. R. *et al.* Acerola by-product as a renewable source of bioactive compounds: arabic gum and maltodextrin nanocapsules. **Food Science and Technology**, 40, n. suppl 2, p. 466-474, 2020.

CARR, A. C.; VISSERS, M. C. M. Synthetic or food-derived vitamin C--are they equally bioavailable? **Nutrients**, 5, n. 11, p. 4284-4304, Oct 28 2013.

CFF. Levantamento mostra como o medo da Covid-19 impactou venda de medicamentos. **Comunicação do Conselho Federal de Farmácia**, 2020.

CHEBROLU, K. K.; JAYAPRAKASHA, G. K.; YOO, K. S.; JIFON, J. L. *et al.* An improved sample preparation method for quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by HPLC. **LWT - Food Science and Technology**, 47, n. 2, p. 443-449, 2012.

CIE. **COMMISSION INTERNATIONALE DE L'ECLAIRAGE** - Disponível em: < <http://www.cie.co.at/> . Acesso 10 março 2023. 2023. Disponível em: <https://cie.co.at/node/2/cie-s-objectives>.

CIFELLI, C. J.; AGARWAL, S.; FULGONI, V. L. Association of Yogurt Consumption with Nutrient Intakes, Nutrient Adequacy, and Diet Quality in American Children and Adults. **Nutrients**, 12, n. 11, p. 1-14, Nov 9 2020.

CUI, Y.; SHI, X.; TANG, Y.; XIE, Y. *et al.* The effects of heat treatment and fermentation processes on the formation of furfurals in milk-based dairy products using a QuEChERS technique followed by gas chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. **Food Chemistry**, 313, p. 1-7, 2020.

DA FRANCA, L. G.; ALVES FILHO, E.; RIBEIRO, L. B.; EVANGELISTA, J. S. B. *et al.* Metabolomic profiling of acerola clones according to the ripening stage. **Journal of Food Measurement and Characterization**, 15, n. 1, p. 416-424, 2020.

DA S. LIMA, A.; MAIA, G. A.; DE SOUSA, P. H. M.; DO PRADO, G. M. *et al.* Storage stability of a stimulant coconut water-acerola fruit juice beverage. **International Journal of Food Science & Technology**, 44, n. 7, p. 1445-1451, 2009.

DONG, R.; LIAO, W.; XIE, J.; CHEN, Y. *et al.* Enrichment of yogurt with carrot soluble dietary fiber prepared by three physical modified treatments: Microstructure, rheology and storage stability. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 75, 2022.

DURMUS, N.; CAPANOGLU, E.; KILIC-AKYILMAZ, M. Activity and bioaccessibility of antioxidants in yoghurt enriched with black mulberry as affected by fermentation and stage of fruit addition. **International Dairy Journal**, 117, 2021.

FIGUEROA-MÉNDEZ, R.; RIVAS-ARANCIBIA, S. Vitamin C in Health and Disease: Its Role in the Metabolism of Cells and Redox State in the Brain. **Frontiers in Physiology**, 6, n. 397, p. 1-11, 2015.

FIORUCCI, A. R.; FLORA, M. H.; SOARES, B.; CAVALHEIRO, É. T. G. A Importância da Vitamina C na sociedade através dos tempos. **QUÍMICA NOVA NA ESCOLA**, 17, p. 3-7, 2002.

GABAS, A. L.; TELIS-ROMERO, J.; MENEGALLI, F. C. CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO EM AMEIXAS LIOFILIZADAS. **CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**, 23, p. 66-70, 2003.

GAMBOA-SANTOS, J.; MEGIAS-PEREZ, R.; SORIA, A. C.; OLANO, A. *et al.* Impact of processing conditions on the kinetic of vitamin C degradation and 2-furoylmethyl amino acid formation in dried strawberries. **Food Chem**, 153, p. 164-170, Jun 15 2014.

GARCIA, V. A. d. S.; BORGES, J. G.; VANIN, F. M.; CARVALHO, R. A. d. Vitamin C stability in acerola and camu-camu powder obtained by spray drying. **Brazilian Journal of Food Technology**, 23, p. 1-13, 2020.

GLIGUEM, H.; BIRLOUEZ-ARAGON, I. Effects of Sterilization, Packaging, and Storage on Vitamin C Degradation, Protein Denaturation, and Glycation in Fortified Milks. **Journal of Dairy Science**, 88, n. 3, p. 891-899, 2005/03/01/ 2005.

GOMES, E. R.; CARNEIRO, L. C. M.; STEPHANI, R.; CARVALHO, A. F. d. *et al.* Effect of sugar reduction and addition of corn fibre and polydextrose on pore size and syneresis of yoghurt. **International Dairy Journal**, 129, n. 129, p. 105298, 2022.

GOMES, E. R.; OLIVEIRA, M. B. d.; RENHE, I. R. T.; STEPHANI, R. *et al.* Addition of buttermilk powder to yogurt: effects on particle size, microstructure and texture. **Research, Society and Development**, 10, n. 11, 2021.

GU, T.; WANG, N.; WU, T.; GE, Q. *et al.* Antioxidative Stress Mechanisms behind Resveratrol: A Multidimensional Analysis. **Journal of Food Quality**, 2021, p. 1-12, 2021.

HASHIM, I. B.; KHALIL, A. H.; AFIFI, H. S. Quality characteristics and consumer acceptance of yogurt fortified with date fiber. **Journal of Dairy Science**, 92, n. 11, p. 5403-5407, Nov 2009.

HIATT, A. N.; FERRUZZI, M. G.; TAYLOR, L. S.; MAUER, L. J. Deliquescence Behavior and Chemical Stability of Vitamin C Forms (Ascorbic Acid, Sodium Ascorbate, and Calcium Ascorbate) and Blends. **International Journal of Food Properties**, 14, n. 6, p. 1330-1348, 2011.

ICH. International Conference on Harmonisation - Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology **European Medicines Agency (EMA)**, 1995.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial- ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS-DOQ-CGCRE-008. **INMETRO**, p. 1-32, 2016.

ISMAIL, Y.; MAUER, L. J. Phase transitions of ascorbic acid and sodium ascorbate in a polymer matrix and effects on vitamin degradation. **Journal of Food Process Engineering**, 43, n. 5, p. 1-14, 2019.

ITAL. Tendências do Mercado de Produtos Lácteos. **Instituto de Tecnologia de Alimentos - Itai**, p. 1-346, 2020.

JESUS, M. N. d.; ROCHA, A. C. F. F.; CAMPOS, S. B.; SANTANA, T. F. V. *et al.* Vitamina C e a relação com a imunidade e como Agente Preventivo da COVID- 19 (Sars -Cov2). **Research, Society and Development**, 10, n. 5, p. 1-8, 2021.

KAMALABADI, M.; GHAEMI, E.; MOHAMMADI, A.; ALIZADEH, N. Determination of furfural and hydroxymethylfurfural from baby formula using headspace solid phase microextraction based on nanostructured polypyrrole fiber coupled with ion mobility spectrometry. **Food Chem**, 181, p. 72-77, Aug 15 2015.

KENNETH KIESERLING; TUYET M. VU; STEPHAN DRUSCH; SCHALOW, S. Impact of pectin-rich orange fibre on gel characteristics and sensory properties in lactic acid fermented yoghurt. **Food Hydrocolloids**, 94, p. 152-163, 2019.

KESSLER, H. G. **Food and Bio Process Engineering: Dairy Technology**. Verlag A. Kessler, 2002. 9783980237857.

LEE, J.-B.; AHN, J.; LEE, J.; KWAK, H.-S. L-ascorbic acid microencapsulated with polyacylglycerol monostearate for milk fortification. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 68, n. 3, p. 495-500, Mar 2004.

LI, M.; SHEN, M.; LU, J.; YANG, J. *et al.* Maillard reaction harmful products in dairy products: Formation, occurrence, analysis, and mitigation strategies. **Food Research International**, 151, p. 110839, Jan 2022.

LINSTER, C. L.; SCHAFTINGEN, E. V. Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. **The FEBS Journal**, 274, n. 1, p. 1-22, Jan 2007.

LUND, M. N.; RAY, C. A. Control of Maillard Reactions in Foods: Strategies and Chemical Mechanisms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 65, n. 23, p. 4537-4552, Jun 14 2017.

LUND, P.; BECHSHOFT, M. R.; RAY, C. A.; LUND, M. N. Effect of Processing of Whey Protein Ingredient on Maillard Reactions and Protein Structural Changes in Powdered Infant Formula. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 70, n. 1, p. 319-332, Jan 12 2022.

MANELA-AZULAY, M.; LACERDA, C. A. M.-d.-.; PEREZ, M. d. A.; FILGUEIRA, A. L. *et al.* Vitamina C. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 78, n. 3, p. 265-272, 2003.

MARY, P. R.; MUTTURI, S.; KAPOOR, M. Non-enzymatically hydrolyzed guar gum and orange peel fibre together stabilize the low-fat, set-type yogurt: A techno-functional study. **Food Hydrocolloids**, 122, n. 122, p. 107100, 2022.

MAZUREK, A.; WŁODARCZYK-STASIAK, M. Application of a New Dehydroascorbic Acid Reducing Agent in the Analysis of Vitamin C Content in Food. **Molecules**, 26, n. 20, Oct 16 2021.

MEYBODI, N. M.; MORTAZAVIAN, A. M.; ARAB, M.; NEMATOLLAHI, A. Probiotic viability in yoghurt: A review of influential factors. **International Dairy Journal**, 109, p. 10, Oct 2020. Review.

MIESZCZAKOWSKA-FRAC, M.; CELEJEWSKA, K.; PLOCHARSKI, W. Impact of Innovative Technologies on the Content of Vitamin C and Its Bioavailability from Processed Fruit and Vegetable Products. **Antioxidants**, 10, n. 1, Jan 5 2021.

MUSTAPA, N. A. H.; AHMAD, S. R. Effects of Various Drying Methods on the Vitamin C level of Papaya Locally Grown in Brunei Darussalam. **Pertanika Journal of Science & Technology**, 27, p. 387 - 396, 2019.

NECHYPORCHUK, O.; BELGACEM, M. N.; BRAS, J. Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances. **Industrial Crops and Products**, 93, p. 2-25, 2016.

NECHYPORCHUK, O.; PIGNON, F.; BELGACEM, M. N. Morphological properties of nanofibrillated cellulose produced using wet grinding as an ultimate fibrillation process. **Journal of Materials Science**, 50, n. 2, p. 531-541, 2015.

NJUS, D.; KELLEY, P. M.; TU, Y. J.; SCHLEGEL, H. B. Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. **Free Radical Biology and Medicine**, 159, p. 37-43, Nov 2020. Review.

OMS. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação-FAO no Brasil - Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/brasil/pt/>, 2023.

PATHARE, P. B.; OPARA, U. L.; AL-SAID, F. A.-J. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, 6, n. 1, p. 36-60, 2012.

PEREIRA, V. P.; KNOR, F. J.; VELLOSA, J. C. R.; BELTRAME, F. L. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity of green, black and white teas of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 16, n. 3, p. 490-498, 2014.

PINTO, C. B. d. A. Estudo da concentração de ácido sórbico e de indicadores da reação de Maillard em doce de leite e o uso de permeado de leite como indutor da cristalização de lactose em leite condensado. **Dissertação. Universidade Federal de Juiz de Fora**, 2023.

RAHMAN, M. S.; AL-RIZEIQI, M. H.; GUIZANI, N.; AL-RUZAIQI, M. S. *et al.* Stability of vitamin C in fresh and freeze-dried capsicum stored at different temperatures. **Journal of Food Science and Technology**, 52, n. 3, p. 1691-1697, Mar 2015.

RANDHAWA, M. A.; JAVED, M. S.; AHMAD, Z.; AMJAD, A. *et al.* Amassing of Hydroxymethylfurfural, 2- Furfural and 5- Methyl furfural in orange (*Citrus reticulata*) juice during storage. **Food Science and Technology**, 40, n. 2, p. 382-386, 2020.

RANI, L.; SHARMA, N.; SINGH, S.; GREWAL, A. S. Therapeutic Potential of Vitamin C: An Overview of Various Biological Activities. **International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance**, 10, n. 04, p. 605-612, 2019.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. *et al.* VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS. **Química Nova**, 5, 27, p. 771-780, 2004.

ROSA, J. S. d.; GODOY, R. L. d. O.; NETO, J. O.; CAMPOS, R. d. S. *et al.* Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência e exclusão iônica. **Food Science and Technology**, 27, n. 4, p. 837-846, 2007.

SAITO, T.; HIROTA, M.; TAMURA, N.; KIMURA, S. *et al.* Individualization of Nano-Sized Plant Cellulose Fibrils by Direct Surface Carboxylation Using TEMPO Catalyst under Neutral Conditions. **Biomacromolecules**, 10, p. 1992-1996, 2015.

SARMENTO, R. C.; PINTO, M. R. M.; CRAVEIRO, R. S.; DE FREITAS, E. P. B. *et al.* Estabilidade do ácido ascórbico em iogurte de leite de búfala adicionado de diferentes concentrações de polpa de camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, 74, n. 3, p. 149-158, 2019.

SHARABI, S.; OKUN, Z.; SHPIGELMAN, A. Changes in the shelf life stability of riboflavin, vitamin C and antioxidant properties of milk after (ultra) high pressure homogenization: Direct and indirect effects. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 47, p. 161-169, 2018/06/01/ 2018.

SILVA, N. N.; CASANOVA, F.; PINTO, M. d. S.; CARVALHO, A. F. d. *et al.* Micelas de caseína: dos monômeros à estrutura supramolecular. **Brazilian Journal of Food Technology**, 22, 2019.

SMUDA, M.; GLOMB, M. A. Maillard degradation pathways of vitamin C. **Angewandte Chemie International Edition**, 52, n. 18, p. 4887-4891, Apr 26 2013.

SOUZA, C. A. G. d.; SIQUEIRA, S. M. C.; AMORIM, A. F. V. d.; MORAIS, S. M. d. *et al.* Encapsulation of L-Ascorbic Acid within the Natural Biopolymer-Galactomannan-Using the Spray-Drying Method: Preparation, Characterization, and Evaluation of Antioxidant Activity. **Química Nova**, 38, n. 7, p. 877-883, 2015.

SPENCE, K. L.; VENDITTI, R. A.; ROJAS, O. J.; HABIBI, Y. *et al.* A comparative study of energy consumption and physical properties of microfibrillated cellulose produced by different processing methods. **Cellulose**, 18, n. 4, p. 1097-1111, 2011.

STEPHANI, R.; MESA, N. C.; PERRONE, Í. T.; FREDERICK, A. *et al.* Outstanding aspects in the Maillard Reaction: glycation reactions in dulce de leche and relevance of this product in Latin America. **IMARS Highlights**, 17, n. 6, p. 5-12, 2022.

SUCUPIRA, N. R.; XEREZA, A. C. P.; SOUSA, P. H. M. d. Perdas Vitamínicas Durante o Tratamento Térmico de Alimentos. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saude**, 14, n. 2, p. 121-128, 2012.

TARUN BELWAL; DEVKOTA, H. P.; HASSAN, H. A.; AHLUWALIA, S. *et al.* Phytopharmacology of Acerola (*Malpighia* spp.) and its potential as functional food. **Trends in Food Science & Technology**, 74, p. 99-106, 2018.

TROISE, A. D.; VITIELLO, D.; TSANG, C.; FIORE, A. Encapsulation of ascorbic acid promotes the reduction of Maillard reaction products in UHT milk. **Food & Function**, 7, n. 6, p. 2591-2602, 2016. 10.1039/C6FO00151C.

VARNAITE, L.; KERSIENE, M.; SIPAILIENE, A.; KAZERNAVICIUTE, R. *et al.* Fiber-Rich Cranberry Pomace as Food Ingredient with Functional Activity for Yogurt Production. **Foods**, 11, n. 5, Mar 6 2022.

VÉNICA, C. I.; SPOTTI, M. J.; PAVÓN, Y. L.; MOLLI, J. S. *et al.* Influence of carrot fibre powder addition on rheological, microstructure and sensory characteristics of stirred-type yogurt. **International Journal of Food Science & Technology**, 55, n. 5, p. 1916-1923, 2019.

VILLAGRÁN, M.; MUÑOZ, M.; DÍAZ, F.; TRONCOSO, C. *et al.* Una mirada actual de la vitamina C en salud y enfermedad. **Revista chilena de nutrición**, 46, n. 6, p. 800-808, 2019.

VINCENZETTI, S.; SANTINI, G.; POLZONETTI, V.; PUCCIARELLI, S. *et al.* Vitamins in Human and Donkey Milk: Functional and Nutritional Role. **Nutrients**, 13, n. 5, p. 1-10, Apr 29 2021.

XU, M.; SHEN, C.; ZHENG, H.; XU, Y. *et al.* Metabolomic analysis of acerola cherry (*Malpighia emarginata*) fruit during ripening development via UPLC-Q-TOF and contribution to the antioxidant activity. **Food Research International**, 130, p. 108915, 2020/04/01/ 2020.

YAN, B.; DAVACHI, S. M.; RAVANFAR, R.; DADMOHAMMADI, Y. *et al.* Improvement of vitamin C stability in vitamin gummies by encapsulation in casein gel. **Food Hydrocolloids**, 113, p. 106414, 2021.

YU, H.; ZHONG, Q.; GUO, Y.; XIE, Y. *et al.* Potential of resveratrol in mitigating advanced glycation end-products formed in baked milk and baked yogurt. **Food Research International**, 133, p. 109191, Jul 2020.

ZHANG, W.; LUO, Z.; WANG, A.; GU, X. *et al.* Kinetic models applied to quality change and shelf life prediction of kiwifruits. **LWT**, 138, p. 110610, 2021/03/01/ 2021.

ZHONG, C.; TAN, S.; LANGRISH, T. Redness generation via Maillard reactions of whey protein isolate (WPI) and ascorbic acid (vitamin C) in spray-dried powders. **Journal of Food Engineering**, 244, p. 11-20, 2019.

ZHOU, H.; ST. JOHN, F.; ZHU, J. Y. Xylanase pretreatment of wood fibers for producing cellulose nanofibrils: a comparison of different enzyme preparations. **Cellulose**, 26, n. 1, p. 543-555, 2019.

ZNAMIROWSKA, A.; SZAJNAR, K.; PAWLOS, M. Effect of Vitamin C Source on Its Stability during Storage and the Properties of Milk Fermented by *Lactobacillus rhamnosus*. **Molecules**, 26, n. 20, Oct 14 2021.