

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Caroline Barroso dos Anjos Pinto

**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**

Juiz de Fora

2023

Caroline Barroso dos Anjos Pinto

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 apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Stephani

Coorientador: Prof. Dr. Ítalo Tuler Perrone

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)

Pinto, Caroline Barroso dos Anjos.

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 Juiz de Fora 2023 / Caroline Barroso dos Anjos Pinto. -- 2023.
85 p.

Orientador: Rodrigo Stephani

Coorientador: Ítalo Tuler Perrone

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2023.

1. Doce de leite. 2. Leite condensado. 3. Ácido sórbico. 4. Reação de Maillard. 5. HPLC. I. Stephani, Rodrigo, orient. II. Perrone, Ítalo Tuler, coorient. III. Título.

Caroline Barroso dos Anjos Pinto

"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 apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Físico-Química.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Stephani - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Ítalo Tuler Perrone - Coorientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Alan Frederick Wolfschoon-Pombo
Inovaleite - Grupo de Pesquisa Multicêntrico

Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora,
17/02/2023.



Documento assinado eletronicamente por Rodrigo Stephani, Professor(a), em 24/02/2023, às 08:24, 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 Luiz Fernando Cappa de Oliveira, Professor(a), em 24/02/2023, às 08:32, 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 Italo Tuler Perroni, Professor(a), em 24/02/2023, às 08:33, 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 27/02/2023, às 15:52, 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 **1158433** e o código CRC **014021D5**.

Dedico este trabalho aos meus pais, que nunca mediram esforços para me auxiliar em toda a minha caminhada científica.

AGRADECIMENTOS

Inicio estes agradecimentos agradecendo a Deus pela minha vida e pela minha saúde que nunca faltou ao longo desses anos.

Agradeço aos meus pais, Simone e João Carlos, pelo dom da vida, pela criação excepcional, pela educação, pelo exemplo, por todo apoio, pela confiança, pelo zelo, principalmente, pelo amor que nos une acima de qualquer coisa. Essa vitória é de vocês.

Agradeço aos meus avós, João, Cleuza e Irandy, por cada pequena ação do dia a dia, por cada preocupação, pelo carinho, cuidado e amor mais puro que tenho recebido desde meu primeiro suspiro de vida, são os melhores avós do mundo.

Agradeço as minhas tias Luciane e Josiane, aos meus priminhos Bernardo e Breno, ao meu tio emprestado Marcos, pela união de nossa família e por sempre acreditarem em mim.

Agradeço ao meu tio e padrinho Fagner e à minha tia emprestada Renata, por tanto incentivo, pelo acolhimento, por cada conselho, cada ajuda, cada demonstração de afeto e amor, independente das centenas de quilômetros que nos separam fisicamente. No momento mais difícil de nossas vidas, estivemos juntos e unidos na fé, e, assim, mantivemos certos de que Deus sempre esteve e estará conosco. Agradeço a minha priminha e afilhada Camilla (*in memoriam*), que mesmo com o pouco convívio carnal, me ensinou com sua alegria e sua personalidade única que a vida vale a pena quando estamos juntos de quem amamos. Obrigada por ter me escolhido como prima, saudades eternas.

Agradeço também aos demais amigos e familiares, madrinhas e padrinhos, que de alguma forma, direta ou indiretamente, torceram por mim e me ajudaram a chegar onde cheguei.

Agradeço a todos meus amigos do QUIMTEC, em especial: Carolina Neves Cunha, Igor Lima, Álvaro Pereira, Mariana Leite, Natália Alves, Laís Melquíades, Taynan Landin, Júlia Matos, Monisa Gouvêa, Mariana Braga, Júlia Francisquini e Paola Lazzarini. Serei eternamente grata pela parceria e por toda ajuda, pois sem vocês jamais seria capaz sozinha. Por todos os momentos de aperto no laboratório que nos fizeram crescer, as brincadeiras, o trabalho duro, as festas, a diversão, por todo companheirismo e conhecimento que compartilhamo. Esses anos ao lado de vocês

foram maravilhosos e me fizeram evoluir como pessoa e profissional. Sinto-me na obrigação de citar Natália alves, Igor Lima, Álvaro Pereira, Mariana Leite e Laís Melquíades, que se tornaram grandes irmãos, uma relação além do profissional. Levarei sempre comigo um pouco de cada um onde eu estiver. À Carolina Neves Cunha, que conheci no mestrado e se tornou meu braço direito e esquerdo, porto seguro, conselheira, esteve presente em cada passo que dei nesses dois anos, cada trabalho, cada desespero... obrigada por compartilhar comigo seus conhecimentos pessoais e profissionais e, mais que isso, por ter me dado a honra de ser sua amiga. Esse mestrado com você foi bem mais fácil, estaremos sempre juntas.

Aos meus amigos da graduação, Letícia Sant'Anna, Naiane, João Marcos Beraldo e Jaqueline Almeida, pelos nossos grupos de estudo, por toda cumplicidade e ajuda que nos fizeram conquistar nossos objetivos até aqui, em especial à Letícia, que se tornou uma grande amiga para vida, uma conexão inexplicável. Obrigada por tudo.

As minhas amigas de infância, Vitória Souza e Jaqueline Almeida, companheiras de apartamento, amigas de uma vida toda. Obrigada, Vitória, pela amizade mais sincera que já senti em toda minha vida, por estar comigo nos melhores e piores momentos, por não medir esforços para me ajudar; obrigada, Jaqueline, pela parceria de anos, desde o primeiro dia de faculdade, por cada conhecimento que compartilhamos, cada conversa.

As minhas amigas Isther Ayupe, Gabriela Alves e Júlia Toledo, agradeço a amizade desde 2013, cada conversa, conselho, palavras de conforto, puxões de orelha, festas, agradeço por cada momento que me fizeram sentir importante, vocês foram essenciais nessa caminhada.

Gostaria de agradecer, de todo meu coração, aos mestres, a todos que passaram pela minha formação e em especial, aos meus orientadores que estiveram presentes desde minha iniciação científica e, agora, no mestrado. Professor Ítalo Tuler Perrone, meu co-orientador, professor Luiz Fernando Cappa de Oliveira, professor Alan Wolfschoon-Pombo, professor Antônio Fernandes, que também compõe a minha banca de Defesa do Mestrado. Agradeço a vocês por cada minuto disponibilizado, cada explicação concedida, por toda experiência compartilhada, por cada esforço para melhoria do nosso laboratório, toda orientação que foi essencial para que eu fosse capaz de executar os trabalhos com as minhas próprias mãos e pelo interesse em contribuir para o melhor desenvolvimento dos projetos.

Professora Juliana de Carvalho da Costa, obrigada por ter sido tão presente e receptiva nesses anos, por toda dedicação em nos ajudar, em ver os trabalhos dando certo, por cada palavra de incentivo, e por estar sempre disponível para qualquer dúvida. Sem sua contribuição nada seria possível.

Professor Rodrigo Stephani, meu primeiro pai científico, obrigada por ter acreditado em mim, por sempre me cobrar e me conduzir a fazer e ser melhor, obrigada por cada conversa, por não relutar, em nenhum momento, em ajudar. Você, com certeza, foi a melhor escolha para esse caminho científico que decidi trilhar, se tornou um exemplo a ser seguido, por ser tão humano, tão correto e tão acolhedor, um verdadeiro pai, que mesmo com milhares de quilômetros distante se faz presente. Sua orientação foi transformadora e muito valiosa na minha história, espero continuarmos com essa parceria por mais alguns bons anos. Agradeço também pelo seu empenho pessoal em manter nosso laboratório QUIMTEC tão aconchegante e prazeroso de trabalhar, um lugar que de fato posso chamar de lar. A você, toda minha admiração.

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 e ao ICE da UFJF, que fazem parte da minha formação profissional; ao Programa de Mestrado Acadêmico para Inovação, pela oportunidade única de fazer pós graduação *stricto sensu* em parceria direta com empresas privadas; a Doremus Alimentos pela colaboração e apoio ao meu mestrado com os trabalhos realizados e à Universidade Federal de Juiz de Fora, que tem sido minha casa preciosa desde 2016 e ainda será pelos próximos anos.

Meu sentimento de chegar até aqui é puramente de gratidão, por ter sido abençoada com oportunidades e pessoas que Deus colocou perto de mim e que eu busquei aproveitar da melhor forma para minha evolução pessoal. Só eu sei quais dificuldades passei nesses anos, e os desafios que enfrentei para seguir em frente em busca de meu propósito final. Sinto orgulho dos resultados que obtive, juntamente aos meus amigos e professores e da pessoa que me tornei até aqui. Encerro mais esse ciclo com a sensação de dever cumprido e com a certeza de que é só o começo. Ainda há muito para ser conquistado.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”.
(ISAAC NEWTON, 1676, p. 1)

RESUMO

Doce de leite e leite condensado são produtos lácteos obtidos da desidratação parcial do leite e, por isso, são menos perecíveis que ele. Ambos necessitam de leite e sacarose para obtenção, com diferenças na tecnologia de fabricação. Para doce de leite ocorre, além da concentração, o cozimento da mistura que, geralmente, é feito em tacho aberto (pressão atmosférica) e esse processo favorece a Reação de Maillard, responsável por características como cor, sabor e textura do doce. O leite condensado é evaporado a vácuo e, ao contrário do doce de leite, não há cozimento, o que confere uma viscosidade mais fluida e uma coloração mais clara que a do doce de leite. Devido às variações que podem ocorrer na fabricação de ambos e o interesse industrial, esta dissertação apresenta estudos pautados em questões tecnológicas dos dois produtos. Para a matriz doce de leite, foram desenvolvidos dois trabalhos de maneiras independentes, no qual o primeiro avaliou a estabilidade ao aquecimento do conservante ácido sórbico e seu sal sorbato de potássio na fabricação do doce; no segundo estudo foi avaliado a presença de 4 derivados do furfural (indicadores da Reação de Maillard): 5-hidroximetilfurfural (HMF); 2-furaldeído (F); 2-furil-metilcetona (FMC) e 5-metil-2-furaldeído (MF) em amostras de doces de leite comerciais, ambos conduzidos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Essas duas vertentes de estudo são baseadas em demandas industriais relacionadas ao momento de adição de conservantes e ao melhor entendimento da Reação de Maillard. Os resultados mostraram que, para o conservante ser degradado pelo aquecimento, é necessário considerar o pH do meio, principalmente abaixo do pKa do ácido sórbico. Isso porque, devido ao equilíbrio químico, a espécie ácida prevalece em meio ácido e esta tem a capacidade de ser carregada pelo vapor, já o sorbato prevalece em pH maior e não é perdido na evaporação. Com o estudo dos marcadores da reação de Maillard, foi possível desenvolver e aplicar uma metodologia que identificou e quantificou simultaneamente os 4 analitos de interesse na matriz com boa sensibilidade, nos quais o HMF foi detectado e quantificado em todas as amostras, variando de 49,79 a 262,0 $\mu\text{mol/kg}$; F foi detectado em duas amostras, mas não quantificado por estar abaixo do limite de quantificação do método; os demais não foram detectados para nenhuma amostra, o que pode estar relacionado à intensidade do tratamento térmico e processo de obtenção de cada produto. Para o leite condensado, segunda matriz

de interesse, foi estudada a aplicação do permeado de leite em pó, um subproduto dos laticínios que possui alta concentração de lactose, como agente de cristalização da lactose. Os resultados revelaram que o permeado de leite é um excelente indutor de cristalização, já que o perfil obtido foi semelhante à cristalização com lactose pura, evidenciado pela análise das microscopias dos cristais em *software* específico. Além disso, o uso de permeado para essa finalidade é economicamente viável por se tratar de um subproduto, geralmente, descartado pelas indústrias.

Palavras-chave: Doce de leite. Leite condensado. Ácido sórbico. Reação de Maillard. HPLC. Cristalização. Permeado de leite.

ABSTRACT

Dulce de leche and sweetened condensed milk are dairy products obtained from the partial dehydration of milk and are therefore less perishable than milk. Both need milk and sucrose to be obtained, with differences in the manufacturing technology. For *dulce de leche*, besides the concentration, the mixture is cooked, which is usually done in an open pan (atmospheric pressure) and this process favors the Maillard Reaction, responsible for characteristics such as color, flavor, and texture of the *dulce de leche*. The condensed milk is evaporated under vacuum and, unlike the *dulce de leche*, there is no cooking, which gives it a more fluid viscosity and a lighter color than the *dulce de leche*. Due to the variations that can occur in the manufacture of both and the industrial interest, this dissertation presents studies based on technological issues of the two products. For the *dulce de leche* matrix, two independent studies were developed, in which the first evaluated the heating stability of the preservative sorbic acid and its salt potassium sorbate in the manufacture of *dulce de leche*; in the second study, the presence of four furfural derivatives (indicators of the Maillard Reaction) were evaluated: 5-hydroxymethylfurfural (HMF), 2-furaldehyde (F), 2-furyl-methylketone (FMC) and 5-methyl-2-furaldehyde (MF) in commercial milk candy samples, both conducted by high-performance liquid chromatography (HPLC). These two strands of study are based on industrial demands related to the timing of adding preservatives and better understanding of the Maillard Reaction. The results showed that for the preservative to be degraded by heating, it is necessary to consider the pH of the medium, especially below the pKa of sorbic acid. This is because, due to the chemical equilibrium, the acid species prevails in acidic medium and this has the ability to be carried by steam, while the sorbate prevails in higher pH and is not lost in evaporation. With the study of the Maillard reaction markers, it was possible to develop and apply a methodology that simultaneously identified and quantified the 4 analytes of interest in the matrix, with good sensitivity, in which HMF was detected and quantified in all samples, ranging from 49.79 to 262.0 $\mu\text{mol/kg}$; F was detected in two samples, but not quantified because it was below the quantification limit of the method; the others were not detected for any sample, which may be related to the intensity of the thermal treatment and the process of obtaining each product. For sweetened condensed milk, the second matrix of interest, the application of powdered milk permeate, a by-product of dairy products that has a high concentration of lactose, was studied as a lactose

crystallization agent. The results revealed that the milk permeate is an excellent inducer of crystallization, since the profile obtained was similar to the crystallization with pure lactose, as evidenced by the analysis of crystal microscopies in specific software. In addition, the use of permeate for this purpose is economically feasible because it is a by-product generally discarded by industries.

Keywords: *Dulce de leche*. Sweetened condensed milk. Sorbic acid. Maillard reaction. HPLC. Crystallization. Milk permeate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estruturas químicas do HMF (5-hidroximetilfurfural); MF (5-metil-2-furfuraldeído); F (2-furaldeído); FMC (2-furil-metilcetona).....	9
Figura 2 - Obtenção do sorbato de potássio a partir do ácido sórbico	10
Esquema 1 - Rotas de produção das amostras de doce de leite. (n=2).....	16
Esquema 2 - Rotas de produção das soluções modelo com os pHs ajustados ao início (n=3).....	18
Esquema 3 - Procedimento experimental para determinação da taxa de recuperação (n=3).....	20
Quadro 1- Modo de eluição gradiente.....	22
Gráfico 1 - Cromatograma do padrão de ácido sórbico.....	23
Gráfico 2 Cromatogramas das amostras de doce de leite (A) com sorbato de potássio; (B) amostra sem sorbato de potássio.	24
Gráfico 3 -Resposta analítica em função da concentração da substância.	25
Gráfico 4 - Cromatogramas das soluções modelo nos três pH analisados.	29
Gráfico 5 - Cromatograma dos 4 marcadores: HMF (5-hidroximetilfurfural); F (2-furaldeído); FMC: (2-furil-metilcetona); MF: (5-metil-2-furaldeído).	32
Gráfico 6 - Linearidade dos 4 marcadores: HMF (5-hidroximetilfurfural); F (2-furaldeído); FMC: (2-furil-metilcetona); MF: (5-metil-2-furaldeído) (n=3). ..	32
Figura 3 - Estrutura da α -lactose (A) e β -lactose (B).....	40
Esquema 4 - Procedimento experimental (n=3).....	45
Figura 4 - MEV dos ingredientes testados. A: lactose não micronizada; B: lactose micronizada; C: permeado não micronizado; D: permeado micronizado .	48
Figura 5 - Microscopia em D1 e em D30. T1:LC com lactose não micronizada; T2: LC com lactose micronizada; T3: LC com permeado não micronizado; T4: LC com permeado micronizado.....	52
Figura 6 - Perfil de imagem no ImageJ para T1:LC com lactose não micronizada; T2: LC com lactose micronizada; T3: LC com permeado não micronizado; T4: LC com permeado micronizado.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do ácido sórbico e seu sal de potássio.....	11
Tabela 2 - Resultados do ensaio de precisão e exatidão pelo método da repetibilidade	26
Tabela 3 - Resultados do ensaio de precisão pelo método da precisão intermediária	27
Tabela 4 - Concentrações teóricas e experimentais amostras de DL com sorbato ao início e ao final	27
Tabela 5 - Concentrações de ácido sórbico nas soluções modelo	30
Tabela 6 - Porcentagens de recuperação para as 3 marcas de leite.....	31
Tabela 7 - Precisão e exatidão para os 4 analitos	33
Tabela 8 - LD e LQ para os 4 marcadores	34
Tabela 9 - Percentual de recuperação de HMF nas amostras (n=2)	34
Tabela 10 - Conteúdo de HMF, F, FMC e MF em 11 amostras de DL	36
Tabela 11- Dados da análise de viscosidade dos leites condensado	50
Tabela 12- Dados da análise das imagens no ImageJ	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RP-HPLC	<i>reverse phase high-performance liquid chromatography</i>
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
OMS	Organização Mundial da Saúde
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
UHT	<i>ultra high temperature</i>
AS	ácido sórbico
DL	doce de leite
LC	leite condensado
RM	Reação de Maillard
pH	potencial hidrogeniônico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
HMF	5-Hidroximetilfurfural
F	2-Furaldeído
FMC	2-Furilmetilcetona
MF	5-Metil-2-Furaldeído
UV-Vis	Ultravioleta- Visível
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IDF	<i>International Dairy Federation</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
DPR	Desvio padrão relativo
IC	Inclinação da curva
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
PDA	<i>Photodiode Array</i>
Si	Doce de leite com sorbato adicionado ao início
Sf	Doce de leite com sorbato adicionado ao final
A ⁻	base conjugada/sal
HA	ácido
C	concentração
CTA	concentração teórica do analito
TBA	ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
ACN	acetonitrila
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

T1	Leite condensado com lactose não micronizada
T2	Leite condensado com lactose micronizada
T3	Leite condensado com permeado não micronizado
T4	Leite condensado com permeado micronizado
D1	Um dia após fabricação
D7	Sete dias após fabricação
D15	Quinze dias após fabricação
D30	Trinta dias após fabricação
A	Lactose não micronizada
B	Lactose micronizada
C	Permeado não micronizado
D	Permeado micronizado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO GERAL	4
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
2.1.1	Objetivos específicos do primeiro capítulo	4
2.1.2	Objetivos específicos do segundo capítulo	5
3	ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO SÓRBICO E DE INDICADORES DA REAÇÃO DE MAILLARD EM DOCE DE LEITE	6
3.1	REFERENCIAL TEÓRICO	6
3.2	REAÇÃO DE MAILLARD EM DOCE DE LEITE	7
3.3	ÁCIDO SÓRBICO E SEUS SAIS COMO CONSERVANTES ALIMENTÍCIOS .	10
3.4	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	12
3.5	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	13
4	MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1	ÁCIDO SÓRBICO	14
4.1.1	Parâmetros analíticos e cromatográficos	14
4.1.2	Produção dos doces de leite	14
4.1.3	Produção das soluções modelo	16
4.1.4	Ensaio de recuperação de ácido sórbico em doce de leite com diferentes marcas de leite	18
4.2	REAÇÃO DE MAILLARD	20
4.2.1	Obtenção das amostras de doces comerciais	21
4.2.2	Desenvolvimento da metodologia analítica para identificação e quantificação de indicadores da reação de Maillard	21
4.2.3	Parâmetros cromatográficos	22
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1	ÁCIDO SÓRBICO	23
5.1.1	Validação da metodologia ISO 9231 IDF 139	23
5.1.2	Seletividade	24

5.1.3 Linearidade	25
5.1.4 Sensibilidade	25
5.1.5 Precisão e exatidão	26
5.1.6 Determinação do conteúdo de ácido sórbico no doce de leite em função do tratamento térmico	27
5.1.7 Análise do conteúdo de ácido sórbico nas soluções modelo	28
5.1.8 Taxa de recuperação	30
5.2 REAÇÃO DE MAILLARD	31
5.2.1 Validação da metodologia desenvolvida	32
5.2.2 Determinação do conteúdo dos marcadores da reação de Maillard em doce de leite	35
6 CONSIDERAÇÕES	37
7 USO DO PERMEADO DE LEITE COMO INDUTOR DA CRISTALIZAÇÃO DE LACTOSE EM LEITE CONDENSADO	38
7.1 REFERENCIAL TEÓRICO	38
7.2 CARACTERÍSTICAS DA LACTOSE.....	39
7.3 CRISTALIZAÇÃO E NUCLEAÇÃO DA LACTOSE	41
7.4 PERMEADO DE LEITE.....	43
8 MATERIAL E MÉTODOS	44
8.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS EM PÓ.....	44
8.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS INGREDIENTES.....	44
8.3 PRODUÇÃO DOS LEITES CONDENSADOS	44
8.4 ANÁLISES DE VISCOSIDADE	45
8.5 MICROSCOPIA ÓTICA	46
8.6 TRATAMENTO DAS IMAGENS NO IMAGEJ.....	46
9 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
9.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS INGREDIENTES EM PÓ PELO MEV	47
9.2 MONITORAMENTO DA VISCOSIDADE APARENTE NO <i>SHELF-LIFE</i>	49
9.3 COMPARAÇÃO DO PERFIL DE CRISTALIZAÇÃO	51
9.4 COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DO PERFIL DE CRISTALIZAÇÃO PELO SOFTWARE IMAGEJ	53

10	CONSIDERAÇÕES.....	56
11	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Antigamente, os alimentos eram conservados com ácidos, sal ou quaisquer outras substâncias que fossem capazes de mantê-los em sua forma física desejada para consumo. O crescimento microbiano e algumas reações provocadas por enzimas nos alimentos pode resultar em alterações que, por sua vez, podem acarretar variações sensoriais e deterioração dos alimentos. Quando não é possível submetê-los a processos físicos e/ou biológicos de conservação, é necessário o uso de conservantes.

Atualmente, é grande o número de substâncias químicas conservantes que são adicionadas aos alimentos para impedir ou retardar as reações provocadas por esses microorganismos ou enzimas. Um bom conservante é aquele que impede as alterações negativas nos alimentos sem modificar suas características, principalmente organolépticas, como aroma, sabor, cor e textura, por exemplo. Entre os de maior uso estão: dióxido de enxofre, ácido benzoico, ácido sórbico (AS), ácido propiônico na forma livre, ou sais de sódio ou potássio, por exemplo.

Para a maior parte dos aditivos permitidos em matrizes alimentícias, órgãos reguladores estipulam limites máximos dessas substâncias, já que algumas delas, em excesso, poderiam trazer danos para a saúde dos consumidores. A principal técnica de identificação dessas substâncias é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) por possuir características como alta sensibilidade de análise, seletividade e robustez, que permite obter resultados precisos e exatos, até mesmo para concentrações muito ínfimas do analito, após um preparo de amostra adequado.

O DL é produzido e comercializado em larga escala em países como Brasil, Argentina, Uruguai e caracteriza-se por ser um produto no qual são necessários poucos ingredientes para seu preparo, que são: leite, açúcar e redutor de acidez. Apesar disso, sua fabricação engloba muitos processos tecnológicos e químicos que devem ser monitorados para se obter um produto de qualidade e com as características desejadas pelo consumidor, geralmente cor castanho/caramelo, textura levemente viscosa (doce pastoso) e sabor adocicado característico.

Por ser um derivado lácteo, possui uma matriz complexa e muitos parâmetros a serem avaliados, além da legislação vigente a qual deve ser atendida pelos produtores. Devido a essas características e às variáveis do processo de obtenção

que induz reações e alterações no produto final, o doce de leite é uma matriz relevante de estudo, principalmente em razão do seu alto consumo e pelo desejo das indústrias de melhorarem e adaptarem o produto às demandas do mercado consumidor. Ainda assim, o doce de leite ainda é pouco reportado na literatura, o que possibilita ainda mais essa área de trabalho obter resultados que serão de grande benefício para comunidade científica e industrial.

Frequentemente, ocorrem diferentes tipos de escurecimento, na ausência ou não de calor, em ambiente doméstico ou industrial, e essas reações de escurecimento podem ser enzimáticas ou não enzimáticas. O escurecimento enzimático está associado às reações catalisadas por uma enzima, a polifenol oxidase é um exemplo que ocorre na maçã ou na batata. O escurecimento não enzimático pode ser pela reação de Maillard (RM), a caramelização e a oxidação da vitamina

C. Essas três reações se diferem pelos tipos de moléculas envolvidas, mas que têm em comum o fato de gerar escurecimento no produto final. Cada alimento, de acordo com suas características, vai apresentar um escurecimento específico, já que a velocidade da reação é dependente da natureza dos componentes reativos dos alimentos.

O escurecimento para alguns alimentos é desejado, para outros não. O DL é um alimento no qual o escurecimento é desejado e a reação envolvida na sua fabricação é a RM. Como esse produto é exposto às altas temperaturas por um longo tempo, esse fator influencia diretamente na velocidade da RM, além de outros elementos como tipo de ingrediente, pH e atividade de água. Conseqüentemente, há aumento dos constituintes que são gerados na reação, dentre eles destaca-se o HMF e possíveis derivados dessa molécula que podem se formar em estágios avançados, como F, FMC e MF.

O DL pode ser produzido artesanalmente e por pequenos, médios e grandes laticínios. Torna-se, então, necessário estudar como os diferentes ingredientes, as diversas tecnologias de fabricação e o tratamento térmico influenciam na qualidade e padronização do produto. Além disso, a literatura técnica e científica é escassa, seja para antigos conceitos ou novos que surgem de acordo com as modernizações de produção, e essas questões corroboram com a necessidade de maiores estudos.

O leite condensado (LC) é o produto obtido pela evaporação a vácuo de parte da água do leite concentrado ou leite reconstituído, com adição de açúcar, podendo ter seus teores de gordura e proteína ajustados unicamente para o atendimento das

características do produto (BRASIL, 2018). A literatura reporta que o LC surgiu em meados dos anos 1800, na qual o norte americano Gail Borden (1801-1874), considerado seu inventor, evaporava parte da água do leite e adicionava açúcar, como objetivo de aumentar o *shelf-life* do leite fluido. Dessa forma, aumentava-se o teor de sólidos do produto, reduzindo a atividade de água e umidade do leite, estendendo seu prazo de validade. Posteriormente, Borden patenteou o produto adicionado de açúcar, o qual foi muito utilizado na guerra civil americana devido à facilidade de transporte e por que tinha uma vida útil superior aos demais alimentos.

O permeado de leite é usado em lácteos, assados, carnes, sopas, confeitos, misturas secas e bebidas para proporcionar diversos benefícios nutricionais e funcionais como melhora de sabor, rendimento, textura, etc. Cada vez mais seus benefícios tem se difundido, aumentando seu uso e devido ao alto teor de lactose na constituição, pode ser um bom indutor de formação de cristais de lactose para evitar textura arenosa em produtos como LC.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral da dissertação foi estudar propriedades físico-químicas e tecnológicas de produtos lácteos concentrados. No capítulo 1, foi avaliado o efeito das condições para a fabricação de doce de leite sobre a concentração final de ácido sórbico e desenvolvida uma metodologia analítica para identificar e quantificar 4 marcadores da reação de Maillard (HMF, F, FMC, MF), simultaneamente por RP-HPLC, em amostras comerciais de doce de leite. Já no capítulo 2, foi comparado o efeito da nucleação secundária com permeado de leite e lactose micronizados e não micronizados no perfil de cristalização de leite condensado, monitorado por microscopia ótica.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram subdivididos para os dois capítulos da dissertação.

2.1.1 Objetivos específicos do primeiro capítulo

- a) produzir DL em escala de bancada adicionado de sorbato de potássio;
- b) validar e implementar a metodologia ISO 9231 IDF 139 de determinação de ácido benzoico e AS em leite e produtos lácteos por cromatografia líquida de alta eficiência;
- c) determinar a concentração de AS pela metodologia ISO 9231 IDF 139, comparando a adição da substância antes e após o tratamento térmico, a fim de verificar se há perda do conservante durante o processo de evaporação;
- d) determinar a taxa de recuperação realizando o estudo de matriz das amostras de doce de leite produzido com 3 marcas diferentes de leite pasteurizado em 3 concentrações distintas de AS (300 mg/kg, 600 mg/kg e 900 mg/kg);
- e) produzir “soluções modelo” (água, açúcar, bicarbonato de potássio e sorbato de potássio em 3 diferentes pH: 2,5, 4,8 e 7,0 a fim de avaliar a estabilidade térmica das espécies sorbato de potássio/AS de acordo com pH do meio;
- f) desenvolver e validar uma metodologia analítica para identificar e quantificar simultaneamente HMF, F, FMC, MF em amostras de DL comerciais por RP-

HPLC;

- g) determinar a concentração dos 4 analitos de interesse nas amostras de DL;
- h) determinar a taxa de recuperação dos analitos nas amostras de DL.

2.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO SEGUNDO CAPÍTULO

- a) produzir leite condensado em escala de bancada e realizar a microcristalização da lactose com 4 ingredientes diferentes (lactose micronizada e não micronizada, permeado de leite micronizado e não micronizado);
- b) realizar microscopia eletrônica de varredura dos ingredientes em pó usados para avaliar a morfologia;
- c) acompanhar o perfil de cristalização ao longo do *shelf-life* do produto por microscopia ótica;
- d) acompanhar a viscosidade do produto ao longo do *shelf-life*;
- e) tratar estatisticamente as microscopias óticas no *software* ImageJ para determinar tamanho médio e quantidade de cristais para cada tratamento.

3 ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO SÓRBICO E DE INDICADORES DA REAÇÃO DE MAILLARD EM DOCE DE LEITE

A partir da seção 3.1, será apresentada uma revisão bibliográfica com base nos principais tópicos abordados neste primeiro capítulo.

3.1 REFERENCIAL TEÓRICO

O doce de leite (DL) é um produto lácteo originalmente da América Latina e um item único da culinária dos países que o consomem por possuir cor, sabor e textura inigualáveis (DOS ANJOS PINTO *et al.*, 2021; GAZE, *et al.*, 2015). O DL é um alimento de grande aceitação sensorial e é definido como um produto obtido a partir de leite ou leite reconstituído e adicionado de sacarose (parcialmente substituído ou não por monossacarídeos e/ou outros dissacarídeos), com ou sem adição de outras substâncias alimentícias, obtido por concentração e ação do calor em condições normais ou pressão reduzida (BRASIL, 1997).

Órgãos regulamentadores, como o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estipulam valores mínimos e máximos para a composição centesimal do DL como umidade máxima $30 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$, gordura de 6 a $9 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, cinzas máximo $2 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ e proteínas mínimo $5 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$, além de determinar os aditivos permitidos e seus limites também (BRASIL, 1997).

Com boas práticas de fabricação, a contaminação poderia ser evitada e, devido aos altos níveis de carboidratos e sólidos em DL, não deveria ser necessário adição de conservantes. Entretanto, devido à pluralidade de locais e escalas de fabricação existentes hoje no país, não se pode descartar a contaminação por leveduras, de utensílios e embalagens pelo ar. Então, AS e seus sais (por exemplo, sorbato de potássio) são substâncias químicas amplamente utilizadas na indústria alimentícia (ELSAYED *et al.*, 2017; THOMAS & DELVES-BROUGHTON, 2014) e também são permitidas pela legislação alimentar brasileira, até uma concentração final no produto de 600 mg/kg (em ácido sórbico) e 1000 mg/kg em ácido sórbico em DL para uso industrial exclusivo (BRASIL, 1997).

As características sensoriais do DL, como sabor e coloração, são basicamente desenvolvidas devido à reação de escurecimento não enzimático, a reação de Maillard

(RM), que ocorre durante o intenso tratamento térmico ao qual o leite e a sacarose são submetidos durante evaporação. O pH, a temperatura de aquecimento e a presença de açúcares redutores e proteínas influenciam a RM. As alterações químicas, organolépticas, nutricionais, como a redução da concentração de aminoácidos essenciais como a lisina, toxicológicas e *in vivo*, que decorrem RM, são assunto de grande interesse científico por possibilitar uma gama de variáveis que podem ser investigadas, visando compreender e obter um produto de maior qualidade (CARNEIRO *et al.*, 2021; SHIBAO & BASTOS, 2011; FRANCISQUINI *et al.*, 2018; PERRONE, 2019; FRANCISQUINI *et al.*, 2019).

O Brasil é um grande produtor de DL e, segundo os dados da Pesquisa Industrial Anual (PIA) divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção de doce de leite no Brasil é de 345,19 milhões de reais, o que equivale a 0,82% do que é produzido pelo setor de laticínios no país (STEPHANI *et al.*, 2018; FRANCISQUINI, 2016).

3.2 REAÇÃO DE MAILLARD EM DOCE DE LEITE

A RM foi descoberta em 1912 por Louis-Camille Maillard, quando este observou o escurecimento com formação de aroma numa solução aquecida contendo açúcar e um aminoácido. É objeto de grande interesse na atualidade, estando relacionado aos aspectos químicos, organolépticos, nutricionais, toxicológicos e manifestações *in vivo* (MURATA *et al.*, 2021; BASTOS *et al.*, 2011). É uma reação induzida termicamente e se desenvolve por uma complexa cascata de reações, que surge, principalmente, durante ação do calor. Inicialmente, era estudada pela influência na cor castanha e na formação de compostos que geram aroma e sabor dos alimentos. Atualmente, sabe-se que também pode ocorrer em condições de baixa temperatura ou durante armazenamento prolongado, e é relevante até mesmo em sua forma *in vivo*, chamada glicação (CHARNOCK *et al.*, 2022; FENNEMA, 2010).

Essa reação é subdividida em três estágios: estágio inicial, estágio intermediário e estágio final. O estágio inicial consiste na condensação do grupo carbonila do açúcar redutor com o grupamento amino livre de aminoácidos, peptídeos ou proteínas, o que ocorre através do ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio do grupo amino, levando ao início da reação. Como consequência dessa

condensação, há formação da base de Schiff instável, que libera água e forma uma glicosilamina. Em função da estrutura do açúcar redutor, a base Schiff rearranja irreversivelmente para formar um produto estável de Amadori, para açúcares aldose, ou um produto de Heyns, para cetose. Nessa fase, os produtos são relatados como incolores, estáveis, sem fluorescência ou absorção na região ultravioleta (CHARNOCK *et al.*, 2022; SEO *et al.*, 2018; BASTOS *et al.*, 2011; BRIÃO *et al.*, 2011; FENNEMA, 2010).

Após a fase inicial da RM, com o prolongamento do aquecimento ou armazenamento, os produtos Amadori ou produtos de Heyns começam a se decompor, originando uma série de reações como desidratação, enolização e retroaldolização dependentes do pH. As diferentes vias de degradação pelas quais a reação se sucede envolvem a formação de compostos que são produtos intermediários reativos. Alguns desses são conhecidos como produtos de glicação avançada. Nessa etapa, também surgem os compostos dicarbonílicos, redutonas, derivados do furfural e produtos da degradação de Strecker, podendo ocorrer o aparecimento de um derivado furano, que origina uma hexose comumente conhecida por HMF (ZHOU *et al.*, 2021; FENNEMA, 2010; NUNES e BAPTISTA, 2001; SHIBAO e BASTOS *et al.*, 2011).

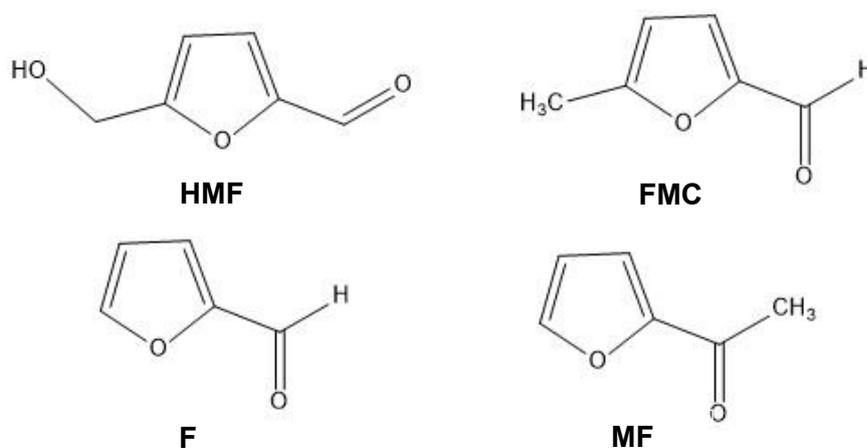
Durante a fase final da RM, os produtos intermediários, que são produzidos durante as fases anteriores, reagem uns com os outros através de polimerização e com resíduos de lisina ou arginina em proteínas, formando pigmentos castanhos contendo nitrogênio, as melanoidinas, que conferem a coloração marrom, característica dos alimentos que passam pela RM. As melanoidinas têm elevados pesos moleculares (até cerca de 100,00 g/mol) e o mecanismo exato para a formação de suas estruturas ainda não são claros. Contudo, sugere-se que a formação de melanoidinas inclua a condensação de aldol, a polimerização aldeído- amina, e a formação de compostos heterocíclicos de azoto (ZHOU *et al.*, 2021; BASTOS *et al.*, 2011; BRIÃO *et al.*, 2011; CHARISSOU *et al.*, 2007; FENNEMA, 2010).

A RM pode ser afetada por diversos fatores, entre eles, a temperatura e o pH. A velocidade dessa reação é lenta às temperaturas mais baixas e em pH mais alcalino, 9 e 10, a intensidade da reação é maior (NAIK *et al.*, 2022; AALAEI *et al.*, 2019; BASTOS *et al.*, 2011; FENNEMA, 2010; RODRÍGUEZ *et al.*, 2021). O tipo de amina influencia diretamente na facilidade de desenvolvimento da RM. A lisina, por apresentar o grupo amino épsilon livre, apresenta alta reatividade, sendo mais susceptível à

reação (carbonila-amino) o que pode reduzir o valor nutricional do alimento (AALAEI *et al.*, 2019; BASTOS *et al.*, 2011; FENNEMA, 2010). A RM necessita de um açúcar redutor e pentoses são mais reativas que as hexoses, as quais são mais reativas que os dissacarídeos, por questões de facilidade de ocorrência da reação química devido ao impedimento estérico. Esse tipo de escurecimento sucede com maior ênfase nos valores intermediários de atividade de água (0,5 e 0,8) e em umidade relativa entre 30% e 70%. Isso porque, em baixa atividade de água (0,2 a 0,25), a velocidade tende a zero por uma diminuição de solvente e, em altos valores (0,9), os reagentes se encontram muito diluídos, o que diminui a velocidade de escurecimento (BASTOS *et al.*, 2011; FENNEMA, 2010; FARAG *et al.*, 2020).

A extensão da reação de Maillard pode ser monitorada pelo surgimento de compostos, o que permite avaliar a intensidade do processamento térmico e as alterações nutricionais relacionadas a ele. Entre esses compostos estão: a furosin, carboximetilamina e derivados furfurais (RUFÍAN-HENARES *et al.*, 2009a e 2009b; CHARISSOU *et al.*, 2007). É reportado na literatura quatro compostos derivados do furfural em alimentos processados: HMF (5-hidroximetilfurfural); F (2-furaldeído); FMC (2-furilmetilcetona) e MF (5-metil-2-furaldeído), nos quais as estruturas são apresentadas na figura 9. F, FMC e MF são menos comuns e podem se formar através de vias de interconversão, a partir do HMF, em estágios mais avançados da RM (CHÁVEZ-SERVÍN *et al.*, 2005).

Figura 1 - Estruturas químicas do HMF (5-hidroximetilfurfural); MF (5-metil-2-furfuraldeído); F (2-furaldeído); FMC (2-furil-metilcetona).



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

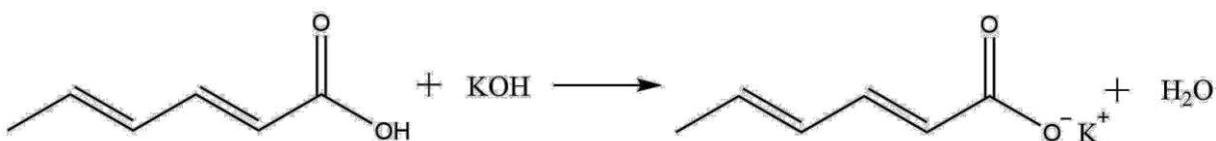
3.3 ÁCIDO SÓRBICO E SEUS SAIS COMO CONSERVANTES ALIMENTÍCIOS

A substituição da nutrição *in natura* por processada/industrializada está cada vez maior devido às mudanças nas rotinas alimentares, falta de tempo e, conseqüentemente, a necessidade de maior vida útil desses produtos. Por essa questão, o uso de aditivos com diferentes funções nos alimentos tem recebido atenção na indústria desse setor, pois podem ser adicionados para melhorar os atributos de qualidade, bem como para promover a segurança alimentar. (BIMPIZAS-PINIS *et al.*, 2022; TFOUNI & TOLEDO, 2002).

O AS é um tipo de aditivo alimentar da classe dos conservantes. Foi isolado pela primeira vez por volta de 1859 pelo químico alemão August Wilhelm von Hoffmann (1818-1892), a partir de frutas verdes de uma árvore chamada sorveira, *Sorbus aucuparia*, de onde provém seu nome. Seu potencial como agente antimicrobiano foi descoberto 70 anos mais tarde e, desde então, AS e seus sais são utilizados como conservantes em uma variedade de alimentos (THOMAS & DELVES-BROUGHTON, 2014).

O ácido 2,4-hexadienóico, nomenclatura oficial do AS, é um ácido graxo insaturado de ocorrência natural e seu sal sorbato pode ser sintetizado a partir de uma reação ácido-base comum, como por exemplo, o sorbato de potássio pode ser originado da reação do AS com hidróxido de potássio (figura 2).

Figura 2 - Obtenção do sorbato de potássio a partir do ácido sórbico



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

É importante ressaltar que AS e sorbato de potássio não são quimicamente a mesma substância, mas ambas são usadas com a função conservante. Por essa questão, cada uma vai possuir propriedades distintas e apresentará um comportamento específico, dependendo do meio ao qual essas moléculas forem submetidas. O sal de potássio é mais comumente usado porque é mais estável, fácil de produzir e bem mais solúvel que a forma ionizada, mas o AS é mais citado, pois as

legislações comumente abordam os limites máximos permitidos em relação à concentração do ácido. Isso porque o conservante atua com maior poder antimicrobiano/antifúngico em pH baixos e a espécie que predomina nessa situação é o ácido, devido ao equilíbrio químico (THAKUR *et al.*, 1994; SILVA & LIDON, 2016; (ANUROVA *et al.*, 2019). A tabela 1 apresenta algumas propriedades físico-químicas de ambas substâncias.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do ácido sórbico e seu sal de potássio.

Parâmetros	Ácido sórbico	Sorbato de potássio
Fórmula molecular	CH ₃ CHCHCHCOOH	CH ₃ CHCHCHCOOK
Massa molecular (g/mol)	112,13	150,22
pK _a	4,76	-
Temp.de fusão (°C)	132–137	Decompõe > 270
Solubilidade % (m/v)		
em água a 20 °C	0,15	58,2
em água a 100 °C	4,00	64,0

Fonte: Adaptado de THOMAS & DELVES-BROUGHTON (2014).

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO da sigla em inglês) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) permitem uma concentração máxima de ácido benzóico e AS até 1000 mg.kg⁻¹ em alimentos e bebidas e uma concentração máxima de 3000 mg.kg⁻¹ para ácido propiônico em alimentos (TUNGKI JANANSIN *et al.*, 2020).

Com relação a toxicidade, o AS é um dos conservantes com menos malefícios ao consumidor. É usado em quantidades nas quais nenhum efeito adverso à saúde é conhecido e sua rotulagem nas declarações dos ingredientes é feita como sorbatode potássio ou aditivo alimentar número E202. Estudos que já avaliaram a atividade toxicológica dessa substância demonstraram que ele é metabolizado através do ciclo da β -oxidação dos ácidos graxos de forma semelhante ao que se verifica para os ácidos graxos de origem natural. Assim, pode-se considerar sua baixa toxicidade devido à degradação do conservante por meio de vias metabólicas naturais do nosso organismo (TFOUNI & TOLEDO, 2002; THAKUR *et al.*, 1994; THOMAS & DELVES-BROUGHTON, 2014; WALKER, 1990).

3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Já foi citado que o AS não apresenta alta toxicidade para os humanos, no entanto, a ingestão frequente de doses superiores às doses recomendadas pelos órgãos reguladores poderiam acarretar reações adversas. Dessa forma, é importante desenvolver métodos analíticos para monitorar os níveis dos conservantes nos alimentos e avaliar o cumprimento dos limites máximos impostos pela legislação e, assim, garantir aos consumidores que os produtos adquiridos estão seguros para consumo (COSTA, 2015). O processo de desenvolvimento de um novo método analítico depende de alguns fatores, como o equipamento disponível no laboratório, a complexidade da matriz e a possibilidade de aplicação do método. (COSTA, 2015; DIAS, 2019).

Para controle de qualidade, a CLAE é muito usada por ser um dos métodos mais eficientes na separação de compostos, altamente específica e robusta, permitindo a detecção de múltiplos analitos, alta resolução, identificação de substâncias usando mínimas quantidades de amostras, capacidade de obter resultados com alta precisão em dias e condições diferentes. A cromatografia é uma técnica de separação que permite determinar a composição de misturas complexas de diversas substâncias químicas, com grande eficiência e reprodutibilidade. A CLAE, ou da sigla em inglês mais comumente conhecida por HPLC (*high performance liquid chromatography*), é um método analítico de separação dos componentes entre duas fases que estão em contato: fase estacionária e fase móvel. Esse tipo de cromatografia usa pressões elevadas para forçar a passagem do solvente por colunas fechadas, a coluna cromatográfica, que contém partículas muito finas capazes de proporcionar separações muito eficientes (RIBANI, 2004; HARRIS, 2008).

Um cromatógrafo, para esse tipo de análise, geralmente é composto por um sistema de reservatório de fase móvel, sistema de bombeamento de fase móvel, sistema de injeção, compartimento da coluna cromatográfica, sistema de detecção (UV-Vis, fluorescência, espectrofotometria de massas, etc.) e sistema de aquisição e registro de dados, um computador com *softwares* específicos (HARRIS, 2008).

Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela coluna, resultando em eluições diferentes desses componentes. Ou seja, a forma como cada analito interage com a coluna define seu

tempo de retenção nesta. Esse tipo de interação está relacionado com apolaridade das substâncias, por exemplo, uma coluna do tipo C18 é preparada com octadesilsilano de altíssima qualidade e é uma das fases mais apolares, ou seja, mais hidrofóbica, existente em cromatografia líquida. Assim, analitos mais polares interagem menos com a coluna e eluem mais rápido, e analitos mais apolares são mais retidos pela fase estacionária (COLLINS, 2009; BORGES *et al.*, 2010).

3.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de um método analítico é fundamental para assegurar a credibilidade dos resultados, principalmente se tratando de técnicas de separação, como a cromatografia líquida de alta eficiência, seguindo as exigências analíticas de órgãos regulamentadores como a ANVISA. Validar um processo, equipamento, sistema ou metodologia é o tornar legítimo, em outras palavras, significa garantir que análise sempre trará resultados confiáveis, e os produtos ou substâncias ativas, que dependem dessa análise, sempre estarão com a mesma qualidade e dentro dos limites de tolerância, rigorosamente pré-estabelecidos (RIBANI *et al.*, 2004; VALENTINI *et al.*, 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nas seções seguintes, serão apresentados os esquemas de produção das amostras e as ferramentas analíticas aplicadas para as análises dessas matrizes.

4.1 ÁCIDO SÓRBICO

Na seção 4.1 será apresentada a metodologia referente a avaliação da estabilidade térmica do sorbato de potássio em doce de leite e em solução modelo (água e açúcar).

4.1.1 Parâmetros analíticos e cromatográficos

A separação e quantificação do analito de interesse, ácido sórbico, foi realizada utilizando RP-HPLC. Foi utilizada uma coluna Luna C18 4,6 x 250 mm (5 µm) marca Phenomenex e um cromatógrafo da marca Waters HPLC modelo 1525 Detector (PDA - Photodiode Array Detector), equipado com uma bomba binária. O tempo necessário para cada análise foi de 15 minutos e o volume de injeção de 20 µL. As amostras de DL e soluções modelos foram preparadas para permitir a determinação e quantificação de AS de acordo com a ISO 9231| IDF 139. Para a validação desta metodologia, os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), precisão, limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram avaliados seguindo os critérios da Resolução da Diretoria Colegiada, RDC nº 166, de 24 de julho de 2017.

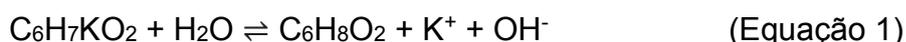
4.1.2 Produção dos doces de leite

As amostras de doce de leite foram produzidas em escala laboratorial a partir de um sistema desenvolvido que simula dispositivos de evaporação industrial, desenvolvido e implementado pelo próprio grupo de pesquisa no qual o projeto foi conduzido. O sistema é composto por um evaporador de bancada Thermomix® TM5 (Vorwerk, Wuppertal, Alemanha) acoplado a um processador de carga (Ramuza IDR 7.500, Santana de Parnaíba, Brasil) com 1 g de precisão, sensor de temperatura PT-100 e uma balança para acompanhar a perda mássica de água. O tempo requerido para cada evaporação foi, em média, 103 minutos e a temperatura usada foi a opção “Varoma” (temperatura do processador de bancada Thermomix® TM5), que

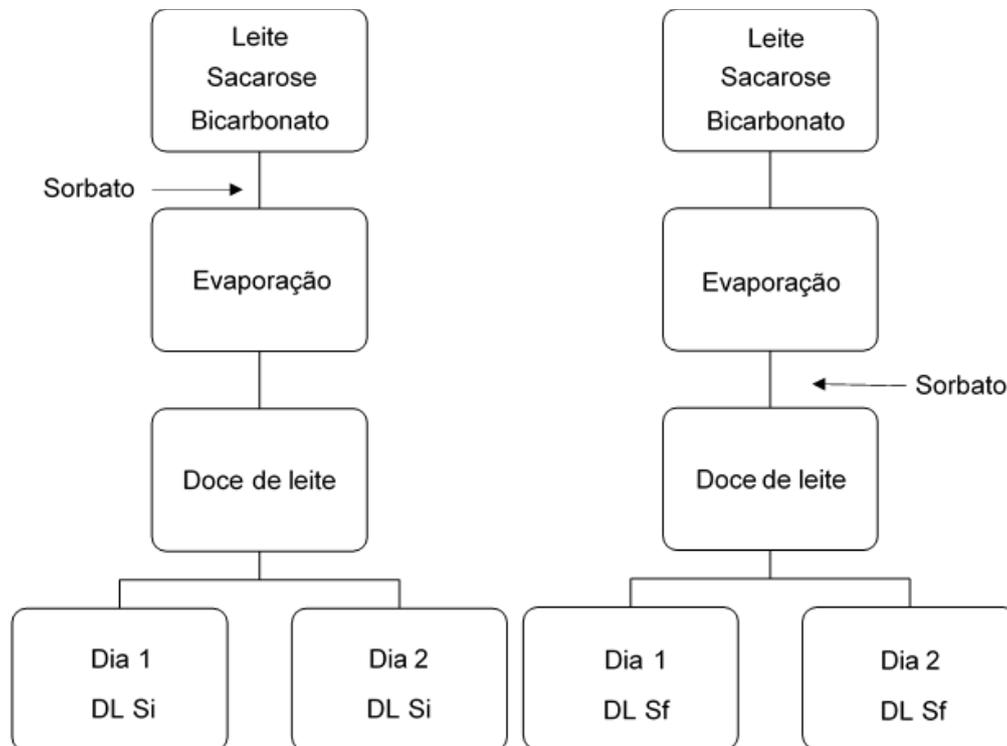
corresponde a 120°C.

As massas de cada ingrediente usado foram escolhidas de acordo com o descrito por dos Anjos Pinto *et al.* (2021), bem como as condições de tempo e temperatura empregadas. Dois pontos de adição do conservante foram investigados (destaca-se que sempre era adicionado o sal do conservante, devido à maior solubilidade e usabilidade, como já mencionado): a) primeiro momento sorbato adicionado (600 mg/kg) simultaneamente com sacarose no leite, seguido de bicarbonato de sódio para regular o pH até 7,0, no início da produção antes do tratamento térmico; e b) após o tratamento térmico, uma vez terminado o processo de evaporação e antes do envase do produto.

O experimento foi repetido, para as duas rotas de produção propostas, em dias diferentes, dando um total de 4 amostras de DL Si (com sorbato ao início) e 4 amostras DL Sf (sorbato ao final), tendo cada amostra de DL 2 preparações independentes que antecedia a análise no RP-HPLC (Esquema 1). O preparo de amostra para esse tipo de matriz contempla várias etapas para clarificá-la sem perder o analito de interesse, como aquecimento, ajuste de pH, precipitação de proteínas e gorduras, dissolução em solvente específico, centrifugação e filtração. É importante considerar que apenas 74,5% do sorbato de potássio (150,22 g/mol) é convertido para AS (112,12 g/mol) (Equação 1). Dessa forma, para um DL com 600 mg/kg de AS, será necessário adicionar 803 mg de sorbato de potássio com 100% de pureza.



Esquema 1- Rotas de produção das amostras de doce de leite. (n=2)



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

4.1.3 Produção das soluções modelo

As soluções modelo foram assim denominadas por se tratar de misturas que foram produzidas de forma análoga aos DL, mas usando a água em substituição ao leite. O procedimento “083/IV Conservadores – Identificação de ácido sórbico e sorbatos”, do Instituto Adolfo Lutz, “Métodos físico-químicos para análise de alimentos” (2008), foi usado por muito tempo para determinar AS e seus sais em amostras de alimentos. Nesse procedimento, o sorbato é convertido em AS após acidulação do meio e extraído das amostras por destilação com arraste de vapor d’água e, posteriormente, identificado por cromatografia em papel ou com ácido tiobarbitúrico.

Esse procedimento sugere que a substância conservante é carregada pelo vapor, já que a separação é feita por uma destilação desse tipo, mas como o meio é acidificado, a substância que evapora de fato é o AS, e não o sorbato de potássio. Considerando o equilíbrio químico que existe entre as espécies AS e sorbato, sendo o sorbato a base conjugada do ácido, é possível inferir que o fato de a substância ser evaporada com a água ou não esteja relacionado ao pH do meio, já que o pH, nessa metodologia

descrita pelo Instituto Adolfo Lutz é ácido, diferente da característica do meio reacional na produção de doce de leite, que possui pH em torno de 6,6-6,7, e nesse pH a espécie predominante é o sorbato.

A equação de *Henderson-Hasselbalch* (2) explica esse equilíbrio químico relacionando matematicamente o pH de uma solução tampão, o logaritmo negativo da constante de acidez (pK_a) e as concentrações da forma ácida e da sua base conjugada. Através dela, é possível, então, prever qual espécie estará em maior concentração no meio, associando o pH da solução e o pK_a do ácido (VOLGYI *et al.*, 2010).

$$pH = pKa + \log_{10} \frac{[A^-]}{[HA]} \quad \text{Equação 2}$$

Sendo, $[A^-]$ é a concentração da base conjugada, o sal e $[HA]$ é concentração do ácido.

Trazendo para o contexto desse estudo e sabendo que o pK_a do AS 4,76, tem-se a seguinte relação:

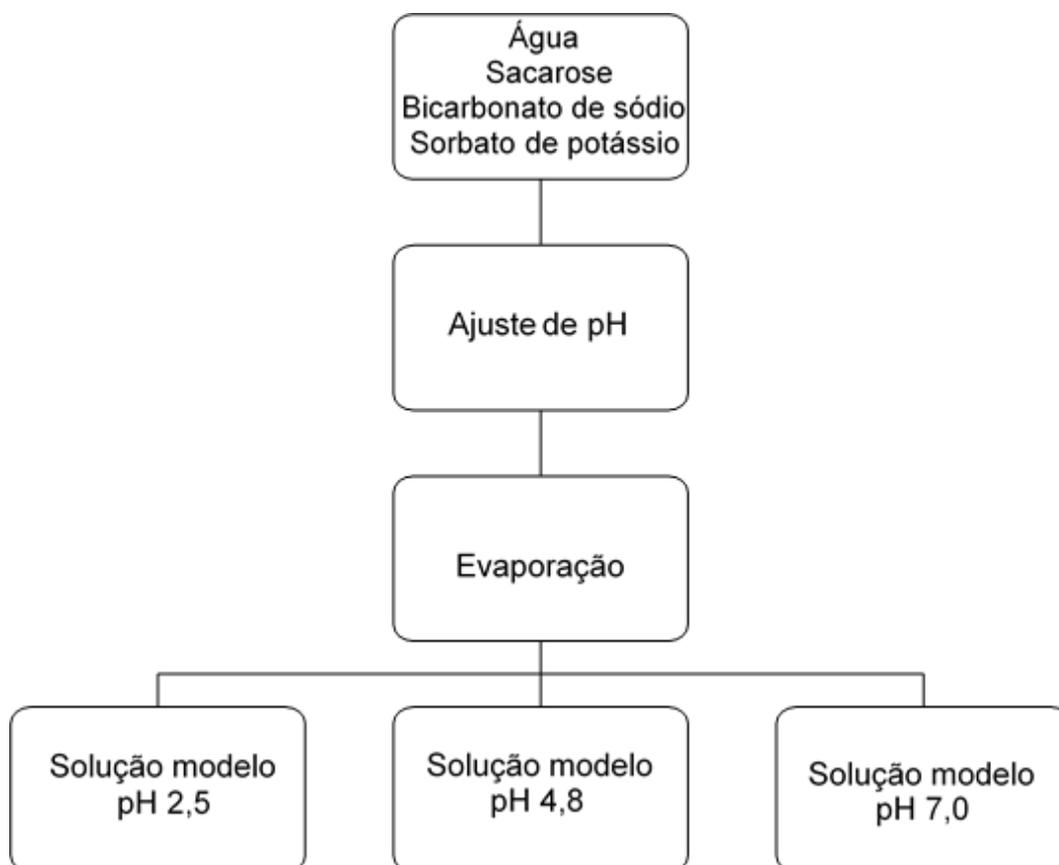
Se $pH = pK_a$, então $[\text{sorbato}] = [\text{ac. sórbico}]$;
 $pH > pK_a$, então $[\text{sorbato}] > [\text{ac. sórbico}]$;
 $pH < pK_a$, então $[\text{sorbato}] < [\text{ac. sórbico}]$;

Assim, foi investigada a estabilidade térmica do AS com variação de pH de acordo com a relação apresentada, ou seja, pH igual ao pK_a (4,8), pH maior que o pK_a (7,0) e pH menor que o pK_a (2,5). Assim, as soluções modelo foram preparadas em matriz não láctea para que fosse possível variar o pH de cada uma delas (a aplicação do leite nesse caso seria inviável, pois em pHs muito baixos ocorreria coagulação devido à precipitação das proteínas). O ajuste do pH foi feito adicionando quantidade suficiente de ácido láctico 85% (m/v), monitorado por pHmetro. O procedimento de fabricação foi similar à produção dos doces de leite, usando o evaporador de bancada, a mesma quantidade de açúcar, bicarbonato de sódio e água igual a quantidade de leite usada anteriormente, mesmo tempo e temperatura de evaporação. A adição do sorbato foi realizada em apenas um momento, sendo ao início do processo junto aos demais ingredientes, já que o intuito dessa etapa era que a molécula passasse pelo aquecimento em diferentes pHs.

A mistura era concentrada até atingir cerca de 40 °Brix, novamente

determinado pelos cálculos prévios de balanço de massa e monitorado pela balança acoplada ao sistema de evaporação. Após a produção das misturas, estas eram igualmente submetidas ao preparo de amostra, de acordo com a ISO 9231| IDF 139, para serem posteriormente injetadas no HPLC sobre as mesmas condições cromatográficas já descritas. Foram três semanas de experimentos, com 2 preparos de amostra independentes para cada pH, injetados no equipamento uma vez cada, totalizando 18 injeções, de acordo com o esquema 2.

Esquema 2- Rotas de produção das soluções modelo com os pHs ajustados ao início (n=3).



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

4.1.4 Ensaio de recuperação de ácido sórbico em doce de leite com diferentes marcas de leite

Esta avaliação é necessária, já que a matriz de estudo, DL, é considerada complexa. A matriz complexa, segundo a ANVISA, é aquela que contém um número indefinido de substâncias não monitoradas, que não podem ser obtidas sem a

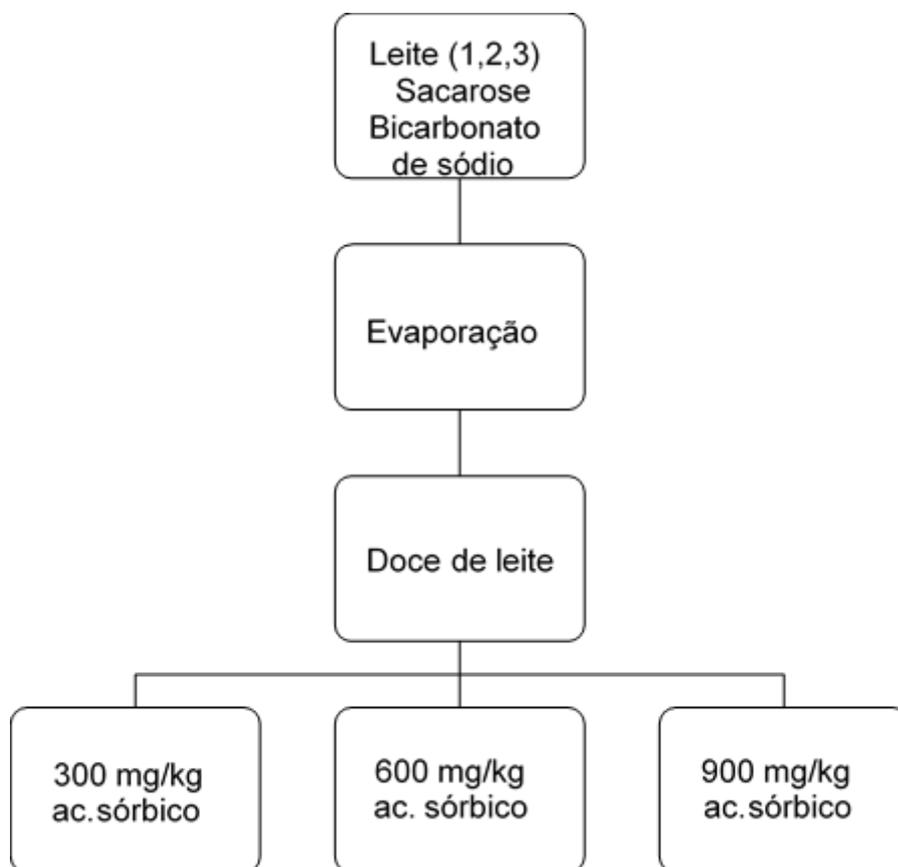
presença do analito. A matriz láctea pode ser considerada complexa por possuir os componentes do leite como proteínas, gorduras, sais, açúcares, que podem interagir com analito de forma que prejudicaria a sua identificação e quantificação (BRASIL, 2017).

A determinação da taxa de recuperação estabelece a porcentagem do analito que fica retida na matriz de trabalho. Esse ensaio foi conduzido testando 3 marcas diferentes de leite pasteurizado integral, obtidos no comércio local de Juiz de Fora. Após a obtenção dos leites, juntamente com a sacarose e bicarbonato de sódio, os doces de leite eram fabricados como descrito no tópico 4.2, com a diferença da adição de sorbato. O sorbato de potássio, nesse procedimento, foi adicionado no momento do preparo da solução amostra, ou seja, após a pesagem dos doces para as etapas de preparo que antecedem a injeção no HPLC.

Foi optado por trabalhar dessa forma para evitar quaisquer perdas do conservante relacionada ao processo de fabricação dos DL. As quantidades de sorbato adicionadas às amostras foram calculadas para atingirem 3 concentrações de AS sobre a massa pesada (3,0 g de amostra). Para isso, foi necessário levar em consideração o fator de correção das massas molares do sorbato e AS (0,745). Foram elas: baixa 300 mg/kg; média 600 mg/kg e alta 900 mg/kg. Essas concentrações foram escolhidas com base na legislação que permite o limite máximo de 600 mg/kg de AS em DL para uso comercial, e duas concentrações (uma abaixo e outra acima) para determinar os limites da análise.

Cada concentração foi preparada 3 vezes, de formas independentes, para cada doce de leite produzido com as três marcas diferentes, e o branco da amostra também foi analisado (amostra sem adição de sorbato). Essas 4 variações (branco e fortificados) foram injetados 1 vez e 2 vezes cada no HPLC, respectivamente, totalizando 63 injeções, como mostrado no esquema 3.

Esquema 3 – Procedimento experimental para determinação da taxa de recuperação (n=3).



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A recuperação foi expressa pela relação percentual do analito de concentração experimental (C), obtida através da quantificação no HPLC e a concentração teórica do analito adicionado na amostra (CTA), conforme equação 3.

$$\text{Rec (\%)} = \frac{C(\text{adicionada na amostra}) - C(\text{amostra}) \times 100}{CTA(\text{Teórico})} \quad \text{Equação (3)}$$

4.2 REAÇÃO DE MAILLARD

Na seção 4.2 será apresentada a metodologia desenvolvida para identificação e quantificação de 4 marcadores da RM em amostras comerciais de doce de leite.

4.2.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE DOCES COMERCIAIS

Foram adquiridas 11 amostras de DL e similares, de marcas diferentes, brasileiras e estrangeiras, em pasta e em barra, comuns ou *diets*, obtidas dos comércios locais ou pela internet. Essas amostras foram direcionadas para os estudos com os 4 marcadores da RM.

4.2.2 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE INDICADORES DA REAÇÃO DE MAILLARD

O desenvolvimento do método para essa análise foi adaptado dos trabalhos dos autores Chávez-Servín, *et al.* (2005) e Lund *et al.* (2022), que investigaram a presença dos analitos HMF, F, FMC e MF também em amostras lácteas. Para determinar o melhor método, ou seja, aquele que contempla um tratamento de amostra sem influenciar na concentração do analito de interesse, foram testadas diferentes concentrações dos agentes precipitadores de proteínas.

Os compostos furfurais podem ser medidos por espectrofotometria com ácido tiobarbitúrico (TBA). Todavia, há desvantagem nesse método colorimétrico, já que ele não é específico para a detecção dos furfurais pela falta especificidade ao reagente cromogênico TBA. Além disso, a reação medida colorimetricamente é instável, a qual gera resultados variáveis e, por isso, necessita de um rigoroso controle de tempo. Assim, técnicas como HPLC podem ser usadas para uma medição mais precisa e confiável de furfural em produtos alimentícios. É válido destacar que há uma diferenciação dos furfurais livres e totais, nos quais os totais incluem os furfurais livres, vinculados às proteínas (como os produtos Amadori) e aqueles formados a partir de precursores. Os livres representam o teor dos compostos atual na amostra e a diferença de procedimento está no aquecimento, que é necessário para determinar os furfurais totais, como se fosse forçado um prolongamento da reação, além do estágio que ela se encontra.

O procedimento foi desenvolvido para determinar furfurais livres e se deu da seguinte forma: 1g de de uma solução de DL 1% (v/v) foi misturado por vórtex por 20 segundos com 200 µL de água ultra-pura. Em seguida, 300 µL de 55% (m/v) de ácido

tricloroacético (TCA) foi adicionado e misturado por vórtex durante 20 segundos e posterior centrifugação por 10 minutos. Depois disso, 500 µL do sobrenadante foi coletado e misturado novamente pelo vórtex com 100 µL de água ultra-pura e 300 µL de ácido tricloroacético (TCA) de 55% (m/v). As amostras foram centrifugadas por 20 minutos e o sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro 0,22 µm, para posterior injeção no RP-HPLC.

4.2.3 PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

A separação e quantificação dos analitos de interesse (HMF, F, FMC e MF) foram realizadas utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa marca Waters, modelo 1252, detector DAD - Diode Array Detector e equipado com uma bomba binária. A análise foi feita em modo de eluição gradiente (quadro 1), com uma fase móvel composta de água e acetonitrila (ACN) na proporção inicial de (95,5:4,5) H₂O: ACN, mantendo vazão constante de 1 mLmin⁻¹. A separação cromatográfica empregou uma coluna Waters Spherisorb (150 mm × 4,6 mm; tamanho de partícula de 3 µm), a 30°C. O volume de injeção foi de 20 µL e HMF, F, FMC E MF serão detectados a um comprimento de onda de 284 nm. Os comprimentos de onda e tempos de retenção para cada HMF, F, FMC, MF, foram, respectivamente descritos no quadro abaixo.

Quadro 1 - Modo de eluição gradiente

Tempo (min)	Fluxo (mL.min ⁻¹)	% H ₂ O	% ACN
-	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: Elaborada pela autora (2023).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas próximas seções serão apresentados e discutidos os resultados referentes ao primeiro capítulo na matriz doce de leite.

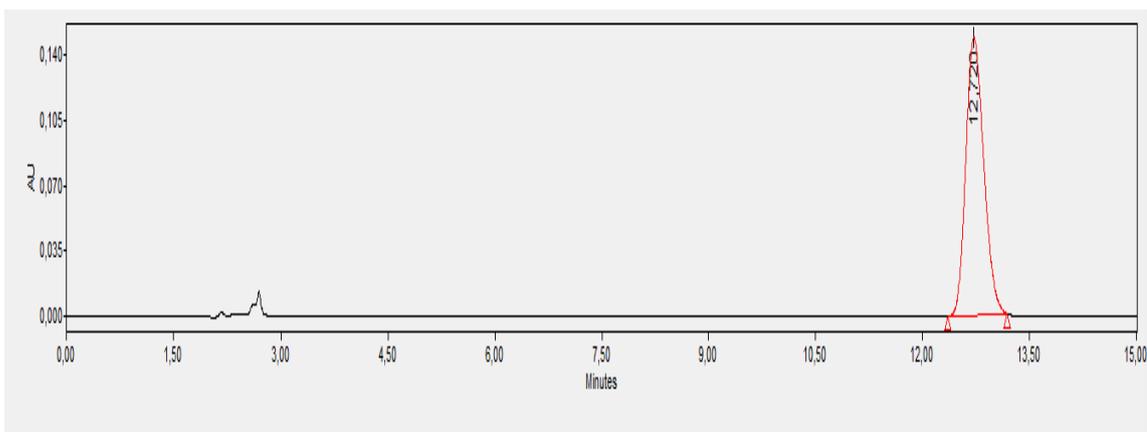
5.1 ÁCIDO SÓRBICO

Nas seções 5.1 serão apresentados e discutidos os resultados da validação e da quantificação do ácido sórbico em doce de leite

5.1.1 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ISO 9231| IDF 139

Esta validação envolveu o método analítico para determinação do conteúdo de ASem doce de leite pastoso, conforme adaptações da metodologia analítica da ISO 9231| IDF139 de 2008. Para isso, foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção e quantificação e taxa de recuperação (CONSTANTINO, 2013) conforme a RDC N° 166, de 24 de julho de 2017. O gráfico 1 apresenta um cromatograma obtido para o padrão de AS na concentração de 50µg/mL empregando a RP-HPLC.

Gráfico 1 - Cromatograma do padrão de ácido sórbico



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

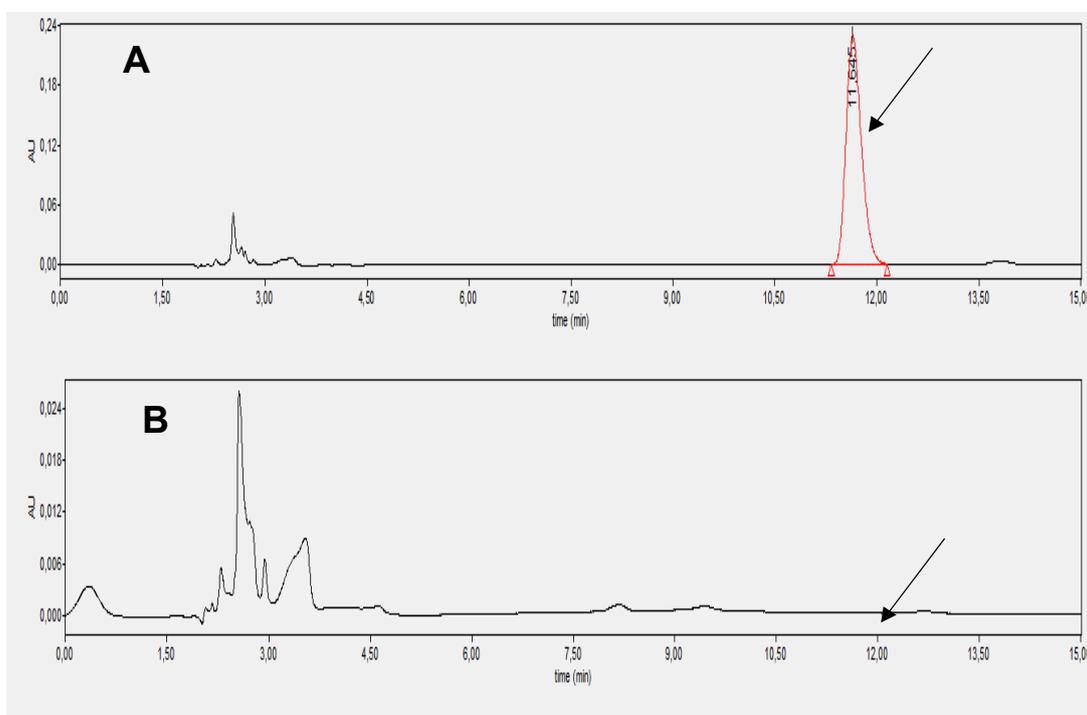
A coluna cromatográfica usada possui um perfil hidrofóbico, ou seja, mais apolar e como AS é um ácido carboxílico que possui uma cadeia carbônica de 6 carbonos, este é mais solúvel em solventes orgânicos e, conseqüentemente, interage mais

tempo com a fase estacionária, o que explica seu tempo de retenção ser próximo ao final da corrida.

5.1.2 SELETIVIDADE

A seletividade foi comprovada através da equivalência do tempo de retenção para o AS como padrão externo e também presente nas amostras, bem como pelo aumento da área do pico em amostras fortificadas. Não houve interferência comprovada pela ausência de resposta analítica nos tempos de retenção do AS, quando injetado o branco, ou seja, a amostra de doce de leite sem sorbato. É possível perceber que o pico do AS sai com um tempo de retenção próximo a 12 minutos na amostra, com alta resolução e sem sobreposição de outros picos, mostrando que no tratamento de amostra foi eficiente retirar os possíveis interferentes e manter o analito de interesse estável para a análise (gráfico 2).

Gráfico 2 - Cromatogramas das amostras de doce de leite (A) com sorbato de potássio; (B) amostra sem sorbato de potássio.

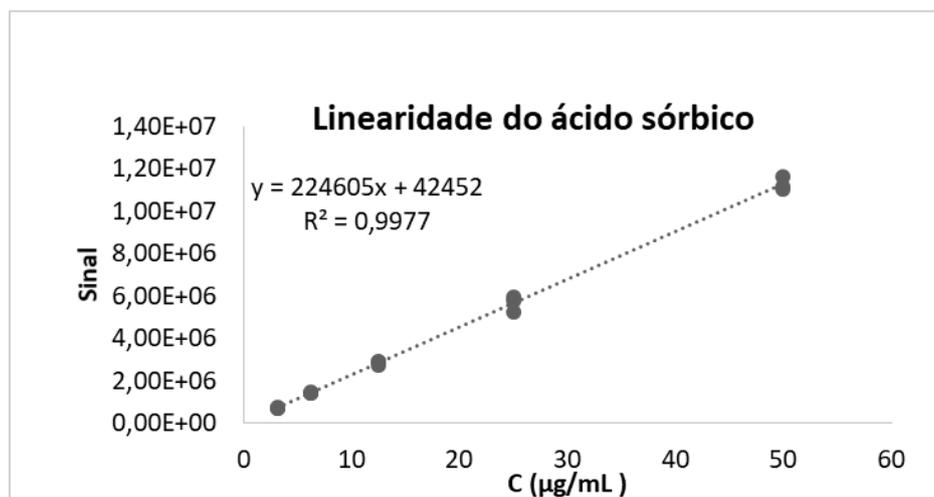


Fonte: Elaborada pela autora (2023).

5.1.3 LINEARIDADE

Sob as condições cromatográficas do método em implementado, foi verificada uma relação linear na faixa de 3,12 - 50 µg/mL de soluções padrão de AS, por análise de variância da regressão (r^2). Para todos esses compostos, os valores r^2 foram $>0,99$ em 5 níveis (gráfico 3).

Gráfico 3 - Resposta analítica em função da concentração da substância



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

5.1.4 SENSIBILIDADE

Para determinar a sensibilidade do método, o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ), foram estudados seguindo os critérios da RDC N° 166, de 24 de julho de 2017. Esses dois limites foram determinados pelo erro associado ao coeficiente angular da curva analítica, descritos nas equações 4 e 5, sendo 0,717 µg/mL o LD e 2,171 µg/mL para LQ.

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC} \quad \text{Equação (4)}$$

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC} \quad \text{Equação (5)}$$

Sendo:

σ : desvio padrão

IC: Inclinação da curva

5.1.5 PRECISÃO E EXATIDÃO

A precisão foi expressa por meio da repetibilidade a fim de avaliar as amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação em uma única corrida analítica. Foram realizadas 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, sendo elas 3 concentrações: baixa, média e alta, com 3 réplicas em cada nível, conforme exposto na tabela 2. Os critérios de aceitação são DPR menor que 5 para precisão e intervalo de 90 a 110% para medida de exatidão. Sendo assim, os resultados obtidos podem ser aceitos.

Tabela 2 - Resultados do ensaio de precisão e exatidão pelo método da repetibilidade

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (DPR*)	Exatidão (%)
5	0,66	93,62 – 95,55
20	1,37	96,00 - 98,72
40	2,04	97,96-101,86

*Desvio Padrão Relativo

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A precisão foi expressa também por meio da precisão intermediária com a finalidade de expressar a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes. Foram contemplados as mesmas concentrações e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade (tabela 3).

Tabela 3 - Resultados do ensaio de precisão pelo método da precisão intermediária

Concentração (µg/mL)	Precisão (DPR*)	Exatidão (%)
5	2,91	87,38 - 94,55
20	2,09	96,00 –101,52
40	2,98	97,96-105,43

*Desvio Padrão Relativo

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

O método implementado e validado conforme adaptações da metodologia analítica da ISO 9231|IDF 139 de 2008, empregando RP-HPLC, mostrou-se adequado para quantificação de AS em DL. O tratamento estatístico demonstrou que o método pode ser considerado preciso, seletivo, linear dentro de uma ampla faixa de trabalho, exato com recuperação maior que 89% e sensível, apresentando limites de detecção e quantificação compatíveis com a curva analítica e amostras analisadas.

5.1.6 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁCIDO SÓRBICO NO DOCE DE LEITE EM FUNÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO

As determinações das concentrações de AS foram obtidas através da curva analítica, seguindo a faixa de trabalho descrita no tópico de linearidade. A tabela 4 apresenta os resultados das concentrações de AS na matriz láctea. Os resultados são uma média de 4 valores, considerando os preparos de soluções amostra e as injeções no equipamento.

Tabela 4 - Concentrações teóricas e experimentais amostras de DL com sorbato ao início e ao final

Amostra	Conc.teórica (mg/kg)	Conc.exp (mg/kg)	Exatidão (%)
Doce Si*(pH 6,6)	585,10 ± 2,41	597,66 ± 15,68	99,08-104,17
Doce Sf (pH 6,7)	649,14 ± 11,59	635,26 ± 18,13	93,98-103,85

*Si: sorbato adicionado ao início; Sf: sorbato adicionado ao final.

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Na fabricação de DL, o leite e o açúcar (sacarose) são aquecidos e concentrados e o pH alcançado ao final do processamento é ligeiramente menor, se comparado ao da mistura inicial, devido ao efeito de evaporação nos equilíbrios salinos e também à reação de Maillard e ao efeito de tamponamento do leite. Os resultados da tabela 4 mostraram mais de 93% de exatidão para ambas amostras analisadas, com sorbato adicionado ao início do processo e ao final, indicando que a concentração obtida experimentalmente foi próxima da concentração teórica adicionada. A literatura reporta que o sorbato poderia perde-se com o aquecimento e, dessa forma, sua concentração final seria menor que a concentração inicial esperada, e, daí, partiria a usual recomendação de adicionar essa substância ao final da fabricação. Porém, os resultados dessa quantificação revelaram que, neste doce desenvolvido em escala laboratorial e nas condições reacionais nas quais a matriz e seus componentes foram impostos (tempo de aquecimento, temperatura e pH), não houve perda significativa do conservante com a evaporação que justificasse a sua adição ser ao final do processo, já que mais de 93% do analito foi recuperado através dos cálculos.

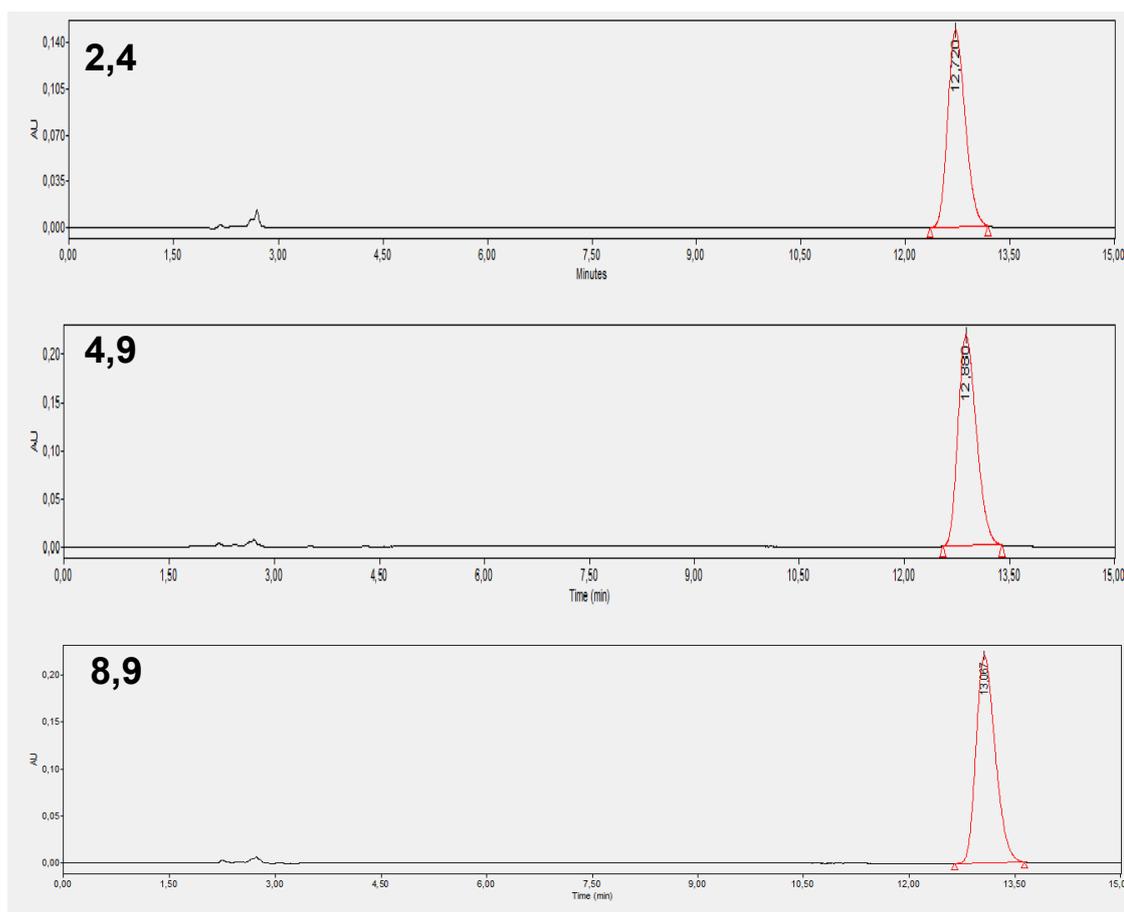
Alguns estudos já publicados com AS e seus sais corroboram com esses resultados. Dollimore e O'Connell (1998) investigaram por termogravimetria o comportamento térmico de conservantes, dentre eles o AS, aplicados a uma rampa de aquecimento de 10°C por min e verificaram que ele “evaporou” parcialmente por um mecanismo cinético de ordem zero, no ar seco, a uma temperatura constante de 135°C. De Jesus *et al.* (2021) determinaram a estabilidade térmica e o processo de degradação do AS e seus sais, por meio de análises também termogravimétricas, e viram que o AS é facilmente sublimado mesmo em temperaturas relativamente baixas (80–134 °C) e, no caso do sorbato, embora a decomposição tenha ocorrido em temperaturas mais altas, mudanças sólido-sólido foram encontradas em cerca de 160 °C. Torres *et al.*, 1989 verificaram a estabilidade de AS durante processamento e armazenamento de queijos e identificaram que um tratamento térmico de 2 horas a 85°C não resultou em nenhuma perda detectável de sorbato de potássio.

5.1.7 ANÁLISE DO CONTEÚDO DE ÁCIDO SÓRBICO NAS SOLUÇÕES MODELO

O gráfico 4 apresenta os cromatogramas obtidos nas injeções das soluções amostra nos três pH analisados. Devido à falta de capacidade tamponante (ausência

do componente lácteo) o pH final alcançado, em média, para 2,5 foi 2,4, para 4,8 foi 4,9 e para 7,0 foi 8,9. Esses resultados de pH, entretanto, não afetam o propósito do experimento, no qual a forma básica permaneceu como sal (sorbato de potássio) e a forma ácida como um ácido (AS), considerando a pka 4,8.

Gráfico 4 - Cromatogramas das soluções modelo nos três pH analisados



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A mudança de pH, após o aquecimento das soluções do modelo aquoso a pH abaixo de 5,0, foi menor em comparação com a mudança observada na amostra ajustada a pH 7,0. A tabela 5 mostra os valores médios e sua correspondente faixa de exatidão obtida para o AS a partir da análise cromatográfica. É notável que no menor (2,5) e maior (7,0) pH foram obtidas as menores e maiores taxas de recuperação, respectivamente. Isso é atribuível ao equilíbrio químico e às quantidades de formas não dissociadas e dissociadas existentes nos respectivos valores de pH, e é uma forte indicação de que em valores mais baixos de pH a forma ácida foi, de

alguma forma, afetada pelo tratamento térmico aplicado.

Isso significa que ocorrem perdas de AS se o pH for baixo em combinação com o tempo de processamento e a temperatura. O pH baixo, provavelmente, torna possível perdas por evaporação da temperatura e da água, porque se forma mais mols da formião dissociada (ácido) que pode, então, ser afetada pelo processamento, reduzindo, assim, sua concentração na amostra.

A conclusão acima é apoiada pelos resultados recentes de De JESUS *et al.* (2021) sobre tratamento térmico e (perdas) das espécies AS e sorbato de potássio. Vale ressaltar que, em uma matriz aquosa, quase não existem possibilidades de retenção para o analito em comparação com a matriz de leite, como nas amostras de DL.

Tabela 5 - Concentrações de ácido sórbico nas soluções modelo

Amostra	Conc.teórica (mg/kg)	Conc.exp (mg/kg)	Exatidão (%)
pH 2,4*	617,08 ± 39,45	396,6 ± 8,63	61,23-71,14
pH 4,9*	677,01 ± 9,27	551,49 ± 54,04	74,51-89,71
pH 8,9*	604,91 ± 56,11	622,93 ± 73,08	97,76-105,87

*pH final após a produção da solução modelo.

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Esses resultados indicaram, então, que, para ocorrer perda significativa do conservante quando este é adicionado na forma de sal e passa por um tratamento térmico severo, o pH deve ser considerado, uma vez que foi mostrado que, em meio ácido, quimicamente tem-se o equilíbrio deslocado para formação da espécie protonada (não ionizada) e devido as suas propriedades físico-químicas, esta é capaz de ser perdida no processamento. Já o sorbato (espécie desprotonada), não é perdido durante o aquecimento na produção de DL porque o meio não favorece a conversão para AS e, pelas propriedades de soluções, a água evapora “sozinha” e o sorbato fica solúvel na fase aquosa da solução.

5.1.8 TAXA DE RECUPERAÇÃO

A tabela 6 apresenta os resultados das porcentagens de recuperação para as 3 marcas de leite e dos pHs após a fabricação.

Tabela 6 - Porcentagens de recuperação para as 3 marcas de leite

Concentração (mg/kg)	Marca do leite	%Recuperação	pH
300	1	121,19 ± 18,05	6,60
	2	88,49 ± 32,57	6,42
	3	127,39 ± 41,51	6,79
600	1	82,02 ± 7,53	6,62
	2	97,33 ± 7,92	6,50
	3	92,60 ± 11,40	6,67
900	1	85,12 ± 5,27	6,66
	2	94,16 ± 10,26	6,45
	3	93,48 ± 17,14	6,76

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Todas as concentrações obtiveram recuperações altas, nas quais é possível destacar que a concentração média de 600 mg/kg (a concentração limite permitida para DL) foi o melhor resultado obtido, com menor variação de desvio, seguido do resultado obtido para a concentração de 900 mg/kg.

Os resultados foram satisfatórios e salientaram que a marca do leite não interfere na determinação do AS após a fabricação do doce, já que independente da marca, o analito foi mais de 82% recuperado para todas.

Contudo, o efeito de matriz se fez presente em todas as concentrações em função da complexidade da matriz láctea já exposta anteriormente. Esse efeito deve ser considerado na determinação do conteúdo de AS nas amostras de doce de leite, ou seja, para uma concentração de 600 mg/kg, deve-se considerar que, em média, 9% do analito fica retido na matriz.

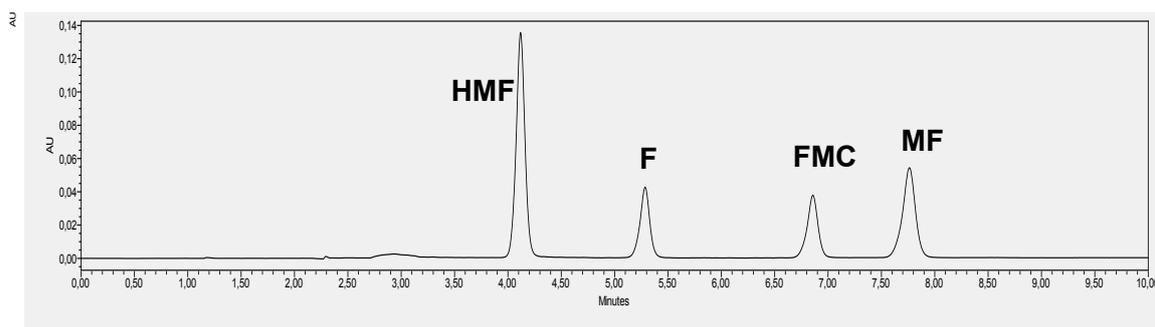
5.2 REAÇÃO DE MAILLARD

Nas seções 5.2 serão apresentados e discutidos os resultados referentes ao desenvolvimento, validação e determinação do conteúdo dos marcadores da reação de Maillard.

5.2.1 Validação da metodologia desenvolvida

O gráfico 5 mostra um cromatograma obtido para análise simultânea dos 4 marcadores da RM analisados. É possível observar que os picos estão bem definidos e separados, o que indica que a eluição da fase móvel foi eficiente para obter uma boa resolução do cromatograma.

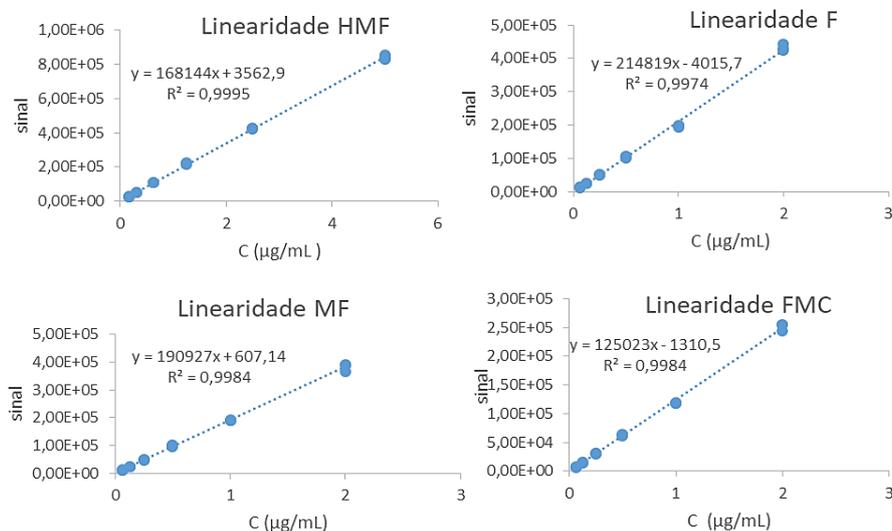
Gráfico 5 - Cromatograma dos 4 marcadores: HMF (5-hidroximetilfurfural); F (2-furaldeído); FMC: (2-furil-metilcetona); MF: (5-metil-2-furaldeído)



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Sob as condições cromatográficas do método desenvolvido, foi verificada uma relação linear na faixa de 0,16- 5 $\mu\text{g/mL}$ para HMF e 0,06 - 2 $\mu\text{g/mL}$ para F, FMC e MF, por análise de variância da regressão (r^2). Para todos esses compostos, os valores r^2 foram $>0,99$ em 6 níveis (gráfico 6).

Gráfico 6 - Linearidade dos 4 marcadores: HMF (5-hidroximetilfurfural); F (2-furaldeído); FMC: (2-furil-metilcetona); MF: (5-metil-2-furaldeído) (n=3)



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A precisão foi expressa por meio da repetibilidade e foram realizadas 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, para cada um dos 4 analitos estudados, considerando concentrações baixa, média e alta. As concentrações de análise são escolhidas arbitrariamente entre os pontos da curva analítica e os critérios de aceitação são DPR menor que 5 para precisão e intervalo de 90 a 110% para medida de exatidão. Logo, os resultados obtidos podem ser aceitos.

Tabela 7 - Precisão e exatidão para os 4 analitos

Analito	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (DPR*)	Exatidão (%)
HMF ¹	0,40	2,12	98,09-102,25
	1,75	1,46	94,40-97,22
	3,50	1,33	95,11-97,77
F ²	0,16	4,34	92,91-101,57
	0,70	2,61	102,96-108,15
	1,40	1,57	100,73-103,81
FMC ³	0,16	1,26	107,07-108,48
	0,70	1,40	90,13-92,92
	1,40	0,84	92,83-94,48
MF ⁴	0,16	4,18	99,83-107,70
	0,70	1,70	93,39-94,91
	1,40	1,48	93,31-96,14

¹HMF (5-hidroximetilfurfural); ²F: (2-furaldeído); ³FMC: (2-furil-metilcetona); ⁴MF: (5-metil-2-furaldeído).

*Desvio Padrão Relativo

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A sensibilidade foi determinada calculando LD e LQ para todos os analitos, novamente pelas equações 4 e 5, que levam em consideração parâmetros das curvas analíticas. Os resultados estão na tabela 8 e mostram que o método pode ser considerado sensível por conseguir detectar e quantificar concentrações mínimas de analito.

Tabela 8 - LD e LQ para os 4 marcadores

	HMF ¹	F ²	FMC ³	MF ⁴
LD (µg/mL)	0,041	0,030	0,042	0,042
LQ (µg/mL)	0,125	0,125	0,066	0,128

¹HMF (5-hidroximetilfurfural); ²F: (2-furaldeído); ³FMC: (2-furil-metilcetona); ⁴MF: (5-metil-2-furaldeído).

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

O ensaio de adição/recuperação foi realizado em todas as amostras, através da fortificação com concentrações conhecidas dos 4 analitos aos doces. A tabela 9 apresenta os resultados apenas para a recuperação do HMF, pois foi o único analito que esteve presente nas amostras, como será discutido no próximo tópico. As recuperações oscilaram de 74,13 até 107,47, o que indica que a matriz retém parte do analito, sendo esse efeito mais pronunciado em algumas amostras do que em outras. Contudo, os resultados indicam que o tratamento de amostra foi eficiente para eliminar possíveis interferentes, sem prejudicar a identificação do analito.

Tabela 9 - Percentual de recuperação de HMF nas amostras (n=2)

Amostra	% Recuperação
I	97,8 ± 3,6
II	99,1 ± 4,0
III	102,6 ± 3,4
IV	74,1 ± 3,6
V	79,0 ± 0,7
VI	107,5 ± 7,9
VII	86,9 ± 0,7
VIII	80,6 ± 3,8
IX	98,8 ± 3,4
X	95,7 ± 9,7
XI	103,9 ± 5,5

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

5.2.2 Determinação do conteúdo dos marcadores da reação de Maillard em doce de leite

Após o desenvolvimento do método para análise simultânea dos 4 marcadores da RM por RP-HPLC, as 11 amostras foram submetidas ao preparo que antecede a análise para a verificação da presença dos analitos na matriz. A tabela 10 apresenta os resultados, onde é possível observar que foi detectado e quantificado HMF para todas as amostras, e F foi detectado nas amostras X e XI, mas não foi possível de ser quantificado por estar abaixo do LQ do método. FMC e MF não foram detectados para nenhuma amostra. Outros estudos também não encontraram FMC e MF em amostras lácteas (CHÁVEZ-SERVÍN *et al.*, 2005; LUND *et al.*, 2022; FERRER *et al.*, 2000). Demirhan *et al.* (2015) determinaram HMF e F para alimentos destinados à crianças, à base de cereais e leite, e identificaram HMF e F em todas as amostras, exceto em uma não foi identificado F.

A literatura reporta que, no estágio intermediário da RM, se formam derivados furfurais, sendo o HMF mais amplamente mencionado e quantificado, seguido do F. A formação de FMC e MF, nas condições da RM, ainda não foi bem explorada e discutida, principalmente para DL, mas alguns autores relatam que o aparecimento desses compostos pode estar associado às elevadas cargas de calor ao produto, ou seja, possivelmente, um tratamento térmico mais severo, ou um prolongado tempo de armazenamento. Sabe-se que esses fatores podem estender a RM e, com isso, poderiam impulsionar a formação de FMC e MF através de conversões entre os próprios derivados furfurais já formados na matriz.

Tabela 10 - Conteúdo de HMF, F, FMC e MF em 11 amostras de DL

Amostra	HMF ¹ livre		F ² livre (mg/100g)	FMC ³ livre (mg/100g)	MF ⁴ livre (mg/100g)
	(mg/100g)	(μ mol/kg)			
I	1,08 \pm 0,21	121,5 \pm 34,8	n.d.	n.d.	n.d.
II	1,06 \pm 0,02	84,2 \pm 1,9	n.d.	n.d.	n.d.
III	1,62 \pm 0,58	89,1 \pm 10,5	n.d.	n.d.	n.d.
IV	0,63 \pm 0,08	49,8 \pm 6,3	n.d.	n.d.	n.d.
V	0,90 \pm 0,11	71,1 \pm 8,9	n.d.	n.d.	n.d.
VI	2,15 \pm 0,04	170,3 \pm 3,2	n.d.	n.d.	n.d.
VII	1,82 \pm 0,14	144,7 \pm 11,1	n.d.	n.d.	n.d.
VIII	1,51 \pm 0,23	120,2 \pm 17,9	n.d.	n.d.	n.d.
IX	1,55 \pm 0,33	123,1 \pm 26,4	n.d.	n.d.	n.d.
X	3,30 \pm 0,30	262,0 \pm 23,5	<LQ	n.d.	n.d.
XI	2,10 \pm 0,01	166,7 \pm 0,4	<LQ	n.d.	n.d.

¹HMF (5-hidroxiacetilfurfural); ²F: (2-furaldeído); ³FMC: (2-furil-metilcetona); ⁴MF: (5-metil-2-furaldeído); n.d.: não detectado; >LOQ: abaixo do limite de quantificação.

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

6 CONSIDERAÇÕES

Neste capítulo, inicialmente, foi investigado o comportamento térmico do AS e do sorbato de potássio na tecnologia de fabricação de DL a fim de avaliar eventuais limitações para seu uso durante a produção do doce. Os resultados da determinação de AS nas amostras de DL mostraram que a fabricação desse tipo de produto não favorece a perda do sorbato durante o aquecimento. Dessa forma, o momento da adição do conservante, seja no início do processo ou ao final, não interfere na sua concentração final desejada.

Na segunda parte do estudo com os 4 marcadores da reação de Maillard, foi possível concluir que o método desenvolvido satisfaz o objetivo principal de identificar os 4 marcadores da RM em amostras de DL, com boa sensibilidade de análise, precisão e exatidão. Os resultados obtidos acusaram a presença apenas de HMF em todas as amostras, que foi identificado e quantificado, e F foi detectado em duas amostras, mas não quantificado. Os demais não foram encontrados nas amostras.

7 USO DO PERMEADO DE LEITE COMO INDUTOR DA CRISTALIZAÇÃO DE LACTOSE EM LEITE CONDENSADO

A partir da seção 7.1, será apresentada uma revisão bibliográfica com base nos principais tópicos abordados neste segundo capítulo.

7.1 REFERENCIAL TEÓRICO

Incorporado em diversas receitas na culinária como bolos, cremes, doces, pudins, o LC é um dos derivados lácteos mais consumidos no mundo todo. No Brasil, o produto tem grande aceitabilidade nos lares do país: dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) do IBGE, em 2020, mostram que o LC representou 2% do consumo domiciliar de lácteos em 2017-2018 e, de acordo com a Associação Brasileira de Supermercados, em 2019, o LC esteve em 90% das residências brasileiras. Segundo os dados divulgados da *Comex Stat* (sistema para consultas e extração de dados do comércio exterior brasileiro), em 2022, o LC esteve entre os principais produtos que tiveram maior participação no volume total exportado, na qual o leite UHT recuou cerca de 53%, enquanto o LC e o creme de leite avançaram 180% e 19%, respectivamente (MILKPOINT, 2022).

O LC pode ser classificado de acordo com seu teor de gordura, sendo: LC com alto teor de gordura mínimo de 16,0g/100g; LC integral gordura: mínimo de 8,0g/100g e inferior a 16,0g/100g; LC parcialmente desnatado: gordura: superior a 1,0g/100g e inferior a 8,0g/100; LC desnatado: gordura: máximo 1,0g/100g. Ainda segundo a IN nº47 (2018), o LC deve possuir consistência viscosa e semilíquida; cor branca amarelada; odor e sabor próprios textura homogênea com ausência de arenosidade, ou seja, sem cristais perceptíveis com relação a parte nutricional, ter altos níveis de minerais, carboidratos e proteínas (BRASIL, 2018; SILVA *et al.*, 2020).

Tais características sensoriais, como cor e sabor, e pré-requisitos físico-químicos são adquiridos durante a fabricação do LC, que, diferentemente do seu análogo DL, possui condições de pressão reduzida, isto é, necessita que seja realizada em evaporador a vácuo. O fluxograma geral de fabricação de LC engloba etapas como tratamento térmico, homogeneização, microcristalização. No tratamento térmico, é feita a eliminação de microorganismos através da pasteurização; a

homogeneização utiliza de altas pressões para estabilizar a emulsão e retardar a separação de gordura. Quanto à etapa de microcristalização, esta é importante para evitar-se o defeito de arenosidade no LC (RENHE, PERRONE E SILVA, 2011).

A viscosidade é um parâmetro importante de ser mencionado no LC. Ela aumenta com a adição de açúcar e deve ter um limite tal qual o LC deva ser cremoso e liso e escorra facilmente, mas também deve ser viscoso o suficiente para evitar que a lactose decante ou que a gordura seja facilmente separada. É geralmente menos viscoso que o DL, e é de conhecimento que, naturalmente, ocorra aumento da viscosidade do produto ao longo do tempo (RENHE, PERRONE E SILVA, 2011).

7.2 CARACTERÍSTICAS DA LACTOSE

A lactose é o principal açúcar do leite, a primeira fonte de alimento para os lactentes e é classificada como dissacarídeo, já que compreende a uma molécula de glicose e outra de galactose, ligadas por uma ligação glicosídica β -1, 4 (figura 12). É o hidrato mais predominante do leite na maior parte dos mamíferos em comparação a outros monossacarídeos, como glicose e galactose, que existem em concentrações muito baixas (YANG *et al.*, 2021; DOMINICI *et al.*, 2022; PERRONE, 2004). A quantidade de lactose no leite varia de acordo com as espécies, por exemplo, cerca de 4,6 a 4,8% em média para leite bovino e 7% para leite humano, e fatores como a fase de lactação da vaca e alimentação influenciam diretamente nessa concentração (PORTNOY *et al.*, 2021; PERRONE, 2019).

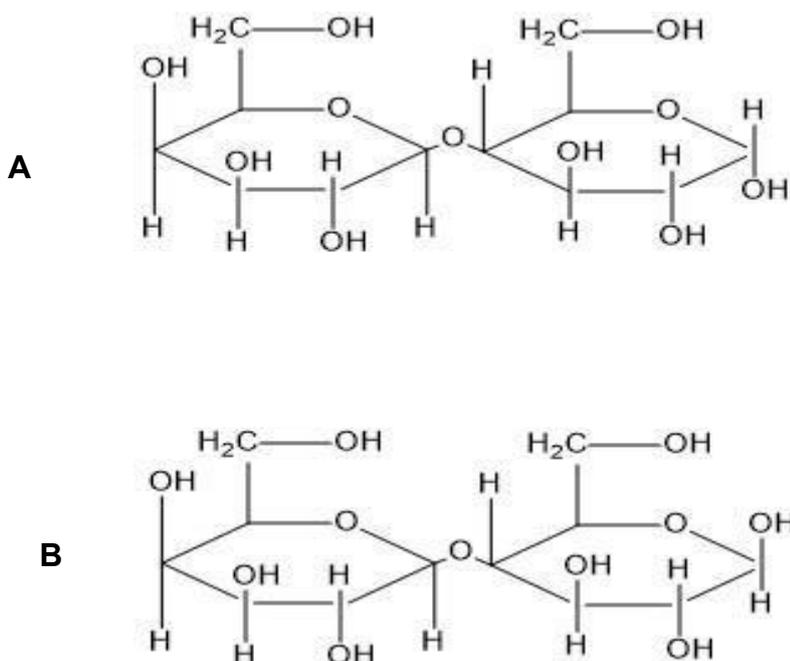
As indústrias alimentícias e farmacêuticas utilizam amplamente a lactose devido a sua baixa doçura, baixo valor calórico e baixo índice glicêmico. Além disso, esse açúcar tem boa compressibilidade, plasticidade e firmeza, que são necessárias ao setor farmacêutico (SÁNCHEZ-GARCÍA *et al.*, 2022). É comum se falar de um condição chamada intolerância à lactose, que é caracterizada pela incapacidade de alguns indivíduos digerirem esse açúcar devido à deficiência total da enzima lactase ou β -galactosidase, responsável pela ruptura da ligação glicosídica em seus monossacarídeos constituintes, glicose e galactose. Os principais sintomas dessa condição estão relacionados a distensão e dores abdominais, flatulências e diarreia, ambos causados pela fermentação da lactose, resultando na produção de gases como metano, dióxido de carbono e hidrogênio (FACIONI *et al.*, 2021; GASPARIN *et al.*,

2010; TORRES *et al.*, 2017).

Com intuito de atender ao público intolerante, cada vez mais são vistos produtos zero lactose no mercado, ou seja, que foram submetidos à hidrólise enzimática da lactose, obtendo em maior concentração glicose e galactose em sua composição. Essa conversão é consideravelmente interessante, do ponto de vista tecnológico, pois os produtos da hidrólise, em combinação, são mais doces, mais solúveis, diretamente fermentados e imediatamente absorvidos no intestino do lactente (MORRISEY, 1985).

Quimicamente, a lactose aparece em duas formas isoméricas, α e β -lactose (figura 13). Essas duas formas diferem-se somente com relação à localização do grupo redutor presente no carbono anomérico da unidade de glicose, variando as posições do hidrogênio e do grupo hidroxila. As duas formas podem ser distinguidas por meio de sua rotação específica e também diferem em suas propriedades químicas e físicas, tais como solubilidade, temperatura, pH e cristalização, levando a diferentes características quando empregados como ingredientes em alimentos e fármacos (DOMINICI *et al.*, 2022; HALFWERK *et al.*, 2023).

Figura 3 - Estrutura da α -lactose (A) e β -lactose (B)



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Quando a α - ou β -lactose são colocadas em solução, as duas formas coexistem

e são capazes de se converterem entre si, propriedade conhecida como mutarrotação. Assim, se a α -lactose é adicionada à água em 20 °C, ela se dissolve até a saturação, a adição de mais α -lactose para a solução faz uma mutarrotação ocorrer, de modo que a forma α começa a se converter em β - e esse fenômeno acontece até que um equilíbrio termodinâmico seja estabelecido. Em equilíbrio, a forma α -lactose representa 37% do soluto dissolvido, enquanto β -lactose representa 63%. A mutarrotação pode ser mensurada pela medição da rotação óptica da solução. A rotação óptica para α -lactose a 20°C é $[\alpha]_D^{20} = +89,4$ e para β -lactose a 20°C, $[\beta]_D^{20} = +35$. A concentração de equilíbrio e a taxa de mutarrotação de α - e β - lactose são dependentes da temperatura (DOMINICI et al., 2022; SÁNCHEZ- GARCIA et al., 2021; PORTNOY et al., 2021; PERRONE, 2019).

A solubilidade é uma propriedade fortemente dependente da temperatura. De acordo com o equilíbrio químico das espécies α e β , quando se aumenta a temperatura, a forma α eleva sua solubilidade e desloca o equilíbrio para a forma β . De fato, no 93,5 °C, este último é o anômalo prevalecente na solução. Entretanto, na água, a lactose não se dissolve facilmente em comparação com outros açúcares simples e essa característica faz com que essa molécula sofra, espontaneamente, o processo de cristalização.

7.3 CRISTALIZAÇÃO E NUCLEAÇÃO DA LACTOSE

Produtos concentrados como doce de leite e leite condensado sofrem perda de água, obtendo teor de sólidos maior e umidade menor, se comparado ao leite queos deu origem. Algumas mudanças ocorrem diante desse processo, como diminuição da atividade de água, modificação na conformação das proteínas, aumento da densidade e, principalmente, aumento da viscosidade. Com a retirada de água, LC forma uma espécie de solução supersaturada (PERRONE, 2019). Do ponto de vista químico, a solução supersaturada é aquela na qual a concentração do soluto excede sua solubilidade, ou seja, tem mais soluto disponível do que o solvente consegue dissolver (LEWIS *et al.*, 2015).

Nessa situação, a lactose possui um comportamento muito específico devido a sua solubilidade ser menor que a dos outros açúcares que podem ser encontrados no leite. Com menor teor de água e diminuição da temperatura do produto, a lactose fica

suscetível à cristalização. Para ocorrer a cristalização da lactose, dois eventos são importantes: a nucleação, que é a geração de novos cristais e o crescimento desses cristais sucessivamente. A nucleação pode ser primária ou secundária. O primeiro tipo necessita de uma solução supersaturada, enquanto a nucleação secundária usa de cristais já formados na solução como fonte para novos cristais (PORTNOY *et al.*, 2021; HALWERK *et al.*, 2023; LEWIS *et al.*, 2015).

Na tecnologia de fabricação do LC, a nucleação primária é favorecida, uma vez que a força motriz para o aparecimento de cristais de lactose é a formação de solução supersaturada. Entretanto, não surgem cristais de lactose no DL e no LC imediatamente após a fabricação, pois os produtos são soluções supersaturadas estáveis, pelo menos por um tempo determinado. Fatores como a diminuição da temperatura do produto, que reduz a solubilidade do soluto e a agitação constante do produto, favorecem o aparecimento dos cristais. O limite da saturação para se iniciar o aparecimento de cristais é chamado de zona metaestável, assim com a redução de água do meio, a lactose tem preferência em se organizar na forma cristalina, por ser um estado menor energia (ZAMANIPPOOR *et al.*, 2014; PERRONE, 2019).

O aparecimento de cristais com tamanhos acima de 16 μm , em média, conferem um defeito conhecido por arenosidade e, na tecnologia de fabricação do LC, o processo de microcristalização ou cristalização forçada é usado para que seja possível controlar o tamanho dos cristais, a fim de que estes não cresçam e se tornem perceptíveis ao paladar (WALSTRA *et al.*, 2001; PERRONE, 2019). Essa técnica, também conhecida como semeadura, consiste em três ações: resfriamento controlado da solução de lactose, adição de núcleos de cristalização e agitação contínua. Na etapa de resfriamento, a temperatura da solução é reduzida entre 20 e 28 $^{\circ}\text{C}$, provocando diminuição da solubilidade da lactose e, conseqüentemente, favorecendo a formação de núcleos (RENHE, PERRONE E SILVA, 2011; RENHE *et al.*, 2017).

Posteriormente, cristais pequenos de lactose (núcleos) são adicionados à solução supersaturada, induzindo à formação de novos cristais, que são formados espontaneamente. Esse processo deve ter o auxílio de agitação constante para melhorar a homogeneidade e a uniformidade dos cristais. Ao final, obtêm-se um produto com textura desejável e com formação controlada de cristais pequenos, o que dificultará a sua percepção sensorial (PERRONE *et al.*, 2017).

7.4 PERMEADO DE LEITE

O permeado de leite é um subproduto da fabricação do concentrado proteico do leite, utilizando ultrafiltração e posterior secagem por pulverização. A lactose é um dos principais constituintes do permeado de leite, juntamente com sais minerais e proteínas solúveis. Segundo a *Think USA Dairy*, sua composição tem como principal composto a lactose, sendo ela entre 78 e 88 %. Além disso, o teor de proteína pode chegar a 5 %, o de gordura no máximo, 1,5 % e o restante de minerais. Por conter quase 90% de lactose, o permeado de leite em pó pode ser um bom agente de nucleação para a cristalização forçada em LC, e seu uso, no lugar da lactose pura, pode gerar um leite condensado de forma mais econômica, uma vez que o permeado é um subproduto que geralmente é descartado (ANDALANENI & AMAMCHARLA, 2018; PERRONE, 2006).

Santos (2016) utilizou o permeado de leite como adjunto na produção de cerveja de alta fermentação e as cervejas com o permeado receberam boa aceitação em avaliação sensorial. Apesar disso, não se encontra muitos estudos com uso de permeado explorando as diversas funções que esse ingrediente pode proporcionar, tornando viável aprofundar os estudos sobre esse subproduto, a fim de obter conhecimento das suas características funcionais e benéficas para outros produtos.

8 MATERIAL E MÉTODOS

Nas seções seguintes, serão apresentados a obtenção das amostras, assim como os esquemas de produção dos leites condensado e as ferramentas analíticas aplicadas para as análises.

8.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS EM PÓ

As amostras de permeado de leite, micronizado e não micronizado, e a amostra de lactose não micronizada usadas neste estudo foram disponibilizadas por uma empresa parceira do projeto Doremus Alimentos (Guarulhos/SP). A amostra de lactose micronizada é do próprio grupo de pesquisa, da UFJF (Juiz de Fora/MG).

8.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS INGREDIENTES

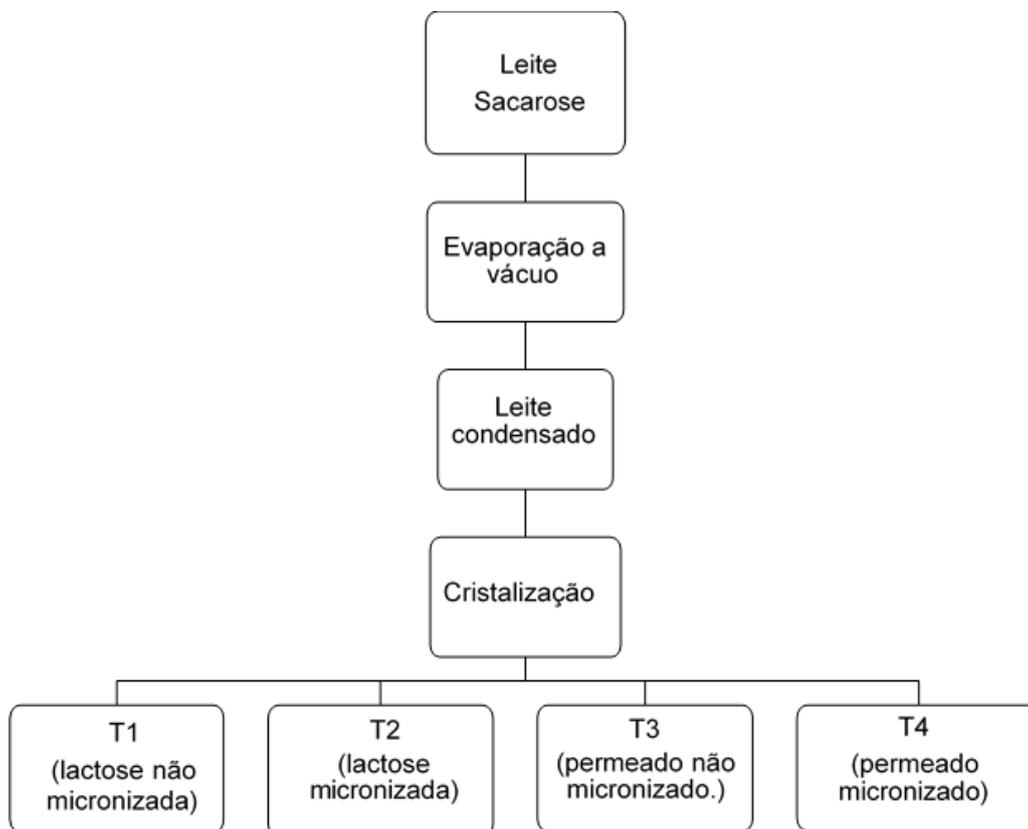
A microscopia eletrônica de varredura foi realizada em um microscópio modelo TM 3000 (marca: Hitachi Ltd) com aceleração do feixe de 15 kV.

8.3 PRODUÇÃO DOS LEITES CONDENSADOS

Os leites condensados foram produzidos no rotaevaporador a vácuo de bancada com capacidade de 10 kg, da marca BUCHI modelo R-220, usando 9 kg de leite padronizado para 3% de gordura e, aproximadamente, 1,59 kg de sacarose. Inicialmente, leite e açúcar foram submetidos a um tratamento térmico de 85 °C por 3 minutos e logo após foram levados ao processo de concentração a vácuo no rotaevaporador. A mistura foi concentrada até atingir entre 70-72°Brix e, após a finalização do processo, o leite condensado foi fracionado em 4 cubas para adição de 0,05% de cada ingrediente (permeado micronizado e não micronizado, lactose micronizada e não micronizada) com relação à massa para a microcristalização da lactose, conforme mostrado no esquema 4.

A cristalização foi feita com controle de temperatura e agitação por cerca de 18 horas, na qual foi realizado o monitoramento do perfil de cristalização, em microscópio ótico 1 dia após a fabricação e 7, 15 e 30 dias de armazenamento.

Esquema 4 – Procedimento experimental para fabricação dos leites condensados (n=3)



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

8.4 ANÁLISES DE VISCOSIDADE

A viscosidade aparente foi determinada em viscosímetro rotacional marca Quimis® modelo: Q860M21. As amostras eram posicionadas na altura recomendada, usando o rotor 3. A rotação foi ajustada para se obter uma porcentagem de 50% (relativa à força do rotor na amostra). A viscosidade também foi determinada pelo viscosímetro tipo Copo Ford de alumínio usando o terceiro orifício, no qual a amostra era homogeneizada e nivelava-se o aparelho, de preferência com nível bolha de centro. O orifício era fechado com o dedo e o copo preenchido com a amostra até o nível mais elevado, sem bolhas de ar. Removia-se o excesso com uma placa de vidro plana e retirava-se o dedo do orifício, acionando simultaneamente o cronômetro. Na primeira interrupção do fluxo de escoamento, anotava-se o tempo transcorrido em segundos.

Foi realizado o Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, para comparar

as médias dos resultados e verificar a magnitude das diferenças entre elas.

8.5 MICROSCOPIA ÓTICA

O acompanhamento do perfil de cristalização de cada tratamento foi conduzido no microscópio ótico marca Medilux modelo MC30, usando a objetiva de 25X. Com auxílio de um palito de madeira fino, uma quantidade ínfima da amostra de cada LC era colocada sobre uma lâmina de vidro, previamente limpa e pressionada por uma lamínula, também de vidro, para formar uma superfície lisa e homogênea da amostra a ser levada ao microscópio para análise dos cristais de lactose.

8.6 TRATAMENTO DAS IMAGENS NO IMAGEJ

As microscopias foram avaliadas em *software* específico para tratamento de imagens a fim de obter dados estatísticos que auxiliem na comparação do perfil de cristalização obtido para cada ingrediente investigado. O procedimento para análise no *software* foi adaptado de Schumacher *et al.*, 2014. As adaptações foram necessárias para adequar o procedimento ao microscópio disponível para esse trabalho e, assim, obter um resultado com mais confiabilidade para a realidade do experimento.

Basicamente, o *software* necessita de uma escala de tamanho conhecida, que é adicionada através do próprio programa do microscópio ótico, desde que esteja corretamente calibrado de acordo com as informações do fabricante. Essa distância conhecida serve como parâmetro de tamanho para o *software* medir automaticamente o tamanho dos cristais. Após fornecer essa distância, as próximas etapas são necessárias para que o *software* consiga refinar a imagem original, aplicando contrastes de cor e modificações para escala binária (preto-branco), a fim de identificar de fato o que é cristal e o que não é. Por fim, o programa apresenta uma relação de número e tamanho médio de cristais identificados automaticamente e o perfil de imagem da microscopia em preto e branco após cada tratamento de cor.

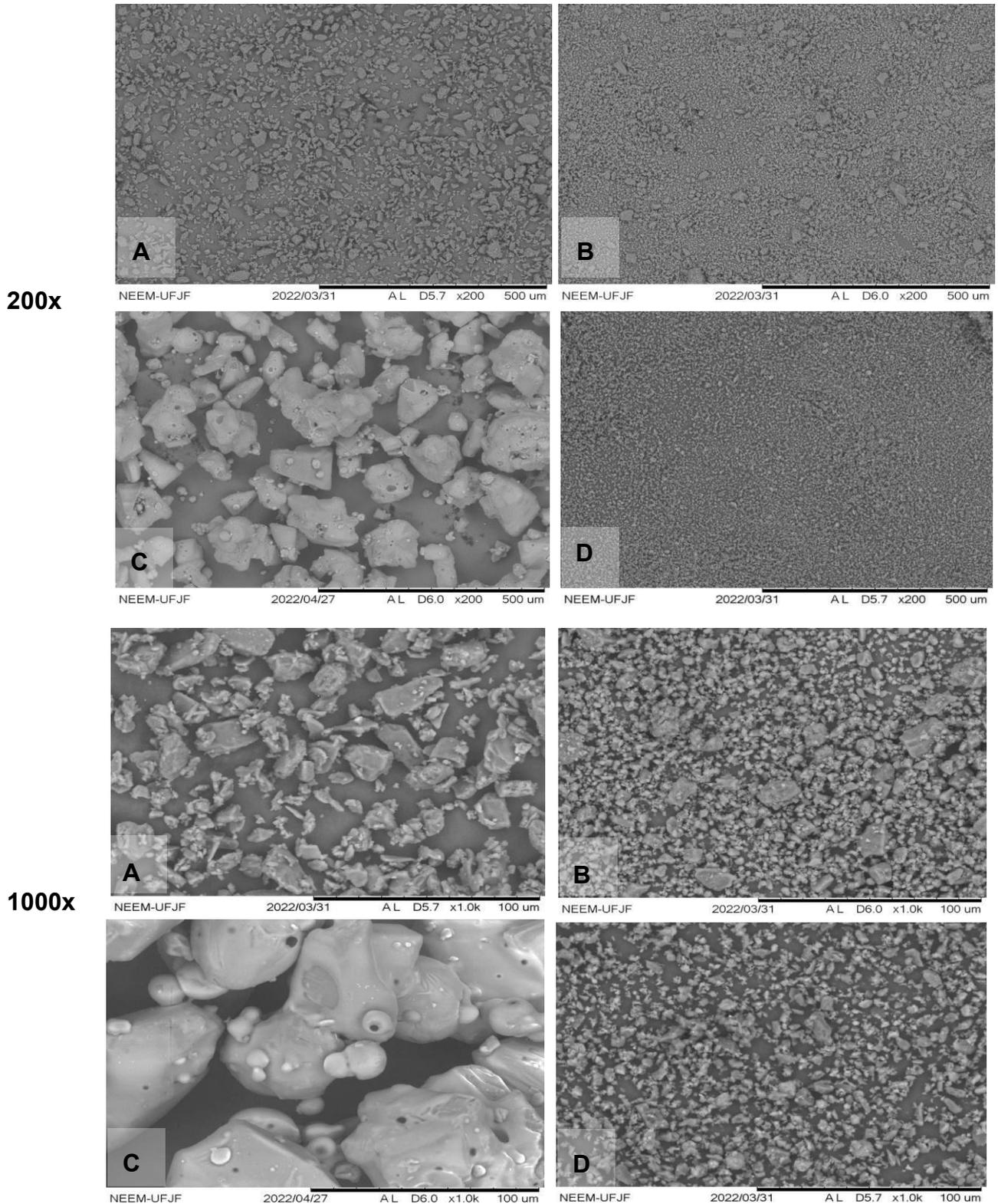
9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas próximas seções serão apresentados e discutidos os resultados referentes ao segundo capítulo na matriz leite condensado.

9.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS INGREDIENTES EM PÓ PELO MEV

A figura 4 mostra as imagens obtidas pelo MEV com aumento de 200x e 1000x. A micronização é um processo de moagem ultrafina que reduz o tamanho das partículas e pelas imagens obtidas, é possível observar que o permeado e a lactose não micronizados possuem formatos maiores de partículas se comparados aos ingredientes micronizados, sendo o permeado não micronizado o maior entre eles e com maior formação de agregados também. Já pós os micronizados, se caracterizaram por possuir um perfil similar de formato e tamanho de partículas. A diferença de tamanho fica ainda mais pronunciada quando se observa a morfologia com aproximação de 1000x. Esse perfil sugere que os ingredientes com micronização vão induzir a formação de cristais menores e em maior quantidade.

Figura 4 - MEV dos ingredientes testados. A: lactose não micronizada; B: lactose micronizada; C: permeado não micronizado; D: permeado micronizado



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

9.2 MONITORAMENTO DA VISCOSIDADE APARENTE NO *SHELF-LIFE*

Os resultados das viscosidades estão apresentados na tabela 11. O tempo obtido pelo Copo Ford se relaciona aos resultados do viscosímetro rotacional, já que quanto mais viscoso for o produto, menor será seu tempo de escoamento. No D1, todos possuíam valores de viscosidade sem diferenças significativas ao nível de 5% de certeza.

Houve incremento de viscosidade com o tempo para todos os tratamentos, tanto pelos resultados do viscosímetro rotacional quanto pelo Copo Ford, evidenciado pelo tratamento estatístico, nos quais D1 apresentou diferença para D30, sendo o T4o tratamento que obteve maiores valores de viscosidade, que se diferiram dos demais.

Os dados do Copo Ford obtiveram maior variação de D1 a D30, se comparados aos dados do viscosímetro rotacional, de acordo com a análise estatística. Este perfil sugere que os resultados do Copo Ford são mais “sensíveis” às pequenas variações de viscosidade aparente, já que de D15 para D30, nas amostras T1, T2 e T3, pelo viscosímetro rotacional, não houve diferença significativa entre nos resultados e pelo Copo Ford, as mesmas amostras obtiveram diferenças significativas. Apenas T4 alcançou diferenças significativas nos resultados de viscosidade pelos dois métodos, de D15 a D30.

Tabela 11- Dados da análise de viscosidade dos leites condensado

Tempo	T1**		T2		T3		T4	
	Visc. Rot. (mPa.s)	Copo Ford (s)	Visc. Rot. (mPa.s)	Copo Ford (s)	Visc. Rot. (mPa.s)	Copo Ford(s)	Visc. Rot. (mPa.s)	Copo Ford(s)
D1	2116,7±155,2 ^{Aa*}	528±15 ^{Ba}	2190,1±146,4 ^{Aa}	553±10 ^{Ba}	2215,6±127,1 ^{Aa}	540±16 ^{Ba}	2155,9±125,4 ^{Aa}	534±17 ^{Ba}
D7	3039,7±100,2 ^{Ab}	666±50 ^{Bb}	3171,2±255,2 ^{Ab}	694±12 ^{Bb}	3055,9±100,8 ^{Ab}	664±25 ^{Bb}	3147,7±186,4 ^{Ab}	836±25 ^{Cb}
D15	3464,0±210,1 ^{Abc}	736±25 ^{Bb}	3505,8±222,4 ^{Abc}	825±13 ^{Bc}	3542,3±98,4 ^{Ac}	794±22 ^{Bc}	3521,4±144,7 ^{Ac}	1028±16 ^{Cc}
D30	3775,0±142,1 ^{Ac}	1052±20 ^{Bc}	3654,2±126,4 ^{Ac}	1161±15 ^{Bd}	3775,8±114,4 ^{Ac}	1069±14 ^{Bd}	4139,2±117,9 ^{Ad}	1523±14 ^{Cd}

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na mesma linha (para o mesmo parâmetro) e mesma letra minúscula na mesma coluna (para mesmo parâmetro) não diferem pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

**T1:LC com lactose não micronizada; T2: LC com lactose micronizada; T3: LC com permeado não micronizado; T4: LC com permeado micronizado.

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

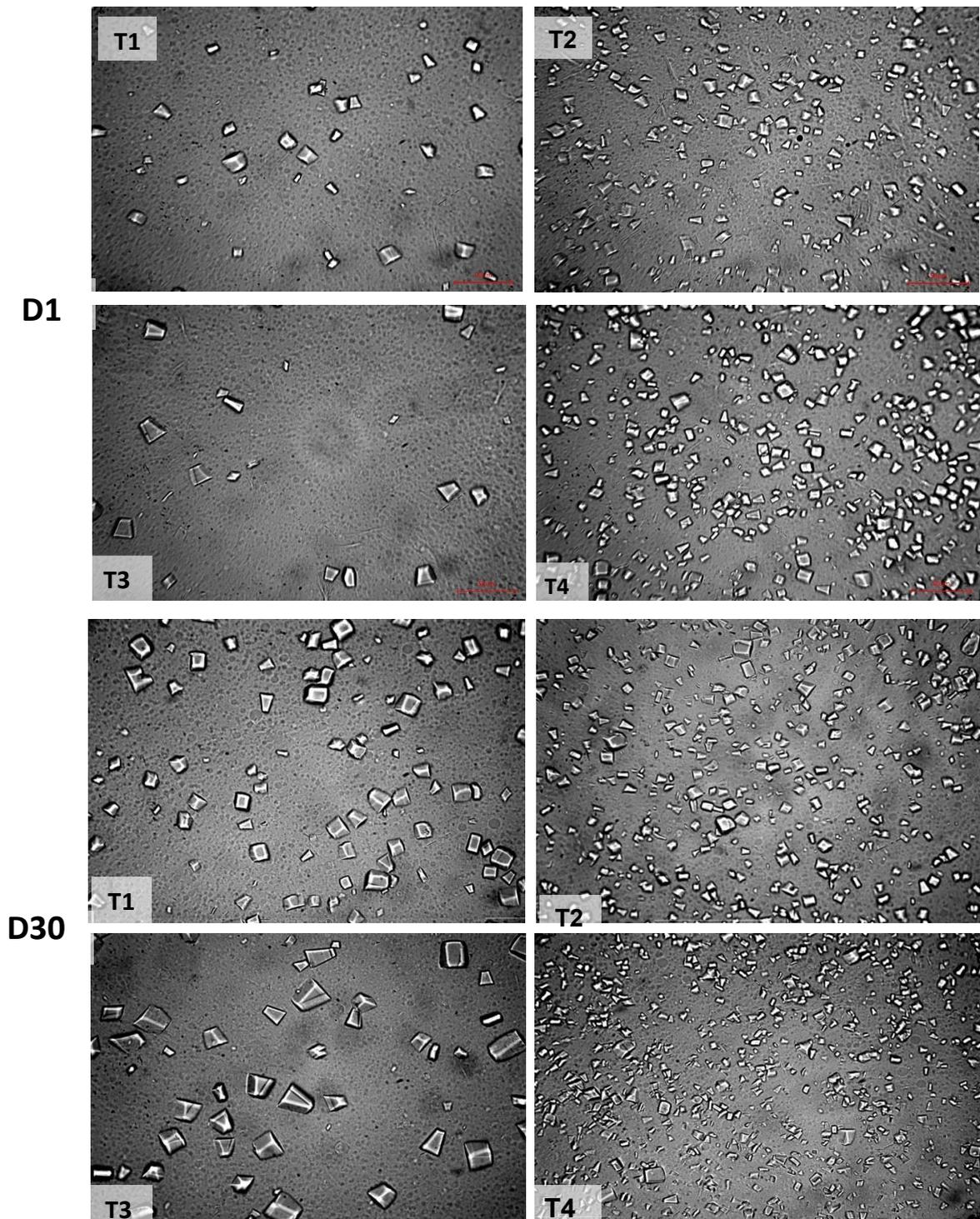
9.3 COMPARAÇÃO DO PERFIL DE CRISTALIZAÇÃO

O principal resultado referente ao perfil de cristalização é mostrado na figura 5. É possível observar que os ingredientes micronizados induziram a formação de mais cristais e em diâmetros menores, perfil observado em D1 e que se manteve em D30. Uma característica observada é uma aparente diminuição do volume de cristais do D1 para o D30, principalmente para as amostras T3 e T4, que foram usados os ingredientes em micronização.

Esse resultado mostrou que o tamanho das partículas do agente nucleador influencia diretamente no tamanho e na quantidade de cristais formados, ou seja, a micronização é um fator crucial que mede o perfil dos cristais do produto. Os ingredientes micronizados induziram nucleação mais eficiente, os cristais se formaram de forma mais abundante e com diâmetros menores. Além disso, é possível observar que o permeado é um bom agente de cristalização em LC, principalmente o micronizado (amostra T4), pois obteve um perfil similar ao produto cristalizado usualmente com lactose pura. O tipo de cristal formado pela lactose recebe o nome de *tomahawk*, formato similar à pirâmide e aos prismas, igual ao cristal induzido pela microcristalização com permeado (ORDÓÑEZ, 2005).

Com relação ao aspecto sensorial, uma avaliação prévia e simplória revelou que o produto com permeado possui sabor semelhante ao tradicional, sem efeito significativamente na composição do permeado, que contempla sais do leite. Assim, espera-se que esse produto seja aceito no mercado sem objeções, mas vale destacar que uma avaliação sensorial mais completa é necessária para determinar a aceitação desse produto pelos consumidores de forma mais ampla.

Figura 3 - Microscopia em D1 e em D30. T1: LC com lactose não micronizada; T2: LC com lactose micronizada; T3: LC com permeado não micronizado; T4: LC com permeado micronizado

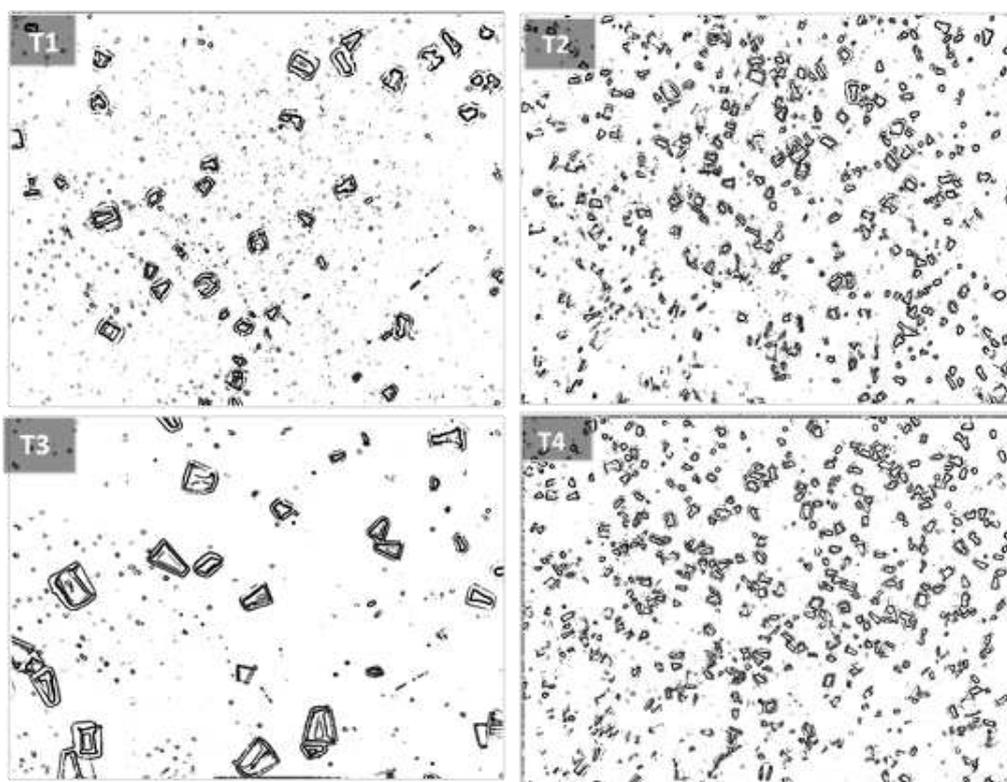


Fonte: Elaborada pela autora (2023).

9.4 COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DO PERFIL DE CRISTALIZAÇÃO PELO SOFTWARE IMAGEJ

Para assegurar os resultados visuais com dados estatísticos, foi usado o *software* ImageJ para tratamento das imagens, no qual foi possível identificar tamanho médio dos cristais e a quantidade formada. A figura 6 mostra o perfil da imagem que o *software* gera após a finalização do procedimento com os cristais identificados. Observa-se que a imagem final se caracteriza por um fundo branco contendo os cristais sombreados em preto. Nota-se também que, principalmente para T1 e T3 que são amostras que formaram menos cristais, o *software* identificou além dos cristais de fato, outros elementos externos, que podem estar na lâmina de análise ou na lente do microscópio. Assim, é importante ressaltar que, para obter um resultado mais exato, deve-se procurar eliminar quaisquer interferentes que possam atrapalhar o correto reconhecimento dos cristais pelo *software*.

Figura 6- Perfil de imagem no ImageJ para T1: LC com lactose não micronizada; T2: LC com lactose micronizada; T3: LC com permeado não micronizado; T4: LC com permeado micronizado



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A tabela 12 mostra que houve uma tendência em diminuir o número de cristais

de todos os tratamentos, apesar da análise estatística não identificar diferenças significativas, considerando os desvios de cada tratamento. Uma diminuição dos cristais poderia estar relacionada ao aumento da viscosidade dos produtos, que foi observada para todos com os dados da tabela 11. Com aumento de viscosidade, a taxa de cristalização torna-se mais lenta devido à falta de mobilidade das moléculas de lactose, reduzindo o crescimento dos cristais (SILVA *et al.*, 2015).

É possível observar que T1 e T3, que são amostras com lactose e permeado sem micronização, respectivamente, possuem menor número de cristais e em tamanhos maiores, se comparados aos tratamentos com ingredientes micronizados, corroborado pela análise estatística que identificou diferenças significativas entre os resultados de número e diâmetro dos cristais do permeado micronizado e não micronizado, bem como para lactose micronizada e não micronizada. A lactose sem micronização gerou mais cristais em valores absolutos do que o permeado análogo, mas a análise estatística não identificou diferenças significativas entre eles. As amostras com ingredientes micronizados obtiveram em torno de 700 a 800 cristais por campo microscópico identificados, com tamanhos médios que oscilaram de 9,25 a 11,98 μm , e esses resultados não obtiveram diferenças significativas pelo teste de Tukey. A cristalização com lactose e permeado sem micronização geraram em torno de 100 a 200 cristais por campo microscópico, com tamanhos de 13,28 a 16,15 μm e também foram considerados sem diferenças estatísticas entre si.

Quanto maior for o cristal, pior para o produto, já que os maiores cristais tendem a atrair e fazer com que os menores se depositem em cima deles, aumentando ainda mais o tamanho e se tornando cada vez mais perceptíveis ao paladar, o que confere defeito ao produto. Assim, fica comprovado que os ingredientes micronizados com partículas menores, menos agregadas e mais homogêneas oferecem uma cristalização mais eficiente no que diz respeito ao tamanho e quantidade de cristais, ou seja, um perfil de produto que, possivelmente, manterá uma textura sem arenosidade por mais tempo.

Tabela 12- Dados da análise das imagens no ImageJ

Tempo	T1**		T2		T3		T4	
	Nº cristal/campo microscópico	Tamanho (µm)						
D1	210±15 ^{Aa*}	14,66±1,24 ^{aA}	865±16 ^{Ba}	11,98±1,52 ^{bB}	157±10 ^{Aa}	16,15±1,22 ^{aA}	888±33 ^{Bb}	12,30±1,56 ^{bB}
D7	195±23 ^{Aa}	14,33±1,43 ^{aA}	842±27 ^{Ba}	9,34±2,34 ^{bB}	152±13 ^{Aa}	16,05±2,34 ^{aA}	854±22 ^{Bb}	9,25±0,89 ^{bB}
D15	187±33 ^{Aa}	13,28±1,59 ^{aA}	792±22 ^{Ba}	10,52±1,77 ^{bB}	144±12 ^{Aa}	15,55±1,44 ^{aA}	742±27 ^{Bb}	11,23±1,54 ^{bB}
D30	182±12 ^{Aa}	13,27±0,88 ^{aA}	715±26 ^{Bb}	11,12±1,65 ^{bB}	134±10 ^{Aa}	14,85±0,45 ^{aA}	785±25 ^{Bb}	11,86±1,33 ^{bB}

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na mesma linha (para o mesmo parâmetro) e mesma letra minúscula na mesma coluna, (para mesmo parâmetro) não diferem pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

**T1: LC com lactose não micronizada; T2: LC com lactose micronizada; T3: LC com permeado não micronizado; T4: LC com permeado micronizado.

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

10 CONSIDERAÇÕES

Pode-se considerar, então, que a substituição de lactose por permeado pode ser feita, já que não há impacto no resultado final e que é possível obter um produto com características sensoriais e atributos de viscosidade e cristalização iguais aos produtos tradicionais e já estabelecidos no mercado. Além disso, ingredientes micronizados causam um perfil de cristais com tamanhos médios menores e em maior quantidade, principalmente o permeado micronizado, que seria o melhor substituto para a lactose pura, com comprimento médio de cristais de 11 μm , os quais não são perceptíveis ao paladar.

11 CONCLUSÃO

No primeiro capítulo, o comportamento térmico do AS foi investigado na matriz de DL e foi visto que o conservante, quando adicionado ao alimento na forma de sal, não é perdido pelo aquecimento, desde que o pH seja acima do pK_a (4,76) do ácido de referência. Para comprovar o efeito do pH sobre a estabilidade da molécula conservante, o estudo das soluções modelo foi fundamental. Através dele, foi possível identificar que em valores de pH mais ácidos, abaixo do pK_a , a espécie em maior concentração é a ácida e a há maior possibilidade dessa substância ser perdida durante a evaporação. Entretanto, na tecnologia de produção do DL, não há problema com relação ao pH da mistura inicial, composta basicamente de leite, sacarose e bicarbonato de sódio, porque nessa faixa de pH há maior concentração do sal e mesmo as reações que ocorrem na fabricação do doce não são capazes de reduzir o pH a um valor que converteria o sorbato em AS.

Na segunda parte do estudo com a metodologia para separação e quantificação de 4 marcadores da RM em DL, deve-se salientar que essa determinação de HMF, F, FMC e MF em doce, ainda não havia sido reportada na literatura e, sendo assim, através desses dados, torna-se possível estabelecer novos caminhos para aprofundar ainda mais os estudos envolvendo essas moléculas, e compreender com mais rigor como tempo e temperatura, de fabricação e de armazenamento, influenciam nas características do DL e outros derivados lácteos que sofrem RM.

Os resultados do segundo capítulo sugerem que existe a possibilidade de manter o padrão de LC desejado no mercado, mas sendo possível obtê-lo com reaproveitamento de um subproduto que, geralmente, é descartado pelos laticínios em uma etapa de fabricação do LC extremamente importante, que é a cristalização. O uso do permeado, ao invés da lactose, pode acarretar valor nutricional ao consumidor, já que, em sua composição tem-se minerais. Ademais, vale ressaltar que o ingrediente é permitido no regulamento técnico para LC e, por ter custo mais competitivo, a substituição também seria economicamente vantajosa.

REFERÊNCIAS

AALAEI, Kataneh et al. Early and advanced stages of Maillard reaction in infant formulas: Analysis of available lysine and carboxymethyl-lysine. **Plos one**, v. 14, n. 7, p. e0220138, 2019. **LWT-Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 417-423, 2015.

ANUROVA, M. N. *et al.* Modern preservatives of microbiological stability. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 53, n. 6, p. 564-571, 2019

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

BIMPIZAS-PINIS, Meletios et al. Additives in the food supply chain: Environmental assessment and circular economy implications. **Environmental and Sustainability Indicators**, v. 14, p. 100172, 2022. 25

BORGES, E, MARCEL, B., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., (2010). Possibilidades e limitações no uso da temperatura em cromatografia líquida de fase reversa. **Química Nova**, 33(4), 945–953.

BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 47, DE 26 DE OUTUBRO DE 2018 Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite condensado. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília**, n. 213, p. 6, 26 de outubro de 2018, Seção I.

BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 354de4 de setembro de 1997. Regulamento técnico de identidade e qualidade de doce de leite. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 172, p. 37-38, 8 set. 1997. Seção I.

BRASIL; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, v. 141, p. 87-89, 2017.

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

CARNEIRO, Lauren Carvalho Montalvão et al. A química ea tecnologia do doce de leite: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, p. e155101119408- e155101119408, 2021.

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

CHARNOCK, Hannah M.; PICKERING, Gary J.; KEMP, Belinda S. The Maillard reaction in traditional method sparkling wine. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1-20, 2022.

CHÁVEZ-SERVÍN, Jorge L.; CASTELLOTE, Ana I.; LÓPEZ-SABATER, M. Carmen. Analysis of potential and free furfural compounds in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography: Evolution during storage. **Journal of Chromatography A**, v. 1076, n. 1-2, p. 133-140, 2005

COLLINS, Carol H. I. Michael Tswett e o “nascimento” da Cromatografia. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 1, p. 07-20, 2009

CONSTANTINO, Leonel Vinicius. **Desenvolvimento e validação de método cromatográfico para análise de açúcares livres em café verde**. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal Londrina. Londrina, 2013.

COSTA, João Carlos Duarte. **Validação de um Método de Cromatografia de Alta Eficiência para Determinação de Conservantes em Géneros Alimentos**. Dissertação de mestrado apresentada ao 2º Ciclo em Engenharia Química e Biológica – ramo de Bioprocessos do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, no Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde, 2015.

DE JESUS, Jany Hellen Ferreira et al. Thermal behavior of food preservative sorbic acid and its derivatives. **Food Chemistry**, v. 337, p. 127770, 2021.

DEMIRHAN, B. Er et al. Determination of potential 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde and 2-furaldehyde compounds in follow-on milks and infant formulas using the high-performance liquid chromatography method. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 2, p. 818-822, 2015.

DIAS, Francielle Regina Silva Dias. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos**. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS. Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos (2019)

DOLLIMORE, David; O'CONNELL, Carolyn. A comparison of the thermal decomposition of preservatives, using thermogravimetry and rising temperature kinetics. **Thermochimica Acta**, v. 324, n. 1-2, p. 33-48, 1998.

DOMINICI, Simona et al. Lactose: Characteristics, Food and Drug-Related Applications, and Its Possible Substitutions in Meeting the Needs of People with Lactose Intolerance. **Foods**, v. 11, n. 10, p. 1486, 2022.

DOS ANJOS PINTO, Caroline Barroso et al. Lactose-free Dulce de leche: compositional characterization, browning and texture profile. **Journal of Dairy Research**, v. 88, n. 4, p. 452-456, 2021.

FACIONI, Maria Sole et al. Lactose Residual Content in PDO Cheeses: Novel Inclusions for Consumers with Lactose Intolerance. **Foods**, v. 10, n. 9, p. 2236, 2021

FARAG, Mayada R. et al. The toxicological aspects of the heat-borne toxicant 5-hydroxymethylfurfural in animals: a review. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1941, 2020.

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

FERRER, Emilia et al. Effects of thermal processing and storage on available lysine and furfural compounds contents of infant formulas. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1817-1822, 2000.

FRANCISQUINI J.D.F., NEVES LNO, TORRES J.K.F., CARVALHO AF, PERRONE IT and Da SILVA PHF (2018) Physico-chemical and compositional analyses and 5 hydroxy methyl furfural concentration as indicators of thermal treatment intensity in experimental Dulce de leche. **Journal of Dairy Research** 8, 176–481.

FRANCISQUINI J.D.F., ROCHA J, MARTINS E, STEPHANI R, Da SILVA PHF, RENHE IRT, PERRONE IT and CARVALHO AF (2019) 5-Hydroxymethylfurfural Formation and colorchange in lactose-hydrolyzed Dulce de leche. **Journal Of Dairy Research** 86, 477–482.

FRANCISQUINI, J.D.F. **Caracterização e avaliação de indicadores físico-químicos, tecnológicos e de tratamento térmico em doces de leite**. 2016. 102 f. Dissertação (Mestrado) –Curso de Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Universidade Federal Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2016.

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

GASPARIN, F. S. R. et al. Alergia à proteína do leite de vaca versus intolerância à lactose: as diferenças e semelhanças. **Revista Saúde e Pesquisa**, Maringá, v. 3, n. 1, p. 107-114, 2010.

GAZE LV, Costa MP, Monteiro MLG, Lavorato JAA, Júnior CC, Raices RSL and Freitas MQ(2015) Dulce de leche, a typical product of Latin America: characterization by physicochemical, optical and instrumental methods. **Food Chemistry** 169, 471–477.

HALFWERK, Ruben et al. Crystallization kinetics of lactose recovered at sub-zero temperatures: A population balance model combining mutarotation, nucleation and crystal growth. **Journal of Food Engineering**, p. 111412, 2023.

HARRIS, Daniel C. **Análise química quantitativa**, 8ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012 ISO 9231:2008 [IDF 139:2008] Milk and milk products - Determination of the benzoic and sorbic acid contents. 27

LEWIS, A. et al. Industrial Crystallization: Fundamentals and Applications. Cambridge University Press, 2015.

LFC (2018) Dulce de leche – chemistry and processing technology. Milk Production, Processing and Marketing. London: InTech Open Limited, 18p. 28

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

LUND, Pernille et al. Effect of Processing of Whey Protein Ingredient on Maillard Reactions and Protein Structural Changes in Powdered Infant Formula. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 1, p. 319-332, 2021.

Métodos físico-químicos para análise de alimentos / coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglia -- São Paulo: **Instituto Adolfo Lutz**, 2008. 083/IV Conservadores – Identificação de AS e sorbatos.p.189.

MILKPOINT. **Balança comercial de lácteos: exportações voltam a ganhar força**. 2022. Disponível em <<https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/panorama-mercado/balanca-comercial-de-lacteos-exportacoes-voltam-a-ganhar-forca-230032/>> acesso em 20/01/2023.

MORRISSEY, P. A, Lactose: chemical and physicochemical properties. In: FOX, P. F. **Developments in dairy chemistry**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1985. v. 3. p. 1-34.

MURATA, Masatsune. Browning and pigmentation in food through the Maillard reaction. **Glycoconjugate Journal**, v. 38, n. 3, p. 283-292, 2021.

NAIK, Rishi Ravindra; WANG, Yong; SELOMULYA, Cordelia. Improvements of plant protein functionalities by Maillard conjugation and Maillard reaction products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 25, p. 7036-7061, 2022.

NEVES, Braz dos Santos; DE SÁ, Jaqueline Flaviana Oliveira; DE CARVALHO, Antônio Fernandes. Atributos tecnológicos de controle para produção do doce de leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 67, n. 385, p.42-51, 2012.

NEWTON, Isaac. Carta de Isaac Newton para Robert Hooke baseado numa metáfora atribuída a Bernardo de Chartres. (1676)

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

ORDÓÑEZ, Juan A. Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal. **Artmed**, PANDALANENI, K.; AMAMCHARLA, J. K. Evaluating the crystallization of lactose at different cooling rates from milk and whey permeates in terms of crystal yield and purity. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 10, p. 8805-8821, 2018.

PERRONE, I. T. *et al.* Doce de leite: Química e Tecnologia. 2019.

PERRONE, I.T. Efeito da nucleação secundária sobre a cristalização em doce de leite. **Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Federal de Lavras, Lavras**, 49 p., 2006.

PERRONE, Ítalo Tuler, STEPHANI, Rodrigo; DE CARVALHO, Antônio Fernandes; NETTO, Gabriel Gamma; FRANCISQUINI, Julia D'Almeida. **Doce de leite-Química e Tecnologia**. Juiz de Fora, Realização: Cap Lab, 2019.151p.

PERRONE, T. I. et al. Lactose. In: Cruz A. G. et al. Química, Bioquímica, Análise Sensorial e Nutrição no Processamento de Leite e Derivados: **Coleção Lácteos**. Elsevier Brasil, 2017.

PORTNOY, Matilde; BARBANO, David M. Lactose: Use, measurement, and expression of results. **Journal of dairy science**, v. 104, n. 7, p. 8314-8325, 2021

preservatives – Sorbic acid. In C. A. Batt, & M. L. Tortorello (Eds.). **Encyclopedia of Food Microbiology** (pp. 102–107). (second ed.). Elsevier: Academic Press ISBN: 978-0-12-384733-1.

RENHE, IRT; PERRONE, I. T.; SILVA, PHF. Leite condensado: identidade, qualidade e tecnologia. **Juiz de Fora: Templo**, v. 1, 2011.

RENHE, Ísis Rodrigues Toledo *et al.* Characterization of physicochemical composition, microbiology, sensory evaluation and microscopical attributes of sweetened condensed milk. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 293-298, 2017.

RIBANI, Marcelo et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RODRÍGUEZ, Analía et al. Characterization of Melanoidins and Color Development in Dulce de Leche, a Confectionary Dairy Product With High Sucrose Content: Evaluation of pH Effect, an Essential Manufacturing Process Parameter. **Frontiers in nutrition**, p.864, 2021.

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

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

SÁNCHEZ-GARCÍA, Yanira I. et al. Mutarotation and solubility of lactose as affected by carrageenans. **Food Research International**, v. 142, p. 110204, 2021.

SANTOS, Barbara Belodi dos. **Utilização do permeado de leite como adjunto na produção de cerveja de alta fermentação (ALE)**. 2016. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo,

Lorena, 2016.

SCHUMACHER, Andrea Bordin et al. An automated measuring methodology for crystal size in sweetened condensed milk using digital image processing and analysis. **Food analytical methods**, v. 8, n. 7, p. 1858-1867, 2015.

SEO, Chan Won et al. Physicochemical properties of liquid infant formula stored at different temperatures. **Korean journal for food science of animal resources**, v. 38, n. 5, p. 995, 2018.

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

SILVA, F. L. et al. Production of dulce de leche: The effect of starch addition. **LWT-Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 417-423, 2015.

SILVA, Maria Manuela; LIDON, Fernando. Food preservatives—An overview on applications and side effects. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, p. 366-373, 2016.

STEPHANI R, FRANCISQUINI JDF, PERRONE IT, CARVALHO AF and de OLIVEIRA

TFOUNI, S. A. V.; TOLEDO, M. C. F. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. **Food control**, v. 13, n. 2, p. 117-123, 2002.

THAKUR, B. R.; SINGH, R. K.; ARYA, S. S. Chemistry of sorbates—a basic perspective. **Food Reviews International**, v. 10, n. 1, p. 71-91, 1994

Think USA Dairy. U.S. Whey and Milk Permeate. Disponível em <<https://www.thinkusadairy.org/resources-and-insights/resources-and-insights/productresources/us-whey-and-milk-permeate-overview>> acesso em 25/08/2022.

THOMAS, L. V. & DELVES-BROUGHTON, J. (2014). PRESERVATIVES | Permitted preservatives – Sorbic acid. In C. A. Batt, & M. L. Tortorello (Eds.). **Encyclopedia of Food Microbiology** (pp. 102–107). (second ed.). Elsevier: Academic Press ISBN: 978-0-12-384733-1.

TORRES, J. ANTONIO; BOUZAS, JORGE O.; KAREL, MARCUS. SORBIC ACID Stability during processing and storage of an intermediate moisture cheese analog 1. **Journal of food processing and preservation**, v. 13, n. 6, p. 409-415, 1989.

TORRES, J. K. F. et al. Technological aspects of lactose-hydrolyzed milk powder. **Food Research International**, v. 101, n. February, p. 45–53, 2017

TUNGKIJANANSIN, Nuttaneet et al. Simultaneous determination of benzoic acid,

sorbic acid, and propionic acid in fermented food by headspace solid-phase microextraction followed by GC-FID. **Food chemistry**, v. 329, p. 127161, 2020.

VALENTINI, Sóstenes Rosa; SOMMER, Willy Arno; MATIOLI, Graciette. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do MUDI**, v. 11, n. 2, p. 26-31, 2007.

Völgyi, G., Baka, E., Box, K. J., Comer, J. E. A., & Takács-Novák, K. (2010). Study of pH-dependent solubility of organic bases. Revisit of Henderson-Hasselbalch relationship. *Analytica Chimica Acta*, 673(1), 40–46.

WALKER, R. Toxicology of sorbic acid and sorbates. **Food Additives & Contaminants**, v.7, n. 1990.

WALSTRA, P. et al. *Ciência de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Zaragoza: Editorial Acribia, 2001.

YANG, Jinchuan et al. Determination of lactose in low-lactose and lactose-free dairy products using LC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 100, p. 103824, 2021.

ZAMANIPPOOR, Mohammad H.; MANCERA, Ricardo L. The emerging application of ultrasound in lactose crystallisation. **Trends in food science & technology**, v. 38, n. 1, p. 47-59, 2014.

ZHOU, Xue et al. Taste improvement of Maillard reaction intermediates derived from enzymatic hydrolysates of pea protein. **Food Research International**, v. 140, p. 109985, 2021.