

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

**Jaqueline de Almeida Celestino**

**Efeito do teor de adição de sacarose ao leite sobre a composição, rendimento, viscosidade, cor e marcadores químicos da reação de Maillard em doce de leite**

**Juiz de Fora**  
**2023**

**Jaqueline de Almeida Celestino**

**Efeito do teor de adição de sacarose ao leite sobre a composição, rendimento, viscosidade, cor e marcadores químicos da reação de Maillard em doce de leite**

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. Ítalo Tuler Perrone

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Stephani

**Juiz de Fora**

**2023**

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

Celestino, Jaqueline de Almeida.

Efeito do teor de adição de sacarose ao leite sobre a composição, rendimento, viscosidade, cor e marcadores químicos da reação de Maillard em doce de leite / Jaqueline de Almeida Celestino. -- 2023. 88 f.

Orientador: Ítalo Tuler Perrone

Coorientador: Rodrigo Stephani

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. Sacarose . 3. Composição. 4. Reação de Maillard. I. Perrone, Ítalo Tuler, orient. II. Stephani, Rodrigo, coorient. III. Título.

**Jaqueline de Almeida Celestino**

**Efeito do teor de adição de sacarose ao leite sobre a composição, rendimento, viscosidade, cor e marcadores químicos da reação de Maillard em doce de leite**

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 27 de abril de 2023.

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Ítalo Tuler Perrone** - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof. Rodrigo Stephani** - Coorientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof. Dr. Evandro Martins**

Universidade Federal de Viçosa

**Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira**

Universidade Federal de Juiz de Fora



Documento assinado eletronicamente por **Evandro Martins, Usuário Externo**, em 28/04/2023, às 13:43, 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 03/05/2023, às 23:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Stephani, Professor(a)**, em 04/05/2023, às 17:15, 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 05/05/2023, às 09:17, 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](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1230688** e o código CRC **4D3C931B**.

Dedico este trabalho à minha mãe e ao meu pai por sempre acreditarem na educação como ferramenta fundamental para quem almeja o sucesso.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela minha vida e pela oportunidade de nascer em uma família que sempre me motivou seguir os meus sonhos.

Agradeço à minha mãe, Josélia e ao meu pai, Wilton por sempre me apoiarem, incentivarem em todos os momentos da minha vida e por não medirem esforços para me proporcionar a melhor educação possível. Mãe, você é minha melhor amiga e um exemplo de ser humano que busco ser. Pai, você é o meu incentivador e meu xodó. Obrigada por sempre estarem presentes e dispostos a me conceder tudo que não puderam ter, amo vocês infinitamente.

Agradeço ao meu namorado, Guilherme, por ser a pessoa que mais confia e acredita nos frutos que irei colher após todo o caminho que almejo traçar. Obrigada pela amizade, amor e companheirismo, por sempre segurar a minha mão nos momentos de maior tristeza e me motivar a seguir em diante mostrando que eu sou capaz. Eu te amo, sou extremamente feliz em poder tê-lo em minha vida.

Agradeço ao meu padrinho, Diogo e minha madrinha Flávia por toda ajuda, carinho, amor e incentivo para eu continuar buscando qualificação profissional. Amo vocês.

Agradeço as minhas tias Fátima e Janice e minha madrinha Michelle por todo acolhimento e amor, amo vocês.

Agradeço as minhas afilhadas Gabryelle e Maria Clara e ao meu priminho, Miguel, por serem meus alicerces nesta caminhada. Gaby você é brilhante e tenho muito orgulho dos passos que está trilhando. Maria Clara, você é maior preciosidade que Deus poderia colocar na minha vida, você chegou e trouxe consigo amor, fé, esperança, bondade e o sorriso mais lindo e puro do mundo. E você, Miguel, é o meu anjinho, a criança mais inteligente que conheço, que exala sabedoria e carinho. Eu amo muito vocês.

Agradeço as minhas amigas de infância, Mykaella, Caroline e Vitória, pela amizade de duas décadas e por todos os momentos vividos juntos. Amo vocês.

Agradeço aos meus amigos da graduação, João Marcos, Naiane e Letícia pela amizade e por compartilharem diversos momentos durante os anos de curso, a ajuda de vocês foi fundamental na minha trajetória.

Agradeço a todos do Laboratório de Química Bioinorgânica e Catálise, em especial, a Camila, Luísa e Giovana por toda amizade, carinho e ajuda no começo da minha empreitada

científica. A professora Maribel Navarro pela oportunidade, carinho e conhecimento ofertados a mim.

Agradeço a todos do Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite, em especial, aos professores Humberto Brandão e Juliana Gern que me receberam tão bem e me propiciaram uma nova experiência científica.

Agradeço a todos do Laboratório de Química e Tecnologia (QUIMTEC), sem colaboração não é possível realizar ciência. Em especial, a Natália Casas, Monisa Gouvêa, Maria Esther, Carolina Neves, Nathália Campos, Júlia Francisquini e ao Ramon Ativo por toda a ajuda durante o trabalho desenvolvido, seja na execução e discussão das análises realizadas ou pela ajuda na parte textual. Agradeço ao Taynan Barroso pelas ótimas aulas práticas de fabricação de queijo, manteiga, iogurte e requeijão. Agradeço ao Igor Lima, Mariana Braga, Natália Alves, Raquel Lima pelos auxílios, conversas, risadas e carinho.

Agradeço todos os professores do Laboratório QUIMTEC por todo conhecimento compartilhado. Em especial, ao meu orientador Ítalo Perrone e ao coorientador Rodrigo Stephani pela oportunidade de fazer parte de um grupo de pesquisa que eu já admirava, em um Mestrado Acadêmico de Inovação, pelo conhecimento que pude obter mediante discussões científicas, por todo suporte e auxílio durante a execução do trabalho proposto.

Agradeço a professora Juliana Costa, por sempre estar disposta a ajudar, conversar e auxiliar no que for preciso, sou grata pela experiência adquirida ao acompanhá-la durante análises de cromatografia líquida de alta eficiência.

Agradeço ao professor Rafael Arromba e sua aluna Bianca pela ajuda e auxílio com os experimentos de espectrometria de absorção atômica.

Agradeço a todos os membros do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, professores, secretarias e faxineiras por toda ajuda durante esta caminhada.

Agradeço aos órgãos de fomentos CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo financiamento que possibilitou a realização desse projeto.

Agradeço a empresa parceira FUNARBE, por me permitir desenvolver um projeto de extrema importância para seus objetivos.

## RESUMO

O doce de leite é um derivado lácteo concentrado, com amplo consumo e produção na América Latina. No Brasil, devido à extensão territorial e características culturais distintas, ocorrem variações nas tecnologias de produção e formulação utilizadas na fabricação do doce de leite, como o uso de variáveis quantidades de sacarose. O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Doce de Leite estabelece um valor máximo de 30 kg de sacarose por litro de leite na produção do doce. Contudo, as indústrias de laticínios ao optarem por uma rota tecnológica que utilize menor concentração de sacarose, visando o sabor lácteo mais pronunciado e um menor gosto doce no produto final, ou até mesmo, atendendo demandas do mercado para reduzir os teores de açúcar nos alimentos, podem se deparar com valores dos componentes lácteos fora dos parâmetros exigidos pela legislação vigente. Desse modo, o trabalho objetivou avaliar o efeito da adição de diferentes dosagens de sacarose ao leite durante a produção do doce de leite nos atributos de composição, rendimento, cor, viscosidade e sobre marcadores da reação de Maillard durante o armazenamento. Para isso, foram preparados quatro tratamentos alterando o teor de sacarose na formulação, foram realizadas análises de composição centesimal (umidade, gordura, cinzas, proteína e lactose) e físico-químicas (teor de sólidos solúveis, acidez, pH), rendimento, viscosidade, análise colorimétrica e índice de escurecimento das amostras. A composição mineral foi caracterizada e quantificada por microscopia eletrônica de varredura acoplada a espectroscopia de energia dispersiva, uma técnica alternativa para análise elementar, contudo buscou-se também a utilização da espectrometria de absorção atômica com chama, uma técnica de referência para confirmação dos resultados encontrados para o teor de cálcio e magnésio nas amostras. Além disso, realizou-se análise para determinação dos marcadores da reação de Maillard (5-hidroxi metilfurfural, 2-furaldeído, 5-metil-2-furfural e 2-furilmetilcetona) por cromatografia líquida de alta eficiência durante o armazenamento (com sete dias, trinta dias, quarenta e cinco dias e sessenta dias após a fabricação dos doces). Os resultados obtidos para a composição centesimal demonstram que, com maior adição de sacarose ao leite na produção do doce de leite, ocorre aumento do rendimento, redução percentual dos componentes lácteos, e conseqüentemente diminuição do teor de minerais presentes nas amostras. Os parâmetros de processo não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos fabricados. Ademais, as amostras apresentaram mesmo comportamento para os marcadores da reação de Maillard durante estocagem.

**Palavras-chave:** Doce de leite. Sacarose. Composição. Reação de Maillard.

## ABSTRACT

Dulce de leche is a concentrated dairy product, widely consumed and produced in Latin America. In Brazil, due to the territorial extension and distinct cultural characteristics, there are variations in the production technologies and formulation used in the manufacture of dulce de leche, such as the use of variable amounts of sucrose. The Technical Regulation of Identity and Quality of Dulce de Leche establishes a maximum value of 30 kg/L of sucrose in the production of the sweet. However, the dairy industries, when opting for a technological route that uses a lower concentration of sucrose, aiming at a more pronounced dairy flavor and a less sweet taste in the final product, or even, meeting market demands to reduce the sugar content in foods, are faced with values of dairy components outside the parameters required by current legislation. Thus, the study aimed to evaluate the effect of adding different sucrose dosages to milk during the production of dulce de leche on the attributes of composition, yield, color, viscosity and on markers of the Maillard reaction during storage. For this, four treatments were prepared, altering the sucrose content in the formulation, analysis of centesimal composition (moisture, fat, ash, protein and lactose) and physical-chemical analysis (content of soluble solids, acidity, pH), yield, viscosity, colorimetric analysis and darkening index of the samples. The mineral composition was characterized and quantified by scanning electron microscopy coupled with energy dispersive spectroscopy, an alternative technique for elemental analysis, however the use of flame atomic absorption spectrometry was also sought, a reference technique for confirming the results found. For the calcium and magnesium content in the samples. In addition, analysis was performed to determine the Maillard reaction markers (5-hydroxymethylfurfural, 2-furaldehyde, 5-methyl-2-furfural and 2-furylmethylketone) by high-performance liquid chromatography during storage (with seven days, thirty days, forty-five days and sixty days after making the sweets). The results obtained for the centesimal composition demonstrate that, with greater addition of sucrose to milk in the production of dulce de leche, there is an increase in yield, a percentage reduction in dairy components, and consequently a decrease in the mineral content present in the samples. The process parameters showed no statistical difference between the manufactured treatments. Furthermore, the samples showed the same behavior for the Maillard reaction markers during storage.

**Keywords:** Dulce de leche. Sucrose. Composition. Maillard reaction.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura sacarose. ....	20
Figura 2 - Estrutura dos furfurais. (A) 5-hidroximetilfurfural (HMF), (B) 2-furaldeído (F), (C) 5-metil-2-furfural (MF) e (D) 2- furilmetilcetona (FMC). ....	27
Figura 3 - Representação esquemática CLAE. (a): Compartimento de solvente; (b): bomba; (c): porta de injeção de amostra ou injetor automático; (d): compartimento da coluna; (e): detector(es); (f): registro e processamento de dados; (g): processador de desperdício. ....	28
Figura 4 - Esquema de funcionamento da técnica de EDS. ....	31
Figura 5 - Representação esquemática AAS. (i) uma lâmpada (geralmente emitindo linhas espectrais), (ii) um atomizador (uma chama ou um dispositivo eletrotérmico) onde os átomos gasosos da amostra são produzidos, (iii) um seletor de comprimento de onda para isolar a luz específica absorvida e (iv) um detector e sistema de leitura. ....	33
Figura 6 - Delineamento experimental para as amostras de doces de leite comerciais. ....	36
Figura 7 - Representação esquemática para a fabricação e análises das amostras de doces de leite experimentais. ....	38
Quadro 1 - Lista de ingredientes apresentada no rótulo dos doces de mercado. ....	49
Figura 8 - Análise das cinzas em MEV-EDS do doce de leite comercial A. (A) Espectro dos elementos presentes na amostra; (B) Imagem em magnificação de 500x das cinzas; (C) Gráfico da porcentagem em peso de cada elemento presente na amostra analisada. ....	50
Figura 9 - Espaço de cores para a média geral das amostras de mercado analisadas. ....	53
Figura 10 - Doces de leite comerciais das marcas A, B, C, D, E e F. ....	54
Figura 11 - Análise das cinzas em MEV-EDS do leite usado nas produções. (A) Espectro dos elementos presentes na amostra; (B) Imagem em magnificação de 500x das cinzas; (C) Gráfico da porcentagem em peso de cada elemento presente na amostra analisada. ....	60
Figura 12 - Análise das cinzas em MEV-EDS do doce produzido com 15% (m/m) de sacarose. (A) Espectro dos elementos presentes na amostra; (B) Imagem em magnificação de 500x das cinzas; (C) Gráfico da porcentagem em peso de cada elemento presente na amostra analisada. ....	61

Gráfico 1 - Curvas analíticas para os elementos (A) cálcio e (B) magnésio.....	64
Figura 13 - Doces de leite produzidos com os valores de L*: luminosidade, a*: vermelho e b*: amarelo e índice de escurecimento (BI), utilizados para avaliar a intensidade da cor marrom das amostras. * a-d Médias seguidas da mesma letra para o mesmo parâmetro não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.....	69
Gráfico 2 - Curvas analíticas dos marcadores da reação de Maillard: (A) 5-hidroxiacetilfurfural (HMF), (B) 2-furaldeído (F), (C) 2-furilmetilcetona (FMC), (D) 5-metil-2-furfural (MF).....	69
Gráfico 3 - Análise tempo de estocagem versus concentração de HMF nos tratamentos T15, T20, T25 e T30.....	73
Gráfico 4 - Análise BI versus tempo de estocagem para os tratamentos T15, T20, T25 e T30.....	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição mineral do leite de vaca.....	22
Tabela 2 - Concentração dos minerais entre as fases solúvel e coloidal. ....	22
Tabela 3 - Concentrações teóricas de minerais (mM) na fase solúvel do leite em pH 6,75 a 20- 25 °C. ....	23
Tabela 4 - Modo de eluição gradiente aplicado para determinação dos marcadores da RM. .	44
Tabela 5 - Resultados dos parâmetros analisados para as amostras de doces de leite comerciais. ....	46
Tabela 6 - Correlação entre os atributos analisados para as diferentes marcas comerciais.....	48
Tabela 7 - Composição mineral das amostras de doces comerciais. ....	51
Tabela 8 - Resultados da análise de colorimetria dos doces de leite comerciais.....	52
Tabela 9 - Resultados dos parâmetros centesimais dos doces de leite experimentais (n=3). *	55
Tabela 10 - Resultados dos parâmetros de processo das amostras experimentais de doces de leite (n=3). * .....	57
Tabela 11 - Correlação entre os atributos analisados. ....	58
Tabela 12 - Resultados da composição mineral das amostras de doces fabricadas (n=3).*.....	62
Tabela 13 - Correlação entre o teor de minerais e a adição de açúcar nos doces produzidos. .	63
Tabela 14 - Concentração de cálcio e magnésio por FAAS nas amostras fabricadas (n=3). ...	65
Tabela 15 - Comparação das concentrações de cálcio e magnésio por FAAS e EDS nas amostras de doces de leite experimentais (n=3). ....	66
Tabela 16 - Resultados da análise de colorimetria dos doces de leite produzidos (n=3).* .....	67
Tabela 17 - Resultados do ensaio de recuperação para o HMF nas amostras de doces de leite produzidos.....	71
Tabela 18 - Resultados da análise de HMF nas amostras de doces de leite (n=2).* .....	72
Tabela 19 - Resultados da análise de BI dos doces de leite durante a estocagem (n=2).* .....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Atomic Absorption Spectrometry
ACN	Acetonitrila
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ATD	Acidez total desenvolvida
a*	Coordenada chroma verde ao vermelho
b*	Coordenada chroma azul ao amarelo
BI	Browning Index
BI30	Índice de escurecimento após trinta dias
BI45	Índice de escurecimento após quarenta e cinco dias
BI60	Índice de escurecimento após sessenta dias
C	Concentração
C*	Croma
Ca	Cálcio
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
CV	Coefficiente de variação
Cit <sup>3-</sup>	Íon citrato
Cl	Cloro
Cl <sup>-</sup>	Íon cloreto
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
°C	Graus Celsius
DL	Doce de leite
D7	Sete dias após a fabricação
D30	Trinta dias após a fabricação
D45	Quarenta e cinco dias após a fabricação
D60	Sessenta dias após a fabricação
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva por raios-X
EDXA	Espectroscopia de análise de energia dispersiva de raios-X
EDXMA	Espectroscopia de microanálise de energia dispersiva de raios-X
ETAAS	Espectrometria de absorção atômica em eletrotérmica
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama
F	2-furaldeído

FC	Fator de concentração
FMC	2- furilmetilcetona
FUNARBE	Fundação Arthur Bernardes
g	Gramas
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite
$h_{ab}$	Ângulo
HMF	5-hidroxi metilfurfural
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I	Intensidade transmitida
$I_0$	Intensidade
ISO	International Organization for Standardization
K	Potássio
kg	Kilograma
$K^+$	Íon potássio
L	Litro
m	massa
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF	5-metil-2-furfural
mg	miligrama
MG	Minas Gerais
Mg	Magnésio
$Mg^{2+}$	Íon magnésio
Min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Mn	Manganês
Na	Sódio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sódio
$Na^+$	Íon sódio
nm	Nanômetro
QUIMTEC	Química e Tecnologia

OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Fósforo
PDA	Photodiode Array Detector
pH	Potencial hidrogeniônico
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Íon fosfato
RM	Reação de Maillard
RMF	Resíduo mineral fixo
RTIQDL	Regulamento de Identidade e Qualidade de Doce de Leite
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TCA	Ácido tricloroacético
T15	Doce de leite com 15% (m/m) de sacarose
T20	Doce de leite com 20% (m/m) de sacarose
T25	Doce de leite com 25% (m/m) de sacarose
T30	Doce de leite com 30% (m/m) de sacarose
UV-Vis	Ultravioleta Visível
v	Volume
Zn	Zinco
μ	Micro
μm	Micrômetro
%	Porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>19</b>
2.1	DOCE DE LEITE .....	19
2.2	SACAROSE.....	20
2.3	COMPOSIÇÃO MINERAL DO LEITE .....	21
2.4	REAÇÃO DE MAILLARD.....	25
2.5	TÉCNICAS ANALÍTICAS .....	28
<b>2.5.1</b>	<b>Cromatografia líquida de alta eficiência.....</b>	<b>28</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X .....</b>	<b>30</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Espectrometria de absorção atômica .....</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
4.1	AQUISIÇÃO DOS DOCES DE LEITE COMERCIAIS .....	36
4.2	ANÁLISE DOS DOCES DE LEITE COMERCIAIS .....	36
4.3	FABRICAÇÃO DOS DOCES DE LEITE EXPERIMENTAIS .....	37
4.4	FATOR DE CONCENTRAÇÃO .....	39
4.5	DETERMINAÇÃO DOS ATRIBUTOS CENTESIMAIS E FÍSICO-QUÍMICOS.....	39
<b>4.5.1</b>	<b>Umidade.....</b>	<b>39</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Gordura .....</b>	<b>39</b>
<b>4.5.3</b>	<b>Cinzas.....</b>	<b>40</b>
<b>4.5.4</b>	<b>Proteína.....</b>	<b>40</b>
<b>4.5.5</b>	<b>Lactose .....</b>	<b>40</b>
<b>4.5.6</b>	<b>Carboidratos totais .....</b>	<b>40</b>
<b>4.5.7</b>	<b>Sacarose .....</b>	<b>41</b>
<b>4.5.8</b>	<b>Teor de sólidos solúveis .....</b>	<b>41</b>

<b>4.5.9</b>	<b>Viscosidade aparente</b> .....	<b>41</b>
<b>4.5.10</b>	<b>Acidez</b> .....	<b>41</b>
<b>4.5.11</b>	<b>pH</b> .....	<b>42</b>
<b>4.5.12</b>	<b>Colorimetria</b> .....	<b>42</b>
4.6	CARACTERIZAÇÃO DO TEOR DE MINERAIS DAS CINZAS DO DOCE DE LEITE PELA TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA ACOPLADA A ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA.....	42
4.7	DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO E MAGNÉSIO NAS AMOSTRAS DE DOCE DE LEITE PRODUZIDAS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA .....	43
<b>4.7.1</b>	<b>Abertura das amostras</b> .....	<b>43</b>
<b>4.7.2</b>	<b>Determinação analítica</b> .....	<b>43</b>
4.8	QUANTIFICAÇÃO DOS MARCADORES DA REAÇÃO DE MAILLARD NAS AMOSTRAS DE DOCES DE LEITE .....	44
<b>4.8.1</b>	<b>Parâmetros cromatográficos</b> .....	<b>44</b>
<b>4.8.2</b>	<b>Reagentes</b> .....	<b>45</b>
<b>4.8.3</b>	<b>Preparo de amostra para determinar os furfurais livres</b> .....	<b>45</b>
<b>4.8.4</b>	<b>Taxa de recuperação</b> .....	<b>45</b>
4.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	45
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
5.1	ANÁLISE DOS DOCES DE LEITE COMERCIAIS .....	46
<b>5.1.1</b>	<b>Análises composicionais e físico-químicas</b> .....	<b>46</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Caracterização mineral das cinzas obtidas dos doces de leite comerciais</b> .....	<b>49</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Análise de cor dos doces de leite comerciais</b> .....	<b>52</b>
5.2	ANÁLISE DOS DOCES DE LEITE EXPERIMENTAIS .....	54
<b>5.2.1</b>	<b>Análises composicionais e físico-químicas</b> .....	<b>54</b>

5.2.2	Caracterização dos minerais presentes nas cinzas dos doces de leite experimentais através do microscópio eletrônico de varredura acoplado a espectroscopia de energia dispersiva.....	59
5.2.3	Determinação de cálcio e magnésio nas amostras de doce de leite produzidas por espectrometria de absorção atômica com chama.....	64
5.2.4	Análise de cor dos doces de leite produzidos .....	67
5.2.5	Quantificação dos marcadores da reação de Maillard nas amostras de doces de leite .....	69
5.2.5.1	<i>Curvas analíticas para os marcadores da reação de Maillard.....</i>	<i>69</i>
5.2.4.2	<i>Taxa de recuperação.....</i>	<i>70</i>
5.2.4.3	<i>Determinação dos marcadores da reação de Maillard, 5-hidroximetilfurfural (HMF), 2-furaldeído (F), 5-metil-2-furfural (MF) e 2-furilmetilcetona (FMC) por cromatografia líquida de alta eficiência.....</i>	<i>71</i>
6	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>76</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>78</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O trabalho desenvolvido neste documento é referente ao Mestrado Acadêmico de Inovação (MAI) em alimentos e bebidas, vinculado ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora em parceria com a Fundação Arthur Bernardes (FUNARBE). A matriz alimentícia de interesse, escolhida para a execução do projeto, foi o doce de leite, visto que a empresa FUNARBE é fabricante do conhecido doce de leite “Viçosa” e na literatura ainda é um tema pouco discutido. Sabe-se que o doce de leite é um alimento produzido principalmente na América Latina. No Brasil atualmente encontra-se o maior parque industrial para a sua produção (INOVALEITE, 2022). Conforme as características das linhas de processamento empregadas e das expectativas do mercado consumidor, diferentes tipos de doce são fabricados (PERRONE *et al.*, 2011).

Dentre as diferentes possibilidades de fabricação do doce de leite, existe um grande interesse na produção deste produto com menor adição de sacarose (valores inferiores ao máximo permitido pela legislação). A empresa parceira tem a característica de produzir doces com quantidades menores de sacarose. Isto pode resultar em um produto com gosto doce menos acentuado, sabor lácteo mais pronunciado, menor valor calórico e aumento da qualidade nutricional. Contudo, as indústrias e produtores que escolhem essa rota tecnológica, encontram muitas vezes dificuldades legais para a comercialização do produto, uma vez que menores teores de adição de sacarose podem aumentar os teores de cinzas no produto final, podendo atingir valores não permitidos pela legislação (máximo 2,0 % m/m) em vigor para esse atributo (BRASIL, 1997).

Visando contribuir para a caracterização deste problema tecnológico e apresentar dados técnicos e científicos que possam ser relevantes para as indústrias e para órgãos de fiscalização, este trabalho possui como objetivo estudar o efeito do teor de sacarose adicionado ao leite para a produção de doce de leite sobre os atributos de composição, rendimento de fabricação, viscosidade, cor e sobre marcadores do escurecimento não enzimático do produto final. E a partir das cinzas obtidas, caracterizar e determinar os minerais presentes nas amostras, ainda não há na literatura estudos que demonstrem a composição mineral em doces de leite experimentais por meio de uma técnica alternativa, rápida e que não necessite de um preparo de amostra. Com o intuito de conhecer e aprender os métodos de análises e técnicas analíticas utilizados neste trabalho, foi realizado um estudo teste com doces de leite comercializados em mercados locais de Juiz de Fora/MG.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

O referencial teórico abordará os seguintes temas: doce de leite, sacarose, reação de Maillard e as técnicas analíticas empregadas para a caracterização do presente estudo como: cromatografia líquida de alta eficiência, espectroscopia de energia dispersiva e espectrometria de absorção atômica.

### 2.1 DOCE DE LEITE

O doce de leite (DL) é um produto lácteo concentrado fabricado em pequenas, médias e grandes indústrias no Brasil, sendo um alimento consumido popularmente, devido ao seu sabor, textura e aroma característico (PERRONE; STEPHANI; NEVES, 2011). O DL possui origem sul-americana, tendo o Brasil, Argentina e Uruguai como os principais consumidores e produtores (LIMA *et al.*, 2020). No Brasil, Minas Gerais destaca-se como o estado com mais de 60% da fabricação nacional (DURCO *et al.*, 2021).

O DL é comumente consumido como uma sobremesa láctea, sendo fabricado tradicionalmente pelo leite, acrescido de açúcar, seguido pelo processo de evaporação e cozimento. O produto final possui cor, textura, sabor e aroma desejáveis pelos consumidores, características essas, resultantes principalmente da reação de escurecimento não enzimático, conhecida como reação de Maillard (RM) (DEMIATE; KONKEL; PEDROSO, 2001).

Todavia, existe uma ampla variabilidade de produtos no mercado brasileiro, pois a produção de DL não é uniforme e nem padronizada. Isso pode ocorrer pela grande diversidade cultural em todo território nacional, existência de vários tipos de indústrias (pequenas, médias e grandes), assim como diferentes rotas de processamentos tecnológicos, distintas formulações, e ausência de uma legislação atualizada (GAZE *et al.*, 2015; VARGAS *et al.*, 2021).

O Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Doce de Leite (RTIQDL) foi relatado pela Portaria N° 354 de 4 de setembro de 1997 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e é vigente até os dias atuais para o Mercado Comum do Sul (MERCOSUL). Na qual, o DL é considerado o produto com ou sem adição de outras substâncias alimentícias, obtido por concentração e ação do calor a pressão normal ou reduzida do leite ou leite reconstituído, com ou sem adição de sólidos de origem láctea e/ou creme e adicionado de sacarose (parcialmente substituída ou não por monossacarídeos e/ou

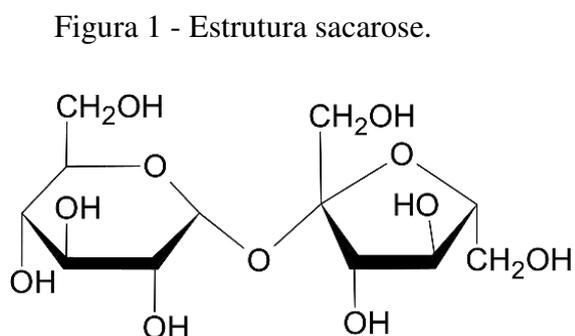
outros dissacarídeos). Como componentes obrigatórios têm-se o leite e/ou leite reconstituído e sacarose no máximo de 30 kg/L de leite (BRASIL, 1997).

A sacarose desempenha função importante em atributos do DL como sabor, rendimento, consistência, brilho e a aderência da proteína às superfícies do equipamento (STEPHANI *et al.*, 2019). Contudo, o Ministério da Saúde, em 2018, estabeleceu com os presidentes de associações do setor produtivo de alimentos, a redução do teor de açúcar nos alimentos até 2022 (BRASIL, 2018). Como consequência da menor adição de açúcar, o conteúdo de componentes do leite como gordura, proteína e cinzas podem aumentar no produto final (PERRONE *et al.*, 2019), isso se deve ao maior fator de concentração durante a evaporação.

Entretanto, a legislação determina que os valores máximos de umidade e cinzas sejam respectivamente 30,00 e 2,0 g/100 g, o mínimo de proteína deve ser 5,0 g/100 g e o conteúdo de matéria gorda deve estar entre 6,00 e 9,00 g/100 g (BRASIL, 1997). Dessa forma, visando atender a demanda por DL com gosto menos doce ou com menor teor de carboidratos, as indústrias de laticínios podem fabricar produtos com teores de cinzas superiores aos exigidos pela legislação vigente.

## 2.2 SACAROSE

A sacarose é um dissacarídeo, formada através da ligação dos carbonos anoméricos de dois monossacarídeos (glicose e frutose), na Figura 1 é apresentado a estrutura química da sacarose (FERREIRA *et al.*, 2009).



Fonte. Elaborado pela autora (2023).

A sacarose também é popularmente conhecida como açúcar de mesa, sendo um glicídio que está presente em diferentes tipos de alimentos, como em grãos, vegetais e frutas (MANHANI *et al.*, 2014). Além disso, é considerado o açúcar com mais utilização no mundo

(BRASIL, 2018), sua extração advém de duas importantes fontes naturais, a cana-de-açúcar e a beterraba (FERREIRA *et al.*, 2019). Ademais, a sacarose é usualmente adicionada na fabricação de vários produtos alimentícios, entre eles, sorvetes, refrigerantes e doces (MANHANI *et al.*, 2014)

No DL, a sacarose é um componente obrigatório (BRASIL, 1997), que pode ser empregado na sua forma cristal ou refinada (PERRONE *et al.*, 2019). Sua utilização no DL desempenha papéis fundamentais na textura, no sabor, rendimento e viscosidade final do produto. Além disso, apresenta vantagens devido a seu custo baixo e elevada disponibilidade de acesso do consumidor (PERRONE *et al.*, 2019). A sacarose é um açúcar não redutor, logo, não participa da reação de escurecimento não enzimático que acontece no DL (PERRONE *et al.*, 2019).

O teor de açúcar adicionado ao doce durante a produção pelas indústrias de DL varia de acordo com o objetivo de cada marca, do tipo de doce fabricado, da escolha das características que o alimento oferece aos consumidores, como o doce com mais sabor lácteo ou com um gosto mais doce (PERRONE *et al.*, 2019). Entretanto, muitas fábricas que se caracterizam por possuírem um produto com sabor lácteo mais pronunciado encontram-se fora dos limites estabelecidos pela legislação de DL, que vem se mostrando desatualizado com base nas regionalidades encontradas no Brasil e pela tendência de mercado na consolidação da redução de açúcar adicionado nos alimentos.

O excesso do consumo dos carboidratos pode ocasionar doenças como obesidade e diabetes, a Organização Mundial de Saúde (OMS) sugere que a ingestão calórica diária de açúcar não ultrapasse 10% do total energético diário (MANHANI *et al.*, 2014), contudo para obter melhores resultados na saúde recomenda-se que o consumo de açúcar seja de no máximo 5% do consumo total de calorias ingeridas (DI MÔNACO *et al.*, 2018). De acordo o Ministério da Saúde, 61,3% da população no Brasil consome excessivamente açúcar. Dessa forma, foi registrado um compromisso do ministério juntamente com o setor produtivo de alimentos para a diminuição de açúcar nos alimentos (BRASIL, 2018).

### 2.3 COMPOSIÇÃO MINERAL DO LEITE

O leite é composto principalmente por proteínas, gordura, lactose e minerais. A parte mineral representa cerca de 0,8% dos constituintes no leite de vaca. Na fração salina do leite são encontrados cátions (cálcio, magnésio, sódio e potássio) e ânions (fosfato inorgânico, citrato e cloreto), a faixa de concentração desses principais minerais no leite de vaca é

mostrada na Tabela 1 (GAUCHERON, 2005). O conteúdo mineral do leite não é sempre constante, pois é influenciado por vários fatores, como estágio de lactação, estado nutricional do animal, fatores ambientais e genéticos (CASHMAN, 2006).

Tabela 1 - Composição mineral do leite de vaca.

<b>Mineral</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração (mmol.kg<sup>-1</sup>)</b>
<i>Cátion</i>		
Cálcio	1040-1280	26-32
Potássio	1210-1680	31-43
Sódio	350-600	17-28
Magnésio	100-150	4-6
<i>Ânion</i>		
Fosfato inorgânico	1800-2180	19-23
Citrato	1320-2080	7-11
Fósforo total	930-1000	30-32
Cloreto	780-1200	22-34

Fonte: Adaptado de (LUCEY & HORNE, 2022).

No leite, os sais estão distribuídos entre as fases solúvel (aquosa) e coloidal (micelar) (ORDOÑEZ *et al.*, 2005). Sendo que, os íons potássio, sódio e cloreto estão essencialmente presentes na fase aquosa, tendo uma baixa concentração na fase coloidal (GAUCHERON, 2005). Enquanto os demais íons (cálcio, fosfato inorgânico, magnésio e citrato) encontram-se mais fracionados entre as duas fases (GAUCHERON, 2005). Estima-se que dois terços do cálcio total, metade do fosfato inorgânico, um terço do magnésio e cerca de 10% do citrato estão na fase coloidal (GAUCHERON, 2005). Na Tabela 2, é apresentada a partição dos minerais entre as fases solúvel e micelar.

Tabela 2 - Concentração dos minerais entre as fases solúvel e coloidal.

<b>Mineral</b>	<b>Fase Solúvel (%)</b>	<b>Fase Coloidal (%)</b>
Cálcio	31	69
Potássio	94	6
Sódio	95	5
Magnésio	53	47
Fosfato inorgânico	47	53
Citrato	14	86
Cloreto	95	5

Fonte: Adaptado de (LUCEY & HORNE, 2022).

Os íons na parte solúvel do leite ocorrem associados ou livres, conforme as constantes de associação ou afinidade entre cátions e ânions, e também das solubilidades dos sais formados (GAUCHERON, 2005). Na Tabela 3 é mostrado o resultado de concentrações obtidas a partir da realização de cálculo teórico para os cátions e ânions livres ou associados entre si na fase solúvel do leite em pH 6,75 a 20-25 °C, segundo Mekmene *et al.* (2009). É possível verificar que o cálcio solúvel se apresenta em três formas distintas: principalmente associado ao citrato, como íon livre e associado, em menor grau, ao cloreto e fosfato inorgânico (mistura de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{HPO}_4^{2-}$ ). O fosfato de cálcio apresenta baixa concentração devido à sua baixa solubilidade na fração aquosa do leite. Os íons sódio, potássio e cloreto estão presentes principalmente como íons livres, contudo, encontram-se em uma pequena parte associados ao citrato, fosfato inorgânico e cloreto (MEKMENE *et al.*, 2009).

Tabela 3 - Concentrações teóricas de minerais (mM) na fase solúvel do leite em pH 6,75 a 20-25 °C.

Ânion	Íon livre	Íon complexado			
		Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
Cit <sup>3-</sup>	0,17	6,04	1,79	0,02	0,03
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	3,65	0,07	0,02	0,05	0,08
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	3,67	0,60	0,67	0,51	0,69
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
Cl <sup>-</sup>	27,80	0,24	0,09	0,34	0,58
Íon livre	-	2,12	1,14	20,90	36,26

Fonte: Adaptado de (MEKMENE *et al.*, 2009).

Os minerais do leite não são fontes de energia, mas contribuem para diversas funções vitais no corpo. O sódio é o cátion extracelular predominante e mantém a pressão osmótica dos fluidos extracelulares (VAHČIĆ *et al.*, 2010). Juntamente com o potássio, ele atua para manter a distribuição adequada da água corporal e da pressão sanguínea, e também é importante na manutenção adequada do equilíbrio ácido-base e na transmissão dos impulsos nervosos (JONHSON, 2010). Além disso, o sódio ativa algumas enzimas como a amilase (BELITZ *et al.*, 2004).

O cloreto é o principal ânion extracelular e é essencial na manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico (CASHMAN, 2011). O potássio é o principal cátion intracelular, ocorrendo na célula em uma concentração superior a 30 vezes sua concentração no líquido extracelular (CASHMAN, 2011). O potássio extracelular contribui para a transmissão dos impulsos nervosos, para o controle da contração do músculo esquelético e para a manutenção da

pressão arterial (CASHMAN, 2011). A deficiência de potássio está associada a vários sintomas como fadiga, reflexos lentos, fraqueza muscular e pele seca (BEITZ *et al.*, 2004).

Em circunstâncias normais, não ocorre deficiência dietética de sódio, potássio ou cloreto, mas o corpo pode ficar sem sódio e cloreto em condições extremas, por exemplo, transpiração intensa, diarreia crônica ou doença renal (CASHMAN, 2011). A depleção de potássio pode ocorrer no corpo em condições onde há grandes perdas alimentares ou renais (CASHMAN, 2011). Requisitos mínimos de sódio, potássio e cloreto (por exemplo, 500, 2.000 e 750 mg.dia<sup>-1</sup>, respectivamente, em adultos) foram estabelecidos (CASHMAN, 2011). O leite de vaca contribui pouco para a ingestão dietética de sódio, mas alguns produtos lácteos, como queijo e manteiga, contêm adição de sal e podem ser fontes significativas de sódio em alguns países (CASHMAN, 2011).

Do total de cálcio no corpo, 99% é encontrado nos ossos e dentes, onde está presente na forma de fosfato de cálcio, proporcionando força e estrutura (CASHMAN, 2011). O 1% restante, é encontrado em fluidos extracelulares e estruturas intracelulares, sendo responsável por uma série de funções reguladoras, como manutenção do batimento cardíaco normal, coagulação sanguínea, secreção hormonal, integridade das substâncias, contração da musculatura e ativação de enzimas (CASHMAN, 2011). A ingestão diária recomendada de cálcio é de cerca de 1.000 a 1.300 mg para adultos, mulheres grávidas e lactantes, 1.300 mg para adolescentes e 1.200 mg idosos (PADOVANI *et al.*, 2006). Leite e derivados são importantes fontes de cálcio; sendo que 600 mL de leite correspondem a 720 mg de cálcio (ou seja, 60% a 80% da ingestão diária recomendada) (GAUCHERON, 2011). Assim, os produtos lácteos contribuem com mais da metade de cálcio na dieta humana (POINTILLART, GUÉGUEN, 2004; FLYN, 1992; FLYN & CASHMAN, 1997).

O fósforo é considerado um nutriente essencial na vida dos seres humanos e desempenha várias funções biológicas importantes (VAHČIĆ *et al.*, 2010), sendo um componente essencial de muitas moléculas biológicas, incluindo lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos; e desempenha um papel central no metabolismo (CASHMAN, 2011). Associado ao cálcio, como fosfato de cálcio, é um componente estrutural importante dos ossos e dentes (CASHMAN, 2011). Como o fósforo está presente em quase todos os alimentos, geralmente não ocorre deficiência de fósforo na dieta (GAUCHERON, 2011). O leite de vaca e produtos lácteos (como queijo e iogurte) são boas fontes dietéticas de fósforo, estudos demonstram que em países ocidentais esses alimentos contribuem de 30 a 45% na ingestão total de fósforo (CASHMAN, 2011).

O magnésio tem um papel essencial em uma ampla variedade de processos fisiológicos, incluindo metabolismo de proteínas e ácidos nucleicos, transmissão neuromuscular e contração muscular, crescimento e metabolismo ósseo e regulação da pressão sanguínea, além de atuar como cofator para muitas enzimas (CASHMAN, 2011). A deficiência dietética de magnésio é incomum, exceto em condições de desnutrição grave e certos estados de doença, o que pode alterar o metabolismo do cálcio e seu hormônio regulador (LUKASKI, 2004; CNS, 2001). Apesar de sua concentração ser relativamente baixa, os produtos lácteos podem ser considerados fontes desse mineral, pois 600 mL de leite fornecem 65 mg, correspondendo a cerca de 16% da dose diária recomendada (GAUCHERON, 2011).

Através das cinzas, um resíduo remanescente da queima da matéria orgânica em forno mufla à 550 °C é possível obter uma indicação da quantidade de minerais presentes em um alimento (CHEUNG & MEHTA, 2015). Sais e cinzas são denominações distintas, pois o processo de incineração que o leite é submetido causa a perda de ácidos orgânicos, como citrato e acetato (WALSTRA, 2006). Além disso, o fósforo orgânico e o enxofre são transferidos para os sais inorgânicos (WALSTRA, 2006), pode haver ainda vaporização de compostos voláteis, como o cloro (FOX; MCSWEENEY, 1998). Dessa forma, a quantificação das cinzas é um indicador do conteúdo mineral do leite.

## 2.4 REAÇÃO DE MAILLARD

A RM é uma importante reação de escurecimento não enzimático que ocorre nos alimentos e em organismos vivos (glicação), com influência em aspectos químicos, nutricionais, toxicológicos, sensoriais e organolépticos (BASTOS *et al.*, 2011; MEHTA & DEETH, 2016). Em 1912, Louis-Camille Maillard descreveu a reação ao observar o escurecimento e formação de aroma durante a síntese de um peptídeo, logo, a reação foi batizada de reação de Maillard (FRANCISQUINI *et al.*, 2017). A RM consiste em uma série de reações em cascata que se inicia principalmente através da ação do calor e armazenamento prolongado dos alimentos, o que ocasiona a formação de compostos que geram aroma, sabor e cor (BASTOS *et al.*, 2011; FRANCISQUINI *et al.*, 2017). A reação se processa em três estágios: inicial, intermediário e final (FRANCISQUINI *et al.*, 2017).

No estágio inicial ocorre a condensação do grupo carbonila do açúcar redutor com o grupamento amino livre de aminoácidos, peptídeos ou proteínas, através do ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio do grupo amino, formando a base de Schiff

(composto instável) e liberação de água. Subsequente, a base de Schiff sofre rearranjos e transforma-se em um composto com mais estabilidade, conhecido como produto de Amadori (açúcar aldose) ou produto de Heyns (açúcar cetose). Esses produtos formados são estáveis, incolores e não possuem fluorescência ou absorção na região ultravioleta (BASTOS *et al.*, 2011; BRIÃO *et al.*, 2011; FENNEMA, 2010; MEHTA & DEETH, 2016).

A RM prossegue no estágio intermediário com a fragmentação dos produtos de Amadori ou produtos de Heyns de acordo com o pH do meio, que irá desencadear reações como desidratação, enolização e retroaldolização. Nessa etapa, pode haver a formação de compostos dicarbonílicos, produtos da degradação de Strecker, redutonas, furfural (pentose), e uma hexose amplamente conhecida por 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) (BASTOS *et al.*, 2011; BRIÃO *et al.*, 2011; FENNEMA, 2010; MEHTA & DEETH, 2016). Diferente do que ocorre no estágio inicial, no estágio intermediário os compostos gerados são fluorescentes e com capacidade de absorção da radiação na região ultravioleta (NOOSHKAM; VARIDI; BASHASH, 2019).

No estágio final da RM, os compostos originados na etapa intermediária reagem entre si se polimerizando com resíduos de lisina ou arginina em proteínas, que levam a formação de uma substância polimérica nitrogenada, de cor marrom e com elevada massa molecular (até cerca de  $100,00 \text{ g.mol}^{-1}$ ), as chamadas melanoidinas (MEHTA & DEETH, 2016). Estes pigmentos fornecem alteração de cor aos produtos alimentícios, sendo desejáveis ou indesejáveis pela indústria (BASTOS *et al.*, 2011; BRIÃO *et al.*, 2011; FENNEMA, 2010).

Os principais fatores que influenciam na RM são: temperatura, pH, atividade de água, natureza do carboidrato, natureza do aminoácido (PERRONE *et al.*, 2019). Em temperaturas mais baixas a RM ocorre com velocidade mais lenta (armazenamento do produto) e em temperaturas altas, com maior velocidade (aquecimento do produto) (FRANCISQUINI *et al.*, 2017). A RM é favorecida em pH mais alcalino, sendo sua velocidade máxima entre pH 9 e 10 (CARNEIRO *et al.*, 2021). A atividade de água (entre 0,4 e 0,8), favorece a RM, uma vez que a atividade de água muito baixa diminui a mobilidade dos reagentes e, em contrapartida, valores muito altos fazem com que ocorra a diluição dos reagentes (LUND & RAY, 2017).

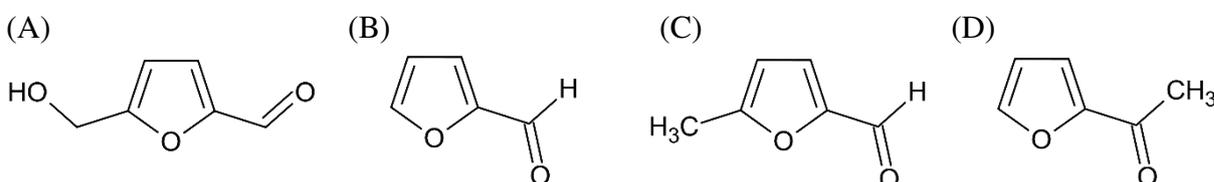
A natureza do carboidrato também é um fator que afeta a RM devido à reatividade, para participar da reação o açúcar deve ser redutor; sendo que as pentoses são mais reativas, seguidas das hexoses e dissacarídeos (BERTRAND *et al.*, 2018). O tipo de aminoácido envolvido implica diretamente na facilidade de ocorrência da RM, a lisina é um aminoácido de alta reatividade, por apresentar grupo amino épsilon livre (DAMODARAN *et al.*, 2008; FRANCISQUINI *et al.*, 2017). A compreensão dos fatores que afetam diretamente a RM é

essencial para a produção de DL, pois a cor almejada depende das características desejadas pelo mercado consumidor.

Através dos compostos gerados durante a RM é possível monitorar a extensão da reação, o que possibilita averiguar a intensidade do processamento térmico aplicado, e a redução do valor nutricional de aminoácidos essenciais como a lisina (PERRONE *et al.*, 2019). Entre estes compostos estão: a furosina, carboximetilisina e derivados furfurais (RUFÍAN & DELGADO, 2009a; RUFÍAN; DELGADO; MORALES, 2009b; CHARISSOU AMEUR; ARAGON, 2007).

O 5-hidroximetilfurfural (HMF) é o furfural mais estudado, por ser um dos produtos intermediários mais estáveis. Pode ser formado em produtos lácteos durante os processos térmicos e armazenamento prolongado. Quando o pH do meio é menor que 7, as principais moléculas formadas na fase intermediária da RM são os furfurais, produtos da via de 1,2-enolização. Se o açúcar inicial for uma hexose o produto dominante será o HMF e se for uma pentose será o furfural (F). Outros furfurais, como 2-furaldeído (F), 5-metil-2-furfural (MF) e 2-furilmetilcetona (FMC), são formados em temperaturas ligeiramente mais altas. Esses furfurais conforme mostrados na Figura 2, podem ainda ser formados por meio de vias de interconversão a partir do HMF, em estágio avançado da RM ou sob condições de aquecimento mais intenso e armazenamento de longa duração (CHÁVEZ-SERVÍN; CASTELLOTE; LÓPEZ-SABATER, 2005; FERRER *et al.*, 2000; ERBERSDOBLER & SOMOZA, 2007).

Figura 2 - Estrutura dos furfurais. (A) 5-hidroximetilfurfural (HMF), (B) 2-furaldeído (F), (C) 5-metil-2-furfural (MF) e (D) 2-furilmetilcetona (FMC).



Fonte. Elaborado pela autora (2023).

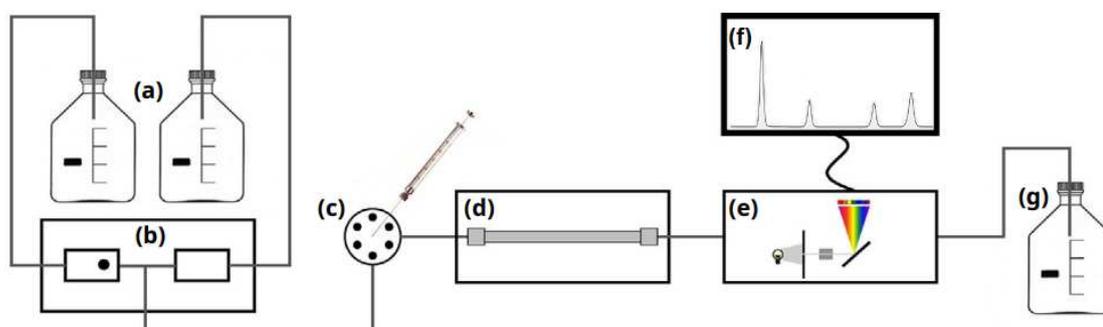
## 2.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS

As técnicas analíticas empregadas neste estudo para identificação e quantificação dos marcadores químicos da reação de Maillard e composição mineral em doce de leite são apresentadas nos tópicos seguintes.

### 2.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou da sigla em inglês mais comumente conhecida por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), é uma técnica analítica de separação amplamente aplicada, sendo muito utilizada no controle de qualidade nas indústrias farmacêutica e alimentícia e no controle ambiental (GIKA, 2016). A CLAE usa alta pressão para forçar a fase móvel e um analito através de uma coluna fechada com partículas de tamanho de micron, a coluna cromatográfica, que constituem a fase estacionária proporcionando eficientes separações (GIKA, 2016). A instrumentação da CLAE é composta tipicamente por componentes como: fase móvel/reservatório de solvente, sistema de bombeamento de solvente, dispositivo de injeção de amostra, compartimento de coluna, detector, coleta de dados e sistema de saída, processamento de eluente pós-detector (LACOURSE, 2017). Na Figura 3 é mostrado esquematicamente o sistema de instrumentação da CLAE.

Figura 3 - Representação esquemática CLAE. (a): Compartimento de solvente; (b): bomba; (c): porta de injeção de amostra ou injetor automático; (d): compartimento da coluna; (e): detector(es); (f): registro e processamento de dados; (g): processador de desperdício.



Fonte. Adaptado de (GIKA, 2016).

É possível utilizar uma variedade de colunas, contudo, a grande maioria das colunas utilizadas são de octadecil esférico poroso (C18), partículas de sílica funcionalizadas de 3-5 mm de diâmetro, enquanto outras incluem octil (C8), fenil-hexil e fases modificadas por amina. As fases móveis incluem uma ampla gama de solventes orgânicos e misturas de tampão (GIKA, 2016). A detecção de analitos eluídos pode ser obtida por um único detector (UV-Vis, fluorescência, espectrometria de massas, índice de refração, etc.) ou por vários detectores conectados em série (CAMPÍNS-FLACÓ *et al.*, 2019).

Na CLAE, os constituintes da amostra são separados à medida que migram através da coluna em diferentes velocidades e eluem do sistema em tempos diferentes. Os analitos participam de uma interação entre a fase estacionária e a fase móvel. Os analitos que são fortemente retidos na fase estacionária eluem em tempos maiores, enquanto os analitos que não interagem fortemente migram mais rapidamente e eluem em menor tempo através do sistema (COLLINS, 2009; BORGES *et al.*, 2010). O mecanismo de separação é governado pela seleção da fase estacionária. Os dois principais mecanismos de separação utilizados são através da fase normal e fase reversa (GIKA, 2016).

Na fase normal, analitos se dividem entre uma fase estacionária polar (por exemplo, sílica) e uma fase móvel de baixa polaridade (por exemplo, hexano, clorofórmio ou diclorometano), dessa forma, os analitos apolares eluem rapidamente, enquanto analitos polares interagem fortemente com a fase estacionária, eluindo posteriormente. Já na fase reversa, onde as polaridades são invertidas, sendo a fase estacionária menos polar que a fase móvel. Os analitos polares permanecem principalmente na fase móvel, mostrando pouca atração para a fase estacionária e eluem mais rápido. E os analitos apolares são retidos pela fase estacionária possuindo tempo de retenção maiores (GIKA, 2016). A cromatografia líquida de fase reversa é o modo mais amplamente aplicado, em grande parte devido à sua natureza mais robusta e à sua compatibilidade com amostras aquosas, como amostras e extratos biológicos, ambientais e de alimentos (MAJORS, 2019).

Técnicas cromatográficas têm sido amplamente empregadas para separar, identificar e quantificar o HMF em alimentos, melhorando a seletividade na análise de amostras complexas (MARTINS *et al.*, 2022). Na literatura são encontrados trabalhos que empregaram a cromatografia líquida em diferentes modos de detecção, para determinar o HMF em amostras lácteas. A cromatografia com detector UV-Vis foi utilizada em alimento para bebê (PRATA *et al.*, 2021) e em doce de leite (BARRERA *et al.*, 2021), além da quantificação de quatro furanos (HMF, furfural, FMC e MF) em fórmula infantil em pó (LUND *et al.*, 2022) e

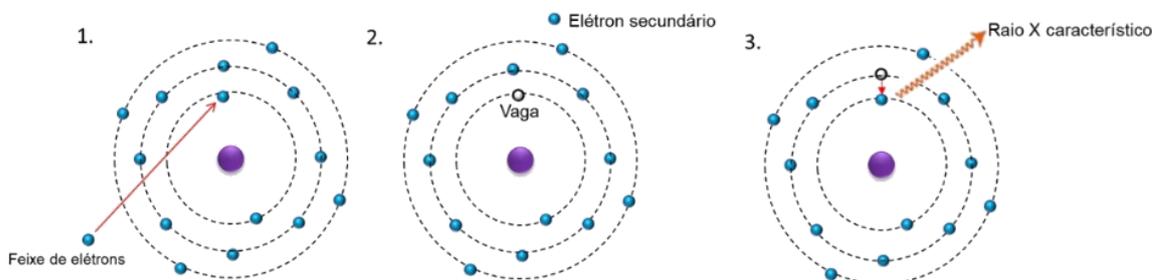
em fórmulas lácteas (CHÁVEZ-SERVÍN; CASTELLOTE; LÓPEZ-SABATER, 2005). O detector de espectrometria de massas foi explorado para determinar o HMF em conjunto com outros analitos em produtos lácteos (leite fermentado, reconstituído, pasteurizado e UHT, leite em pó e iogurte) (CUI *et al.*, 2020) e para detecção rápida do HMF em doce de leite (IMPERIALE *et al.*, 2021).

### 2.5.2 Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X

A espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS, EDX ou XEDS), também chamada de espectroscopia de análise de energia dispersiva de raios-X (EDXA) ou espectroscopia de microanálise de energia dispersiva de raios-X (EDXMA) (ISMAL *et al.*, 2019), utilizada acoplada ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), é uma técnica que permite visualizar e obter a composição da superfície de amostras de interesse. A técnica de EDS foi introduzida como uma alternativa para a realização de análise elementar no final dos anos 60, sendo empregado como uma técnica de microanálise (VIEIRA *et al.*, 2021). O MEV é um equipamento que possibilita obter a imagem ampliada e tridimensional da amostra estudada (FERRER-ERES *et al.*, 2010).

O MEV utiliza um feixe de elétrons de alta energia que interage com o material da amostra e um raio-X característico é gerado, dessa forma o EDS detecta o raio-X característico (MCCARTHY *et al.*, 2020). Na Figura 4, é mostrado que quando este feixe de elétrons entra em contato com a amostra, o elétron incidente ejeta um elétron da camada interna de um dos átomos da amostra, deixando-a vaga. Como este é um estado instável, um elétron da camada externa cai para preencher a vacância. No entanto, esse elétron tem a energia da camada externa, sendo muito maior do que a permitida para a camada interna. Portanto, o excesso de energia é emitido na forma de raios X, que têm uma energia igual à diferença de energia entre as camadas interna e externa. Como cada elemento tem uma diferença de energia única entre as camadas interna e externa, o raio-X emitido é chamado de raio-X característico (NGO, 1999).

Figura 4 - Esquema de funcionamento da técnica de EDS.



Fonte. Adaptado de (MORITA, 2018).

A análise através do MEV-EDS consegue identificar quais elementos estão presentes na superfície de um material a partir das energias de pico de raios-X características do espectro de raios-X adquirido, permitindo a realização de uma avaliação química qualitativa e semiquantitativa, dado que a análise acontece na superfície da substância, desse modo é gerado uma estimativa da concentração dos elementos presentes (MORITA, 2018; VIEIRA *et al.*, 2021). Sendo assim, é importante haver um cuidado com a topografia da amostra que se deseja analisar, quanto mais plano e polido estiver a amostra, melhor será o resultado semiquantitativo (DUARTE *et al.*, 2003; DEDAVID *et al.*, 2007).

A técnica de EDS tem a vantagem de oferecer rapidez para análises qualitativas e semiquantitativas, estudos na literatura tem mostrado a utilização do EDS para a análise de macroatômicos em solo e em plantas, após um preparo da amostra (IVANOV *et al.*, 2019), além de análises para identificar quantidade de cal virgem em amostras de solo argiloso tratado (MORETTI *et al.*, 2020), assim como a caracterização de amostras de carvão e cinzas (ZENG *et al.*, 2016), para o controle de contaminantes em alimentos de forma geral, de acordo com sua capacidade de sinal para analitos de baixas concentrações (SHARMA & BHARDWAJ, 2019). Tal técnica também foi utilizada em produtos lácteos, como para a determinação rápida de minerais em leite em pó desnatado (MCCARTHY *et al.*, 2020); fórmulas infantis de leite em pó (PAPACHRISTODOULOU *et al.*, 2018); para identificação e quantificação da composição dos elementos minerais nas cinzas de leite cru (DE PAULA *et al.*, 2021); identificação de cálcio como principal constituinte dos pontos brancos em doce de leite (CAMPOS *et al.*, 2022).

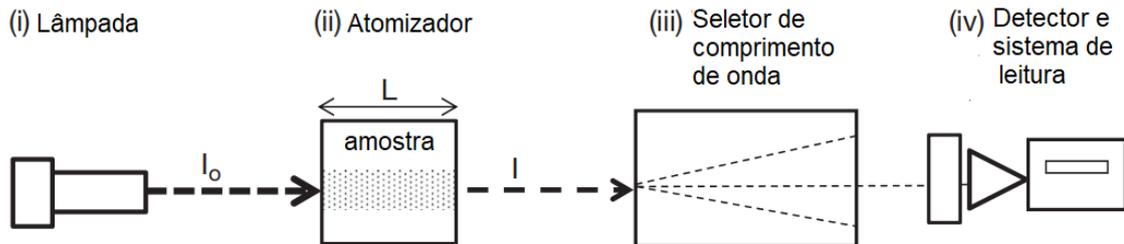
### 2.5.3 Espectrometria de absorção atômica

A Espectrometria de Absorção Atômica ou *Atomic Absorption Spectrometry* (AAS) é uma técnica na qual átomos gasosos livres absorvem radiação eletromagnética em um comprimento de onda específico para produzir um sinal mensurável (IVANOVA, 2005). O sinal de absorção é proporcional à concentração desses átomos absorventes livres no caminho óptico (FERNANDEZ *et al.*, 2018). Portanto, para medições de AAS, o analito deve ser primeiro convertido em átomos gasosos, geralmente pela aplicação de calor a uma célula chamada atomizador (HILL, 2017). O tipo de atomizador define as duas principais técnicas analíticas baseadas em AAS: chama (FAAS) e eletrotérmica (ETAAS) ou forno de grafite (GFAAS) (AMORIM, 2008). Em ambos os casos, as amostras líquidas (ou dissolvidas) são facilmente introduzidas no analisador, como um aerossol no caso do FAAS ou como volumes bem pequenos no ETAAS (FERNANDEZ *et al.*, 2018).

Um espectrômetro de absorção é um equipamento que permite análise quantitativa de elementos metálicos, ele consiste em quatro partes principais como é mostrado na Figura 5: uma lâmpada (fonte de luz), um atomizador (uma chama ou um dispositivo eletrotérmico) onde os átomos gasosos da amostra são produzidos, um seletor de comprimento de onda para isolar a luz específica absorvida e um detector e sistema de leitura para detectar e quantificar a intensidade da luz que passa pela fenda de saída do seletor de comprimento de onda (HILL & FISHER, 2017; FERNANDEZ *et al.*, 2018).

Na análise de rotina por AAS, a luz de um comprimento de onda adequado e uma determinada intensidade  $I_0$  passa através da nuvem de átomos livres do analito contido no caminho (L) de absorção dentro de um atomizador (FERNANDEZ *et al.*, 2018). Os átomos livres do analito absorvem a radiação eletromagnética deste comprimento de onda específico (FERNANDEZ *et al.*, 2018). A intensidade I (também chamada de luz transmitida) que emerge do atomizador dependerá de  $I_0$ , do comprimento do caminho óptico L, da concentração dos átomos do analito e da transição atômica particular medida (FERNANDEZ *et al.*, 2018).

Figura 5 - Representação esquemática AAS. (i) uma lâmpada (geralmente emitindo linhas espectrais), (ii) um atomizador (uma chama ou um dispositivo eletrotérmico) onde os átomos gasosos da amostra são produzidos, (iii) um seletor de comprimento de onda para isolar a luz específica absorvida e (iv) um detector e sistema de leitura.



Fonte. Adaptado de (FERNANDEZ *et al.*, 2018).

Na literatura, estudos mostram a utilização da AAS para análise de elementos nutricionais e tóxicos em amostras alimentícias, como a determinação de cálcio, cobre, ferro, magnésio e zinco em amostras de leite pasteurizado da região do Vale do Paraíba por FAAS (SOARES *et al.*, 2010); determinação de cálcio em amostras comerciais de queijos Minas Padrão através da FAAS (PEREIRA *et al.*, 2018); determinação de Ca, Mg, Mn e Zn em amostras de leite de búfala da Ilha de Marajó por FAAS (JUNIOR *et al.*, 2009); determinação de zinco em amostras de iogurte por meio da FAAS (BRANDÃO, 2010).

### 3 OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho foram separados em objetivo geral e objetivos específicos.

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visa estudar a influência da adição de diferentes teores de sacarose na produção de doce de leite sobre os atributos de composição centesimal, mineral e físico-química, além dos parâmetros de cor, rendimento, viscosidade e marcadores químicos da reação de Maillard no produto final.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Dentre os objetivos específicos do trabalho, estão:

- a) produzir quatro diferentes formulações de doce de leite variando o teor de sacarose (15%, 20%, 25% e 30% m/m) sobre a massa de leite;
- b) realizar análise de umidade, gordura e cinzas dos doces de leite comerciais e experimentais;
- c) realizar análise de teor de sólidos solúveis (°Brix), viscosidade, acidez, pH e colorimetria nos doces de leite comerciais e experimentais;
- d) realizar análise de rendimento das amostras de doces de leite experimentais;
- e) caracterizar os minerais presentes nas cinzas dos doces de leite comerciais e experimentais utilizando o microscópio eletrônico de varredura (MEV) acoplado a espectroscopia de energia dispersiva (EDS);
- f) determinar cálcio (Ca) e magnésio (Mg) por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) nos doces de leite experimentais;

- g) determinar os marcadores da RM por cromatografia líquida de alta eficiência nas amostras de doces de leite experimentais em diferentes dias de estocagem.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste tópico serão apresentados os materiais e métodos que foram empregados para a realização do estudo proposto.

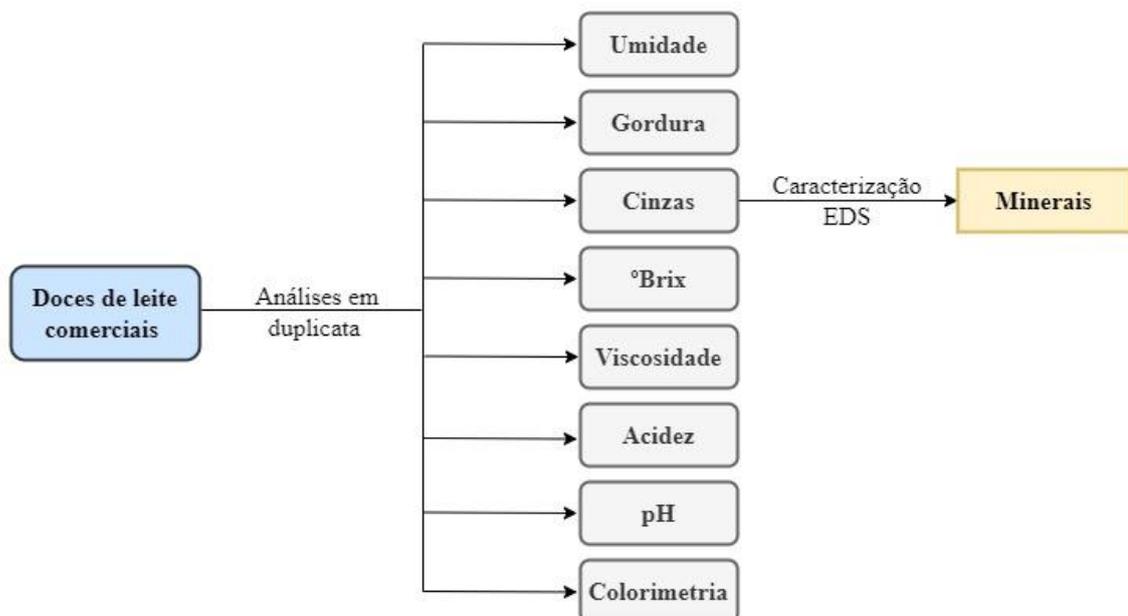
### 4.1 AQUISIÇÃO DOS DOCES DE LEITE COMERCIAIS

Foram adquiridas seis amostras de DL pastoso, de diferentes marcas brasileiras, obtidas dos comércios locais da cidade de Juiz de Fora/MG.

### 4.2 ANÁLISE DOS DOCES DE LEITE COMERCIAIS

Foram analisados os atributos composicionais, como umidade, gordura e cinzas para as diferentes marcas obtidas no mercado. Assim como, foram realizadas também análises físico-químicas destes doces de leite comerciais. Todas as análises foram realizadas em duplicata. A partir da obtenção e quantificação das cinzas, foi feita a caracterização dos minerais presentes em cada DL através do MEV/EDS. A Figura 6 apresenta o delineamento experimental realizado.

Figura 6 - Delineamento experimental para as amostras de doces de leite comerciais.



Fonte. Elaborado pela autora (2023).

Legenda. °Brix: teor de sólidos solúveis; EDS: espectroscopia de energia dispersiva.

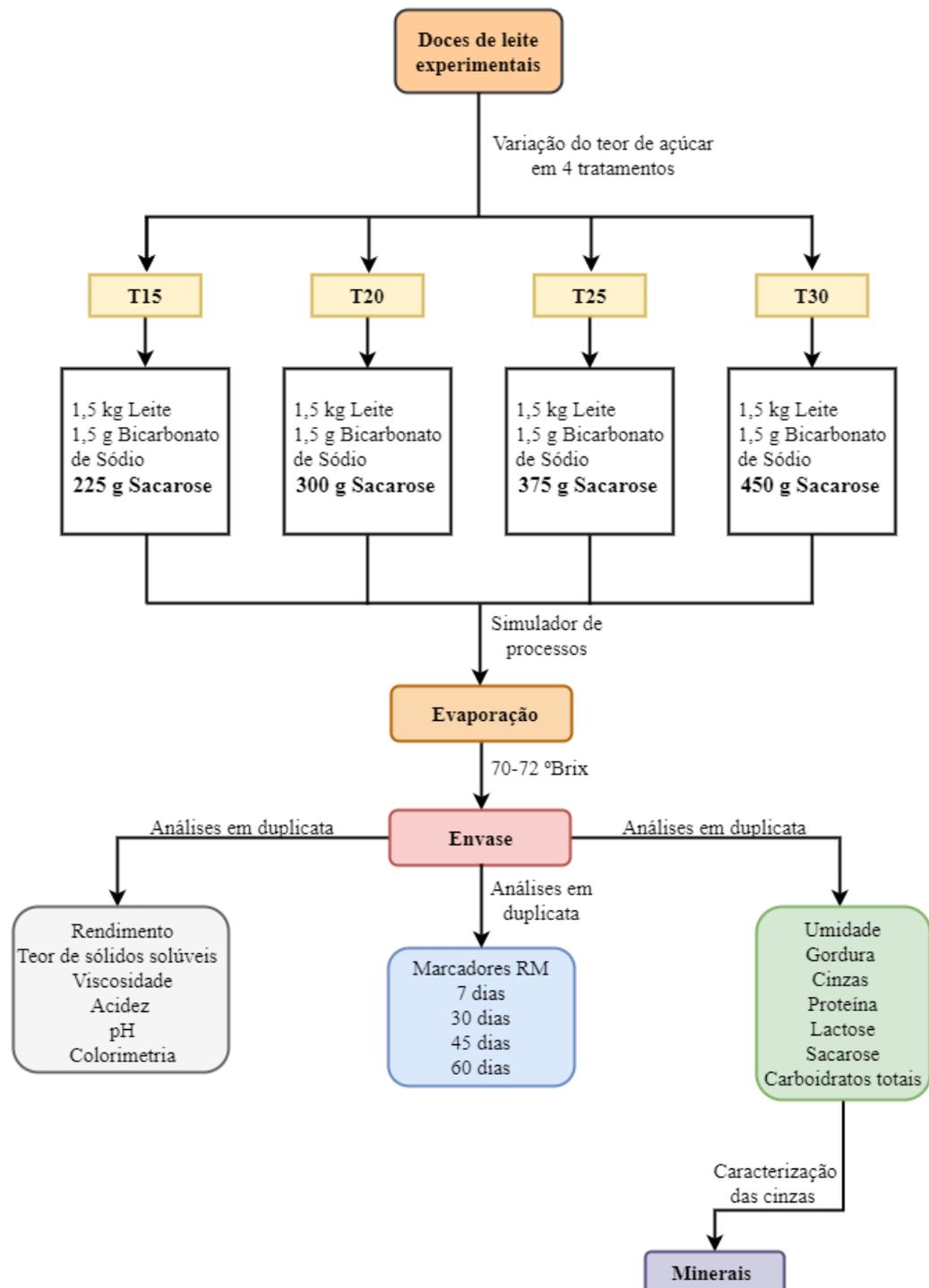
### 4.3 FABRICAÇÃO DOS DOCES DE LEITE EXPERIMENTAIS

Foram fabricados doces de leite na Universidade Federal de Juiz de Fora no Departamento de Química - Laboratório de Química e Tecnologia (QUIMTEC). Os doces foram produzidos no simulador de processos (Thermomix®). No simulador de processos, foram adicionados leite (massa total), bicarbonato de sódio e açúcar (de acordo com cada tratamento mostrado na Figura 7). Após a mistura, iniciou-se o processo de evaporação, sob agitação até o teor de sólidos solúveis atingir valores entre 68-70 °Brix, o final da evaporação foi determinado através do uso de um refratômetro. Logo após, o produto foi envasado em frascos de vidro.

Na Figura 7, está representado o fluxograma da fabricação dos doces de leite experimentais (n=3). O leite utilizado nas produções continha respectivamente,  $11,92 \pm 0,05\%$  m/m de extrato seco total (EST);  $3,21 \pm 0,02\%$  m/m de gordura;  $4,69 \pm 0,02\%$  m/m de lactose;  $3,34 \pm 0,02\%$  m/m de proteína;  $0,15 \pm 0,01\%$  m/m de acidez;  $6,70 \pm 0,01$  de pH;  $0,79 \pm 0,01\%$  m/m de cinzas. Foram realizados quatro tratamentos distintos, sendo que em todos os tratamentos apenas o teor de açúcar foi variado em 15%, 20%, 25% e 30% (m/m) sobre a massa de leite (1,5 kg), a concentração de bicarbonato de sódio foi padronizada para 0,1% (m/m) sobre a massa de leite. Os quatro tratamentos foram denominados: T15 (Leite + 15% (m/m) de sacarose + bicarbonato de sódio), T20 (Leite + 20% (m/m) de sacarose + bicarbonato de sódio), T25 (Leite + 25% (m/m) de sacarose + bicarbonato de sódio) e T30 (Leite + 30% (m/m) de sacarose + bicarbonato de sódio). Todos os tratamentos foram produzidos na temperatura de 110 °C, sendo que o tempo em minutos (min) das fabricações foi:  $148 \pm 21$  min para T15;  $143 \pm 20$  min para T20;  $140 \pm 18$  min para T25;  $120 \pm 17$  min para T30.

Foram realizadas em duplicata as análises dos atributos composicionais, físico-químicos, colorimetria e marcadores da RM com 7 dias; 30 dias; 45 dias e 60 dias de produção. Além disso, realizou-se também a caracterização do teor de minerais pela técnica de MEV-EDS através das cinzas obtidas dos doces produzidos experimentalmente. Realizou-se, também, análise de cálcio e magnésio nas amostras experimentais através da técnica de espectrometria de absorção atômica com chama.

Figura 7 - Representação esquemática para a fabricação e análises das amostras de doces de leite experimentais.



Fonte. Elaborado pela autora (2023).

Legenda. T15 (15% m/m de sacarose sobre a massa de leite); T20 (20% m/m de sacarose sobre a massa de leite); T25 (25% m/m de sacarose sobre a massa de leite); T30 (30% m/m de sacarose sobre a massa de leite); °Brix: teor de sólidos solúveis.

#### 4.4 FATOR DE CONCENTRAÇÃO

O fator de concentração (FC) foi calculado conforme a equação 1, para avaliar em quantas vezes a concentração dos constituintes do leite foi aumentada em cada tratamento fabricado (PERRONE *et al.*, 2019).

$$\text{Equação 1:} \quad FC = \frac{\text{TSLD}}{\text{TSSL}}$$

Onde, TSLD = teor de sólidos lácteos no doce de leite; TSSL = teor de sólidos lácteos no leite.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DOS ATRIBUTOS CENTESIMAIS E FÍSICO-QUÍMICOS

As análises de composição centesimal e físico-químicas dos doces de leite comerciais e produzidos foram realizadas em duplicata e seguiram metodologias já descritas.

##### 4.5.1 Umidade

Para os doces experimentais o teor de umidade foi avaliado pelo método clássico gravimétrico, através da secagem em estufa por 105 °C durante seis horas de aquecimento da amostra, até massa constante. As análises foram realizadas em duplicata. Enquanto que para os doces comerciais, a determinação da umidade ocorreu utilizando a balança de infravermelho para umidade.

##### 4.5.2 Gordura

A determinação do teor de lipídeos foi realizada pelo método de Gerber. Foi preparado uma solução de doce de leite, pesando 20 g de amostra diluído em 100 mL de água. Neste método há separação e quantificação da gordura através do tratamento da amostra com ácido sulfúrico e álcool isoamílico. A leitura é realizada na escala graduada do butirômetro após

centrifugação e imersão em banho-maria. O valor lido é multiplicado por cinco, devido à diluição da amostra e resulta na concentração de gordura encontrada no produto.

#### 4.5.3 Cinzas

As cinzas ou resíduo mineral fixo (RMF) foram determinados em forno mufla a 550 °C pelo método AOAC. Para o procedimento inicialmente aqueceu-se o cadinho em forno mufla Quimis®, modelo Q318M21 a 550 °C durante 30 minutos, em seguida após esfriar em dessecador, o cadinho foi pesado ( $m_1$ ). A balança analítica Shimadzu®, modelo AY220 foi tarada e pesou-se 2 g de amostra e a seguir o cadinho com amostra ( $m_0$ ) foi levado ao forno mufla a temperatura de  $550 \pm 10$  °C. A incineração ocorreu por 5 horas ou até obter cinzas totalmente brancas. Por fim, o cadinho foi retirado da mufla e deixado a esfriar no dessecador. Logo após, pesou-se e registrou-se a massa obtida ( $m_2$ ). O resíduo mineral fixo é calculado através da equação 2 (BRASIL, 2014):

$$\text{Equação 2:} \quad \% \text{RMF} = \frac{(m_2 - m_1) \times 100}{m_0}$$

#### 4.5.4 Proteína

A análise de proteínas foi realizada por laboratório terceirizado. A análise foi feita baseada na ISO8968-1.

#### 4.5.5 Lactose

A análise de lactose foi realizada por laboratório terceirizado. A análise foi feita baseada na IAL, 2008.

#### 4.5.6 Carboidratos totais

O teor de carboidratos foi calculado pela diferença matemática entre os outros componentes composicionais analisados para o doce de leite.

#### 4.5.7 Sacarose

A sacarose em cada doce foi determinada através do cálculo da diferença entre a concentração de carboidratos totais e lactose.

#### 4.5.8 Teor de sólidos solúveis

A análise do teor de sólidos solúveis foi realizada por refratometria através do refratômetro digital HI96801. A leitura foi realizada em temperatura de (22 °C) e o resultado foi expresso em °Brix.

#### 4.5.9 Viscosidade aparente

A viscosidade aparente foi determinada utilizando o viscosímetro rotacional marca Quimis® e modelo Q860M21.

#### 4.5.10 Acidez

A acidez foi determinada pelo método da acidez titulável (titulação de solução de doce de leite com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> com fenolftaleína como indicador) (BRASIL, 2013b). A metodologia consistiu em pesar 5 g de amostra, adicionar 50 mL de água morna (50 °C) e homogeneizar. Logo após, adicionou-se dez gotas de solução de fenolftaleína a 1% (m/v) e titulou com a solução de hidróxido de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> até aparecimento de coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos. A acidez em porcentagem de ácido láctico é dada pela equação 3:

$$\text{Equação 3:} \quad \% \text{ ácido láctico} = \frac{V \times f \times 0,9}{m}$$

Onde,

V = volume de solução de hidróxido de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> gasto na titulação, em mL;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup>;

m = massa da amostra, em gramas.

#### 4.5.11 pH

As medidas de pH foram feitas com pHmetro portátil, marca GEHAKA® e modelo PG1400.

#### 4.5.12 Colorimetria

Os parâmetros de cor da escala CIELab ( $L^*$ : luminosidade que varia de 0 (preto) a 100 (branco),  $a^*$  e  $b^*$ : coordenadas de croma ( $-a^*$  = verde,  $+a^*$  = vermelho,  $-b^*$  = azul e  $+b^*$  = amarelo),  $C^*$ : croma,  $h_{ab}$ : ângulo) foram definidos pelo medidor colorimétrico, marca KONICA MINOLTA e modelo CR-400. O índice escurecimento ou *browning index* (BI) foi determinado a partir das medidas dos parâmetros CIELab (BUERA *et al.*, 1986), segundo a equação 4:

$$\text{Equação 4:} \quad \text{BI} = 100 \times \left( \frac{X-0,31}{0,17} \right)$$

$$\text{Onde,} \quad X = \frac{(a^* + 1,75L^*)}{(5,645 + a^* - 3,012b^*)}$$

### 4.6 CARACTERIZAÇÃO DO TEOR DE MINERAIS DAS CINZAS DO DOCE DE LEITE PELA TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA ACOPLADA A ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA

Visando obter uma melhor topografia da amostra para as análises de composição mineral, foi inicialmente preparado pastilhas de cada amostra de cinzas obtidas dos doces comerciais e experimentais. As cinzas foram maceradas com o auxílio do almofariz e pistilo, logo após, aproximadamente 0,5 g de amostra foi comprimida por uma pressão de 10 toneladas por 5 minutos em um pastilhador. Em seguida da preparação das pastilhas, a mesma foi adicionada ao microscópio eletrônico de varredura (TM 3000, Hitachi) acoplado a um sistema de espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (Quanta, Bruker). Foram efetuadas cinco leituras em lugares distintos de todas as amostras, objetivando caracterizar a composição mineral das cinzas de cada doce. Com o valor do RMF obtido pela análise em forno mufla e com a concentração em peso de cada elemento obtida pelo EDS, foi possível a

quantificação da proporção de cada mineral em g/100 g nas amostras de doce de leite (DE PAULA *et al.*, 2021), utilizando a equação 5:

$$\text{Equação 5:} \quad \frac{\text{g}}{100 \text{ g}} = \% \text{ peso} \times \frac{\text{RMF}}{100}$$

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO E MAGNÉSIO NAS AMOSTRAS DE DOCE DE LEITE PRODUZIDAS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA

Para verificar a presença de cálcio e magnésio nas diferentes amostras de DL fabricadas, utilizou-se a técnica de espectrometria de absorção atômica após um preparo de amostra. Todos os dados analíticos foram gerados pelo software Sollar e tratados no software Microsoft Excel®.

##### 4.7.1 Abertura das amostras

As amostras foram abertas em método via seca, por meio da pesagem de 0,1000 g de cada amostra de DL (T15, T20, T25 e T30) em cadinhos de porcelana em balança analítica Shimadzu® modelo AY 220, em seguida os cadinhos foram colocados em forno mufla marca Quimis®, modelo Q318M21 a 550 °C por 3 horas. As cinzas obtidas da incineração foram ressuspendidas com solução de ácido nítrico 2% (v/v) em balão volumétrico de 50 mL.

##### 4.7.2 Determinação analítica

Foram realizadas curva de calibração para os elementos cálcio e magnésio. Sendo que a curva padrão de cálcio foi preparada com solução padrão de 0 a 16 mg.L<sup>-1</sup>, e a curva padrão de magnésio foi preparada com solução padrão de 0 a 1,8 mg.L<sup>-1</sup>.

Logo em seguida à abertura, para a determinação de Ca e Mg, as amostras foram analisadas por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). O equipamento utilizado foi o espectrômetro de absorção atômica de marca Thermo Scientific®, sendo que as condições empregadas foram: chama de óxido nitroso — acetileno com fluxo de 4,5 L.min<sup>-1</sup>, altura do queimador em 8,1 mm e comprimento de onda de 422,6 nm para o cálcio; chama de

ar comprimido — acetileno com fluxo de  $1,1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , altura do queimador em 7,0 mm e comprimento de onda de 285,2 nm para o magnésio.

#### 4.8 QUANTIFICAÇÃO DOS MARCADORES DA REAÇÃO DE MAILLARD NAS AMOSTRAS DE DOCES DE LEITE

A presença de HMF, F, FMC e MF nas amostras de DL produzidas variando o teor de sacarose foi avaliada em diferentes tempos de estocagem (sete, trinta, quarenta e cinco e sessenta dias após a produção). Para identificar e quantificar foi utilizado o método desenvolvido por Pinto (2023) que verificou a presença desses marcadores em amostras comerciais de doces de leite. A taxa de recuperação foi calculada para a aplicação desse método. Curvas analíticas foram construídas para determinar a concentração dos marcadores em todas as análises. Todos os dados analíticos foram gerados pelo software Waters Empower™ e tratados no software Microsoft Excel®.

##### 4.8.1 Parâmetros cromatográficos

Os analitos (HMF, F, FMC e MF), foram separados e quantificados utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa marca Waters, modelo 1525, detector UV-Vis (PDA – Photodiode Array Detector). A análise foi feita em modo de eluição gradiente, conforme Tabela 4, com uma fase móvel composta de água e acetonitrila (ACN) na proporção inicial de (95,5: 4,5) água: ACN, mantendo vazão constante de  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A separação cromatográfica empregou uma coluna Waters Spherisorb (150 mm × 4,6 mm; tamanho de partícula de 3  $\mu\text{m}$ ), a 30 °C. O volume de injeção foi de 20  $\mu\text{L}$  e HMF, F, FMC e MF foram detectados a um comprimento de onda de 284 nm (PINTO, 2023).

Tabela 4 - Modo de eluição gradiente aplicado para determinação dos marcadores da RM.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fluxo (<math>\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}</math>)</b>	<b>Água %</b>	<b>Acetonitrila %</b>
0	1,0	95,5	4,5
5	1,0	80,0	20,0
9	1,0	95,5	4,5
10	1,0	95,5	4,5

Fonte. (PINTO, 2023).

#### 4.8.2 Reagentes

Todos os reagentes, sendo eles os padrões, 5-hidroxiacetilfurfural, 2-furaldeído, 5-metil-2-furfural e 2-furilmetilcetona e acetonitrila utilizados foram de grau analítico marca Sigma-aldrich®.

#### 4.8.3 Preparo de amostra para determinar os furfurais livres

Pesou-se 1 g de DL, e preparou-se a solução em balão volumétrico de 10 mL com água ultrapura. Uma alíquota de 1 mL foi retirada e diluída com 200 µL de água ultrapura que foi misturada no vórtex por 20 segundos. Em seguida, 300 µL de ácido tricloroacético (TCA) 55% (m/v) foi adicionado e misturado 20 segundos no vórtex e posterior centrifugação por 10 minutos. Logo após, 500 µL do sobrenadante foi coletado e misturado novamente pelo vórtex com 100 µL de água ultrapura e 300 µL de TCA. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos e o sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro 0,22 µm, para posterior injeção no HPLC-UV/PDA como descrito por Pinto (2023).

#### 4.8.4 Taxa de recuperação

Para determinar a recuperação, amostras de DL foram fortificadas com as concentrações conhecidas de HMF (1,00 µg/L), F (0,41 µg/L), FMC (0,41 µg/L), e MF (0,41 µg/L) (PINTO, 2023). A recuperação foi expressa como a razão percentual conforme equação 6.

$$\text{Equação 6: Recuperação (\%)} = \frac{C(\text{amostra adicionada}) - C(\text{amostra})}{C(\text{teórica do analito adicionado})} \times 100$$

Onde, C é concentração.

#### 4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas do teste Tukey em um nível de significância 0,05 foram realizadas por meio do software R® versão 4.1.2. As análises de correlação de Pearson (r) em um nível de significância 0,05 foram realizadas através do software SigmaPlot 12.0. As análises de estatística descritiva foram realizadas pelo software Microsoft Excel®.

## 5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo são apresentados em dois grandes blocos: doces de leite comerciais e doces de leite experimentais.

### 5.1 ANÁLISE DOS DOCES DE LEITE COMERCIAIS

A seguir são apresentados os resultados obtidos neste estudo para as amostras de doces de leite do mercado a partir das análises realizadas.

#### 5.1.1 Análises composicionais e físico-químicas

Os valores obtidos para parâmetros composicionais e físico-químicos de seis marcas diferentes de doces de leite comerciais são apresentados na Tabela 5, com a estatística descritiva dos dados.

Tabela 5 - Resultados dos parâmetros analisados para as amostras de doces de leite comerciais.

	Umidade (g.100 g <sup>-1</sup> )	Gordura (g.100 g <sup>-1</sup> )	Cinzas (g.100 g <sup>-1</sup> )	°Brix	Viscosidade Aparente (mPa.s)	Acidez (% m/m ácido lático)	pH
Marca							
A	29,91 ± 0,24	7,0 ± 0,1	1,8 ± 0,1	66,4 ± 0,5	14506,5 ± 1305,5	0,45 ± 0,01	5,67 ± 0,00
B	31,04 ± 0,12	6,5 ± 0,8	1,9 ± 0,1	65,8 ± 0,1	11323,0 ± 216,0	0,32 ± 0,02	6,17 ± 0,00
C	33,94 ± 0,11	7,5 ± 0,0	2,0 ± 0,1	63,1 ± 0,1	12216,5 ± 1856,5	0,36 ± 0,02	5,88 ± 0,01
D	30,84 ± 0,33	6,3 ± 0,3	1,6 ± 0,1	66,0 ± 0,1	10246,0 ± 975,0	0,29 ± 0,00	6,21 ± 0,00
E	21,79 ± 0,56	6,8 ± 0,8	1,7 ± 0,1	75,7 ± 0,0	11952,0 ± 117,0	0,31 ± 0,01	6,17 ± 0,00
F	26,41 ± 1,10	6,3 ± 0,3	1,6 ± 0,1	69,2 ± 0,4	10185,0 ± 55,5	0,33 ± 0,01	6,07 ± 0,00
Média Geral	29,03	6,71	1,8	67,7	11738,3	0,34	6,03
Valor Máximo	34,04	7,50	2,0	75,7	15812,0	0,45	6,21
Valor Mínimo	21,23	6,00	1,6	63,0	9271,0	0,28	5,67
Amplitude	12,81	1,50	0,4	12,7	6541,0	0,17	0,54
Desvio padrão	4,15	0,62	0,1	4,2	1854,8	0,05	0,20
Erro padrão da média	1,20	0,18	0,0	1,2	535,4	0,02	0,06
Coefficiente de variação (CV)	14%	9%	8%	6%	16%	16%	3%

Fonte. Elaborado pela autora (2023).

Observa-se que os parâmetros físico-químicos (°Brix, viscosidade, acidez e pH) tiveram valores de coeficientes de variação (CV) entre 3 e 16%. Como esses parâmetros não são exigidos na legislação, podem possuir alterações de fábrica para fábrica, pois cada indústria tem seu método de processamento, formulação e características de produtos desejados.

Já os valores dos atributos gordura e cinzas mostraram que todas as marcas de doces de leite comerciais atenderam aos padrões estabelecidos pela norma vigente, a qual é de 6,0 a 9,0% (m/m) para o teor de gordura e de no máximo 2,0% (m/m) para as cinzas. Demiate *et al.* (2001) avaliaram a qualidade de amostras comerciais de doce de leite pastoso e verificaram que os valores de cinzas distantes do esperado para o produto, poderiam estar relacionados com algum tipo de fraude. O estudo reflete que quando se obtém valores baixos de cinzas significa que o produto gerado utilizou baixa concentração de leite ou matérias-primas lácteas e, para valores altos de cinzas, ocorreram excessivos acréscimos de sais ao doce. Turcatel *et al.* (2014) investigaram o padrão de identidade e qualidade do doce de leite pastoso e os resultados para o teor de resíduo mineral fixo demonstraram que todas as amostras analisadas estavam dentro do limite imposto pela legislação. Contudo, as amostras apresentaram valores diferentes entre elas, e inferiu-se que o menor valor encontrado de cinzas nos doces analisados era uma sugestão de uma concentração de leite diferente nas formulações, considerando que a quantidade de cinzas é diretamente proporcional à presença de leite no doce de leite. Os autores ressaltam, ainda, que o uso de bicarbonato de sódio e outros sais na fabricação do doce de leite podem ocasionar alterações nos valores de cinzas das amostras.

As amostras das marcas B, C e D analisadas não cumpriram com o requisito de no máximo 30,00% (m/m) de umidade no produto. O parâmetro de umidade foi o que obteve maior CV entre os atributos da legislação, essa faixa observada se deve às diferenças de metodologias de produção empregada por cada indústria, como a RTIQDL exige um máximo de umidade tem-se abertura para essa variação encontrada no mercado, com produtos com 21,79% m/m de umidade como a marca E e doces com 29,91% m/m como a marca A. Demiate *et al.* (2001) e Francisquini *et al.* (2017) em seus estudos também encontraram valores de umidade fora dos padrões vigentes, deixando evidente a falta de padronização no mercado nacional.

Através dos dados encontrados realizou-se análise de correlação de Pearson entre as variáveis estudadas no trabalho, e os resultados que obtiveram correlações fortes ( $r \geq 0,80$ ) e significativas ( $p \leq 0,05$ ) são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Correlação entre os atributos analisados para as diferentes marcas comerciais.

Variáveis	Correlação (r)	Valor da significância (p)*
Umidade x °Brix	-0,99	0,00
pH x Acidez	-0,97	0,00
Viscosidade x pH	-0,84	0,04
Viscosidade x acidez	0,98	0,02

Fonte. Elaborado pela autora (2023).

\*Valores de  $p \leq 0,05$  possuem correlação significativa e valores de  $p > 0,05$  não possuem correlação significativa.

Verifica-se pela Tabela 6 que a umidade e °Brix tem forte correlação inversa significativa (o que já era esperado devido ao conhecimento para produção de doce de leite). As variáveis pH e acidez, e pH e viscosidade também possuem forte correlação inversa significativa, ao contrário do que ocorre para viscosidade e acidez que se correlacionam de maneira direta, forte e significativamente.

Como o pH e a acidez são propriedades que dependem da composição do leite, do processamento (devido a acidez total desenvolvida durante essa etapa), da adição de ingredientes como o bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), e essas alterações normalmente não possuem padronização entre as empresas, esses fatores podem estar influenciando na correlação obtida entre esses parâmetros para as amostras de mercado analisadas. O  $\text{NaHCO}_3$  é utilizado na produção do DL como um regulador de acidez, ele diminui a acidez inicial do leite e neutraliza a acidez total desenvolvida através do aquecimento, além disso, reage com o ácido láctico neutralizando-o, formando água, gás carbônico e lactato de sódio (PERRONE *et al.*, 2019). Como não há uma concentração estabelecida de  $\text{NaHCO}_3$  que deve ser utilizada nas fabricações, cada laticínio pode adotar a quantidade que melhor satisfaça seu produto, contudo, é recomendado que boas práticas de fabricação sejam adotadas.

Já é sabido na literatura que o pH afeta a conformação das proteínas influenciando na viscosidade, como Souza (2013) relatou o pH afeta a força que a desnaturação proteica ocorre e segundo Araújo (2004) a desnaturação proporciona maior viscosidade ao alimento. Contudo, como as análises são de doces de leite comerciais, variáveis distintas como o processo de fabricação e a formulação podem também estar relacionados com a mudança de viscosidade do produto, o que fica evidenciado pelo Quadro 1, onde consta a lista de ingredientes dos doces.

Quadro 1 - Lista de ingredientes apresentada no rótulo dos doces de mercado.

Marcas	Lista de Ingredientes
A	Leite integral, açúcar, regulador de acidez bicarbonato de sódio e conservador sorbato de potássio.
B	Leite integral, açúcar, xarope de glicose de milho e conservador sorbato de potássio.
C	Leite integral, açúcar e conservador sorbato de potássio.
D	Leite integral, açúcar, xarope de glicose de milho, amido de milho modificado, citrato de sódio, regulador de acidez bicarbonato de sódio e conservador sorbato de potássio.
E	Leite, açúcar, amido de milho, enzima lactase, regulador de acidez bicarbonato de sódio e conservador sorbato de potássio.
F	Leite pasteurizado, açúcar, xarope de glicose e conservador sorbato de potássio.

Fonte. Elaborado pela autora (2023).

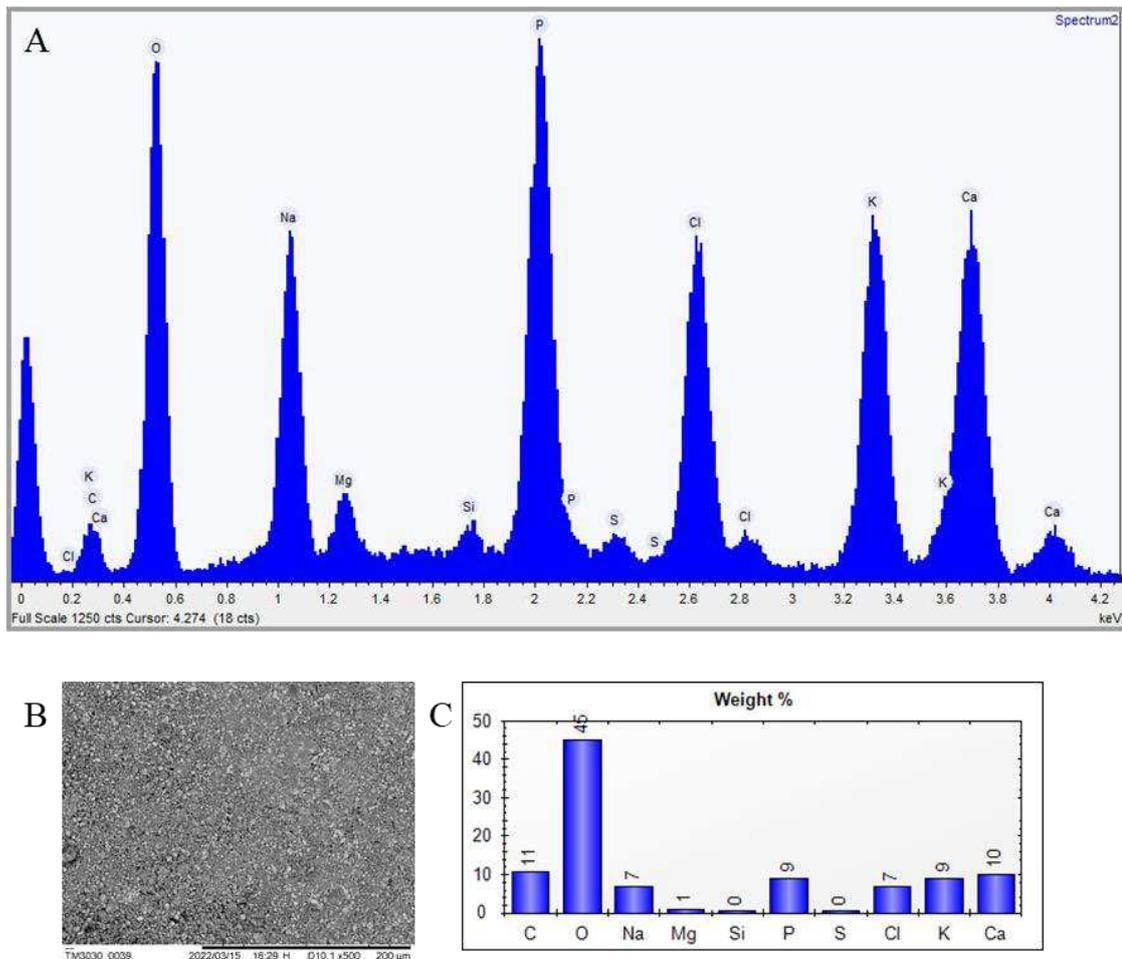
Ingredientes como a glicose, o amido e a enzima lactase encontrados em algumas das marcas analisadas são empregados na fabricação e aumentam a viscosidade do produto final. A glicose é capaz de formar um complexo de proteína – dextrose (altamente hidratado), ocasionando um aumento da viscosidade do produto, o amido empregado na fabricação do DL absorve água do meio, o que tende a aumentar a viscosidade (PERRONE *et al.*, 2019). Enquanto a utilização da enzima lactase ou beta-D-galactosidade tem extrema importância industrial devido sua ação sobre a lactose, que promove a ruptura da ligação glicosídica, liberando glicose e galactose (dois monossacarídeos com características diferentes do açúcar de origem) (PERRONE *et al.*, 2019). Uma modificação observada no processo de fabricação do DL com uso da lactase é o aumento da viscosidade do produto final, pois com a hidrólise há formação de glicose que forma um complexo de proteína – dextrose (PERRONE *et al.*, 2019). Então, são necessários estudos mais aprofundados para inferir corretamente a causa da forte correlação inversa significativa entre pH e viscosidade. Pelo pH e a acidez se correlacionarem inversamente, essa correlação foi estendida para a correlação obtida para acidez e viscosidade diretamente.

### 5.1.2 Caracterização mineral das cinzas obtidas dos doces de leite comerciais

Na Figura 8, são apresentados o perfil dos mapeamentos de superfícies por MEV-EDS das amostras de cinzas dos doces de leite comerciais. A análise pela técnica de EDS mostrou a

presença dos principais minerais constituintes do leite nas cinzas das amostras dos doces de mercado. Observa-se a presença de Na, Mg, P, Cl, K e Ca na amostra analisada.

Figura 8 - Análise das cinzas em MEV-EDS do doce de leite comercial A. (A) Espectro dos elementos presentes na amostra; (B) Imagem em magnificação de 500x das cinzas; (C) Gráfico da porcentagem em peso de cada elemento presente na amostra analisada.



Fonte. Elaborado pela autora (2023).

Com os valores em porcentagem (%) peso de cada elemento obtido através do EDS, calculou-se com auxílio da equação 5 (DE PAULA *et al.*, 2021) a concentração em  $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  de cada elemento nas amostras de doces de leite encontradas no mercado local. Os resultados obtidos para a concentração de cada mineral estão apresentados na Tabela 7 para cada uma das seis amostras estudadas.

Tabela 7 - Composição mineral das amostras de doces comerciais.

	Na (g.100 g <sup>-1</sup> )	Mg (g.100 g <sup>-1</sup> )	P (g.100 g <sup>-1</sup> )	Cl (g.100 g <sup>-1</sup> )	K (g.100 g <sup>-1</sup> )	Ca (g.100 g <sup>-1</sup> )
<b>Marcas</b>						
<b>A</b>	0,09 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,17 ± 0,06	0,22 ± 0,09	0,26 ± 0,12	0,20 ± 0,08
<b>B</b>	0,13 ± 0,05	0,04 ± 0,01	0,26 ± 0,04	0,03 ± 0,02	0,10 ± 0,04	0,24 ± 0,08
<b>C</b>	0,13 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,22 ± 0,03	0,14 ± 0,09	0,15 ± 0,09	0,18 ± 0,02
<b>D</b>	0,12 ± 0,04	0,02 ± 0,01	0,21 ± 0,07	0,09 ± 0,06	0,16 ± 0,09	0,25 ± 0,11
<b>E</b>	0,11 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,12 ± 0,06	0,19 ± 0,05	0,20 ± 0,03
<b>F</b>	0,12 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,17 ± 0,04	0,07 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,19 ± 0,02
Média Geral	0,12	0,02	0,20	0,10	0,16	0,21
Valor Máximo	0,18	0,05	0,30	0,31	0,38	0,36
Valor Mínimo	0,06	0,01	0,11	0,01	0,06	0,12
Amplitude	0,12	0,04	0,19	0,30	0,32	0,24
Desvio padrão	0,03	0,01	0,05	0,08	0,08	0,06
Erro padrão da média	0,01	0,00	0,01	0,02	0,02	0,02
Coefficiente de variação	25%	57%	25%	77%	50%	30%

Fonte. Elaborado pela autora (2023).

Segundo a Tabela 7, ocorre uma variação na quantidade de minerais entre as amostras comerciais analisadas, de 0,06 a 0,18 g.100 g<sup>-1</sup>; 0,01 a 0,05 g.100 g<sup>-1</sup>; 0,11 a 0,30 g.100 g<sup>-1</sup>; 0,01 a 0,31 g.100 g<sup>-1</sup>; 0,06 a 0,38 g.100 g<sup>-1</sup>; 0,12 a 0,36 g.100 g<sup>-1</sup> para sódio, magnésio, fósforo, cloro, potássio e cálcio respectivamente. O elemento Cl apresentou maior coeficiente de variação entre todos os elementos analisados nos doces de leite comerciais, podendo inferir que houve vaporização do cloro durante o processo de incineração em forno mufla a 550 °C.

Gaze *et al.* (2015) determinou por espectrometria de emissão atômica os minerais sódio, cálcio, potássio e fósforo em doces de leite comerciais, através das suas análises também observaram diferenças entre as amostras, variando o sódio de 0,12 a 0,16 g.100 g<sup>-1</sup>; cálcio de 0,28 a 0,40 g.100 g<sup>-1</sup>; potássio de 0,19 a 0,36 g.100 g<sup>-1</sup>; fósforo de 0,14 a 0,24 g.100 g<sup>-1</sup>. Ao relacionar os valores obtidos na literatura com os encontrados neste trabalho, têm-se que o sódio, fósforo, cálcio e potássio estão dentro da faixa de concentração reportada. Vale ressaltar, que a espectroscopia de energia dispersiva é uma técnica semiquantitativa, sendo assim, apresentou bons resultados quando comparada a espectrometria de emissão atômica (técnica quantitativa).

Além disso, diferenças na composição mineral podem ser atribuídas há fatores relacionados aos animais (genética, alimentação, sazonalidade), composição da matéria prima utilizada na fabricação e ingredientes utilizados na formulação do doce de leite (SMIT, 2000). De acordo com o Quadro 1, todos os doces analisados neste trabalho continham sorbato de potássio e alguns tinham na lista de ingredientes o bicarbonato de sódio, e um possuía citrato de sódio esses sais vão ser acréscimos no teor de cinzas obtido de cada DL e consequentemente podem influenciar na presença de sódio e potássio encontrado nas amostras

de doces de leite comerciais analisadas. Gaze *et al.* (2015) observaram que o teor de sódio encontrado nas amostras comerciais analisadas não era apenas proveniente do leite, como também do bicarbonato de sódio utilizado como coadjuvante de fabricação.

### 5.1.3 Análise de cor dos doces de leite comerciais

Foi determinado através da análise colorimétrica os valores dos parâmetros de cor ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $h_{ab}$ ) do espaço CIELab, a Tabela 8 apresenta os resultados obtidos nesta avaliação para as amostras comerciais de DL.

Tabela 8 - Resultados da análise de colorimetria dos doces de leite comerciais.

	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*$	$h_{ab}$	BI
<b>Marcas</b>						
<b>A</b>	45,15	8,97	22,43	24,15	68,21	81,30
<b>B</b>	47,46	9,27	23,81	25,56	68,72	81,97
<b>C</b>	52,66	7,42	24,79	25,87	73,34	72,29
<b>D</b>	49,45	6,12	20,98	21,85	73,74	63,08
<b>E</b>	45,91	8,02	21,67	23,11	69,69	75,08
<b>F</b>	49,53	5,96	21,36	22,17	74,41	63,97
Média Geral	48,36	7,63	22,50	23,78	71,35	72,95
Valor Máximo	52,66	9,27	24,79	25,87	74,41	81,97
Valor Mínimo	45,15	5,96	20,98	21,85	68,21	63,08
Amplitude	7,51	3,31	3,81	4,03	6,20	18,89
Desvio padrão	2,76	1,40	1,50	1,70	2,78	8,17
Erro padrão da média	1,13	0,57	0,61	0,69	1,13	3,34
Coefficiente de variação	6%	18%	7%	7%	4%	11%

Fonte. Elaborado pela autora (2023).

Legenda.  $L^*$ : luminosidade;  $-a^*$ : verde;  $+a^*$ : vermelho,  $-b^*$ : azul;  $+b^*$ : amarelo;  $C^*$ : croma;  $h_{ab}$ : ângulo; BI: índice de escurecimento.

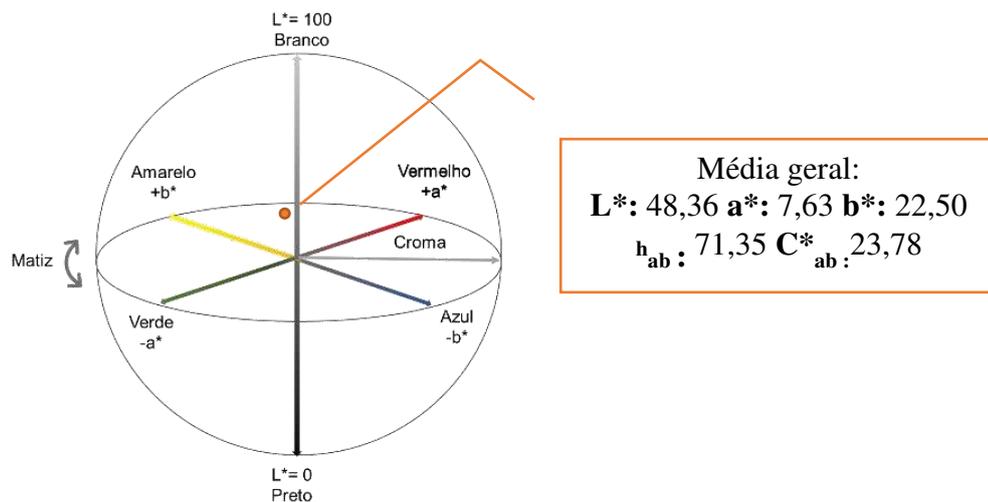
Os dados obtidos demonstram que os parâmetros de cor tiveram uma baixa variação entre todas as amostras de mercado analisadas, 6%, 18%, 7%, 7%, 4% e 11% para  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $h_{ab}$ , respectivamente. Isto se deve provavelmente por serem doces comercializados e fabricados em uma mesma região, que seguem as características desejáveis pelos consumidores locais.

Ao comparar os dados obtidos com os já relatados na literatura temos que valores médios encontrados para  $L^*$  entre 45 e 52, estão abaixo dos obtidos por Ferreira *et al.* (2012)  $L^*$  entre 53,41 e 59,60, próximos dos resultados de Ferreira *et al.* (1989)  $L^*$  = 47 e de Gaze *et al.* (2015)  $L^*$  entre 48,59 e 62,18, acima dos verificados por Pauletti *et al.* (1992)  $L^*$  entre 31 e 42 e Ranalli *et al.* (2011) com  $L^*$  entre 36,4 e 44,4. Com relação ao parâmetro  $b^*$ , os

valores observados neste estudo foram de 20 a 24, que se encontram próximos dos dados 17,28 a 28,08; 17,89 a 27,70; 12,32 a 21,37; 16,9 a 25,4; de Ferreira *et al.* (2012), Gaze *et al.* (2015), Ferreira *et al.* (1989) e Ranalli *et al.* (2011), respectivamente. E abaixo dos valores encontrados (25,44 a 36,23) por Pauletti *et al.* (1992). Contudo, a cor do DL se diferencia pelas regiões do Brasil e demanda do mercado por cada produto, dessa forma, alterações da cor nos diferentes trabalhos podem ser perceptíveis.

Verifica-se pela Tabela 8 que todos os valores de  $a^*$  e  $b^*$  foram positivos, representando a cor vermelha na coordenada de croma  $a^*$  e a cor amarela na coordenada croma  $b^*$  no espaço tridimensional, e junto com o valor de 48,36 da média geral de luminosidade das amostras, é possível visualizar a cor dos objetos utilizando o espaço de cores CIELab (espaço de cores tridimensional construído a partir de três eixos perpendiculares entre si) como mostrado na Figura 9 (BEETSMA, 2020).

Figura 9 - Espaço de cores para a média geral das amostras de mercado analisadas.



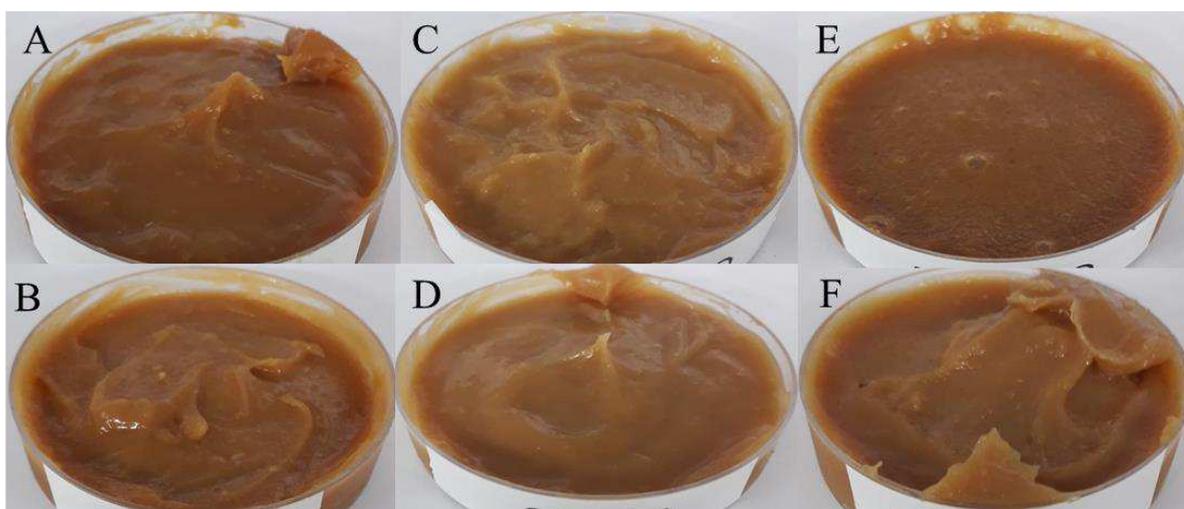
Fonte. Adaptado de (KORIFI *et al.*, 2013).

A partir desses parâmetros medidos com o colorímetro pode-se obter através da equação 3, o índice de escurecimento (BUERA *et al.*, 1986) das amostras. Esse índice relaciona uma mudança para a cor marrom (MOHAPATRA *et al.*, 2010), ou seja, quanto maior o valor de BI mais elevado o grau de escurecimento da amostra.

Observa-se pela Tabela 8, que o BI teve variação de 11% entre as amostras analisadas, tendo valor entre 63,08 a 81,97, com média geral de 72,95. As amostras com maior índice de

escurecimento são as marcas B e A, seguidas das amostras E e C e com menor BI têm-se os produtos D e F. As diferenças entre as amostras com relação ao parâmetro de cor provavelmente se devem às diferenças na composição dos açúcares, bem como às mudanças de tempo, temperatura e pressão, de acordo com o protocolo de cada indústria (OLIVEIRA *et al.*, 2009). É apresentado na Figura 10, as fotografias dos doces de leite comerciais analisados.

Figura 10 - Doces de leite comerciais das marcas A, B, C, D, E e F.



Fonte. Elaborado pela autora (2023).

## 5.2 ANÁLISE DOS DOCES DE LEITE EXPERIMENTAIS

Nesta seção são apresentados os resultados obtidos das análises das amostras de doces de leite experimentais, variando o teor de sacarose em cada tratamento.

### 5.2.1 Análises composicionais e físico-químicas

Os resultados das análises de composição centesimal das amostras de DL fabricadas experimentalmente com variação no teor de sacarose adicionado (T15, T20, T25 e T30), assim como o teste de comparação de médias segundo Tukey são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados dos parâmetros centesimais dos doces de leite experimentais (n=3).\*

Amostras**	Umidade (g.100 g <sup>-1</sup> )	Gordura (g.100 g <sup>-1</sup> )	Cinzas (g.100 g <sup>-1</sup> )	Proteína (g.100 g <sup>-1</sup> )	Lactose (g.100 g <sup>-1</sup> )	Sacarose (g.100 g <sup>-1</sup> )	Carboidratos Totais (g.100 g <sup>-1</sup> )
T15	27,64 <sup>a</sup> ± 0,54	8,5 <sup>a</sup> ± 0,1	2,2 <sup>a</sup> ± 0,1	8,4 <sup>a</sup> ± 0,1	12,2 <sup>a</sup> ± 0,1	41,1 <sup>a</sup> ± 0,5	53,3 <sup>a</sup> ± 0,5
T20	27,34 <sup>a</sup> ± 0,24	7,2 <sup>b</sup> ± 0,3	1,8 <sup>b</sup> ± 0,1	7,3 <sup>b</sup> ± 0,1	10,8 <sup>b</sup> ± 0,1	45,6 <sup>b</sup> ± 0,6	56,4 <sup>b</sup> ± 0,6
T25	27,95 <sup>a</sup> ± 0,37	6,2 <sup>c</sup> ± 0,3	1,5 <sup>c</sup> ± 0,2	6,3 <sup>c</sup> ± 0,1	8,4 <sup>c</sup> ± 0,1	49,7 <sup>c</sup> ± 0,7	58,1 <sup>c</sup> ± 0,2
T30	27,93 <sup>a</sup> ± 1,04	5,5 <sup>d</sup> ± 0,1	1,3 <sup>d</sup> ± 0,1	5,6 <sup>d</sup> ± 0,1	8,1 <sup>d</sup> ± 0,1	51,5 <sup>d</sup> ± 1,0	59,6 <sup>d</sup> ± 0,8

Fonte. Elaborado pela autora (2023).

Legenda. <sup>a-d</sup> Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. \*Valores de médias ± desvio padrão. \*\*Amostras: T15 (15% m/m de sacarose sobre a massa de leite), T20 (20% m/m de sacarose sobre a massa de leite), T25 (25% m/m de sacarose sobre a massa de leite) e T30 (30% m/m de sacarose sobre a massa de leite).

Todas as diferentes formulações de DL possuem valores de umidade dentro do padrão estabelecido pelo RTIQDL, que permite para esse parâmetro um máximo de 30,00 g.100 g<sup>-1</sup>. O mesmo ocorre para o teor proteico encontrado nos quatro tratamentos experimentais, sendo exigido um mínimo de 5,0 g.100 g<sup>-1</sup>. Contudo, é observado que para os atributos gordura e cinzas têm-se produtos fora das normas vigentes, que define o valor de matéria gorda entre 6,0 e 9,0 g.100 g<sup>-1</sup> e o teor máximo de cinzas em 2,0 g.100 g<sup>-1</sup>. Milagres *et al.* (2010) encontraram resultados superiores (9,5 g.100 g<sup>-1</sup>) para gordura ao fabricar DL com edulcorantes. A amostra T30, que é a formulação com maior teor de sacarose adicionada, possui um valor de gordura de 5,5 g.100 g<sup>-1</sup>, que é inferior ao permitido pela legislação. Enquanto a amostra T15, DL produzido com a menor concentração de sacarose tem valor de cinzas superior ao exigido pelo RTIQDL. Silva *et al.* (2020) ao produzir DL também obteve concentração percentual de cinzas superior ao permitido pela legislação vigente.

Para a fabricação de DL admite-se a utilização de bicarbonato de sódio e outros sais, como o sorbato de potássio, o que pode elevar o valor obtido de cinzas do produto em questão. Entretanto, nesse trabalho os quatro tratamentos de DL foram produzidos com a mesma quantidade de bicarbonato de sódio, na literatura autores relatam que baixos teores de cinzas podem demonstrar que foi utilizado pouco leite ou outras matérias lácteas na fabricação do doce. Sendo assim, a análise do teor de cinzas em DL é um importante indicador da presença de leite no produto analisado (GONÇALVES *et al.*, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2012; PASSOS *et al.*, 2013).

Através da análise estatística é possível verificar que a umidade não teve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as amostras produzidas experimentalmente, confirmando a execução da metodologia proposta no trabalho. Garcia *et al.* (2008) ao avaliar o efeito de substitutos de açúcar como a polidextrose, frutose e sorbitol no DL substituindo 50% do açúcar por esse mix, não encontrou diferença significativa entre a produção tradicional e o DL com substituição. Os demais componentes centesimais apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as produções T15, T20, T25 e T30, sendo possível observar que a gordura, cinzas, proteína e lactose diminuíram com o acréscimo de açúcar na produção de DL. Esse resultado comprova a hipótese inicial deste estudo, que com a redução do teor de açúcar na formulação de DL haveria o aumento percentual de componentes do leite.

Não há na regulamentação parâmetro para o teor de carboidratos no DL, entretanto, os valores médios obtidos entre os tratamentos analisados foram diferentes ( $p < 0,05$ ), menor valor encontrado para a sacarose final e os carboidratos totais foi respectivamente de 41,1 g.100 g<sup>-1</sup> e 53,3 g.100 g<sup>-1</sup> do T15, seguido de 45,6 g.100 g<sup>-1</sup> e 56,4 g.100 g<sup>-1</sup> do T20, de 49,7 g.100 g<sup>-1</sup> e 56,4 g.100 g<sup>-1</sup> do T25 e 51,5 g.100 g<sup>-1</sup> e 56,4 g.100 g<sup>-1</sup> do T30. Já os valores de lactose foram maiores em T15, seguido de T20, T25 e T30, corroborando com a ideia da redução de sacarose implicar no aumento dos constituintes lácteos no DL e na redução de carboidratos totais. Foram relatados na literatura valores de 55,1 e 56,6 g.100 g<sup>-1</sup> no estudo de Moreira *et al.* (2009) sobre DL com redução de lactose, enquanto Silva *et al.* (2009) obteve valores de 57,80 e 60,72 g.100 g<sup>-1</sup> em sua avaliação de DL *light* com e sem hidrólise, Silva *et al.* (2020) produzindo DL obteve valor de carboidratos de 46,7 a 52,2 g.100 g<sup>-1</sup>.

A Tabela 10 apresenta os resultados dos parâmetros de processamento das quatro formulações preparadas experimentalmente, seguidas do teste de comparação de médias de Tukey.

Tabela 10 - Resultados dos parâmetros de processo das amostras experimentais de doces de leite (n=3).\*

Amostras**	Tempo evaporação (min)	Rendimento (kg Leite/ kg Doce)	Teor de sólidos solúveis (°Brix)	Viscosidade aparente (mPa.s) 7±2 dias	Acidez (% m/m ácido láctico)	pH
T15	148 <sup>a</sup> ± 21	2,75 <sup>a</sup> ± 0,28	70,9 <sup>a</sup> ± 0,4	8398,8 <sup>a</sup> ± 357,8	0,18 <sup>a</sup> ± 0,05	6,61 <sup>a</sup> ± 0,10
T20	143 <sup>a</sup> ± 20	2,32 <sup>b</sup> ± 0,30	70,5 <sup>a</sup> ± 0,5	8772,1 <sup>a</sup> ± 253,0	0,18 <sup>a</sup> ± 0,04	6,58 <sup>a</sup> ± 0,14
T25	140 <sup>a</sup> ± 18	1,99 <sup>c</sup> ± 0,35	71,0 <sup>a</sup> ± 0,4	8897,3 <sup>a</sup> ± 634,6	0,17 <sup>a</sup> ± 0,01	6,53 <sup>a</sup> ± 0,06
T30	120 <sup>a</sup> ± 17	1,77 <sup>d</sup> ± 0,15	70,1 <sup>a</sup> ± 0,9	9282,2 <sup>a</sup> ± 860,6	0,19 <sup>a</sup> ± 0,04	6,56 <sup>a</sup> ± 0,05

Fonte. Elaborado pela autora (2023).

Legenda. <sup>a-d</sup> Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. \*Valores de médias ± desvio padrão. \*\*Amostras: T15 (15% m/m de sacarose sobre a massa de leite), T20 (20% m/m de sacarose sobre a massa de leite), T25 (25% m/m de sacarose sobre a massa de leite) e T30 (30% m/m de sacarose sobre a massa de leite).

Observa-se através da Tabela 10 que o tempo de evaporação, teor de sólidos solúveis, viscosidade aparente, acidez e pH não possuem diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os quatro tratamentos, evidenciando que houve uma padronização da produção. A determinação do ponto no DL pode ser realizada através do teor de sólidos solúveis no final da fabricação do produto, sugerindo o grau de concentração atingido no processo. Esse parâmetro não possui valor estabelecido pelo RTIQDL. Perrone *et al.* (2011a) sugerem que valores entre 66 °Brix e 68 °Brix representam um produto com aproximadamente 70% (m/m) de sólidos totais, que por sua vez, representa um doce com aproximadamente 30% (m/m) de umidade, sendo o máximo permitido por Brasil (1997). A viscosidade aparente analisada foi o parâmetro que apresentou maior desvio padrão, o que pode ter implicado em resultado de viscosidade estatisticamente iguais entre os quatro tratamentos, contudo, para esse atributo não há valor exigido pela legislação. A acidez e o pH são outros parâmetros que não constam no regulamento, entretanto, sofrem modificações durante a fabricação devido ao longo tempo de aquecimento, como diminuição do pH e aumento da acidez. Logo, para neutralizar essas mudanças foi empregado em todos os tratamentos, o regulador de acidez bicarbonato de sódio. Quando adicionado no início da produção de DL, ele reage com ácido láctico, neutralizando-o, há então formação de água, gás carbônico e lactato de sódio, participa ainda diminuindo a acidez inicial do leite e a acidez total desenvolvida (ATD) pelo aquecimento (PERRONE *et al.*, 2019). Com o uso da mesma quantidade de bicarbonato de sódio em todas

as amostras, pode-se observar que os parâmetros pH e acidez mantiveram padronizados em todas as fabricações.

Através dos valores obtidos para os dados analisados dos quatro tratamentos produzidos, foi realizado o cálculo de correlação de Pearson entre os atributos estudados e o teor de açúcar adicionado. A Tabela 11 apresenta os resultados de correlação encontrados para as variáveis.

Tabela 11 - Correlação entre os atributos analisados.

Variáveis	Correlação (r)	Valor da significância (p)*
Cinzas x Adição de açúcar	-1,00	0,00
Gordura x Adição de açúcar	-0,99	0,01
Proteína x Adição de açúcar	-0,99	0,00
Lactose x Adição de Açúcar	-0,96	0,04
Sacarose x Adição de açúcar	0,99	0,01
Carboidratos x Adição de açúcar	0,99	0,01
Rendimento x Adição de açúcar	0,99	0,01

Fonte. Elaborado pela autora (2023).

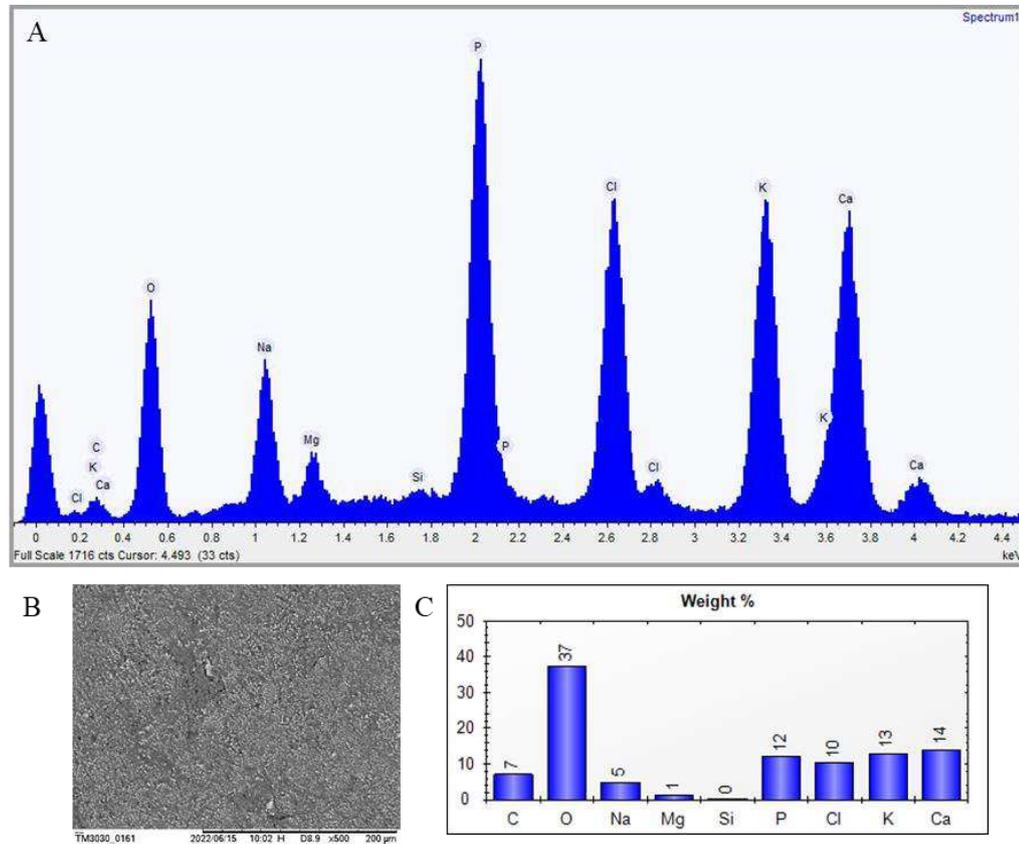
\*Valores de  $p \leq 0,05$  possuem correlação significativa e valores de  $p > 0,05$  não possuem correlação significativa.

Ao avaliar os resultados descritos na Tabela 11, verifica-se que os atributos cinzas, gordura, proteína e lactose apresentaram forte correlação ( $r = -1,00$ ;  $r = -0,99$ ;  $r = -0,99$ ;  $r = -0,96$  respectivamente), significativa ( $p \leq 0,05$ ) e inversamente proporcional com o teor de açúcar adicionado ao DL. O que demonstra a relação esperada entre o aumento da quantidade de sacarose utilizada na formulação do doce com a redução dos sólidos oriundos do leite. Em paralelo, a sacarose final no DL, os carboidratos totais e o rendimento apresentaram forte correlação ( $r = 0,99$ ;  $r = 0,99$ ;  $r = 0,99$  respectivamente), significativa ( $p \leq 0,05$ ) e diretamente proporcional com o teor de açúcar adicionado ao DL. Ou seja, com o acréscimo de sacarose nos tratamentos ocorre o aumento da sacarose no produto final, dos carboidratos totais e rendimento, devido à maior massa de sacarose adicionada na produção do doce nas diferentes formulações.

### **5.2.2 Caracterização dos minerais presentes nas cinzas dos doces de leite experimentais através do microscópio eletrônico de varredura acoplado a espectroscopia de energia dispersiva**

Foi realizada a caracterização das cinzas da matéria-prima utilizada na fabricação dos quatro tratamentos deste estudo pela técnica de MEV-EDS. A Figura 11, mostra o espectro obtido em A, a imagem da amostra na magnificação de 500x em B e o gráfico da porcentagem em peso de cada elemento presente nas cinzas do leite em C. Verifica-se através da Figura 11, que os elementos encontrados foram sódio, magnésio, fósforo, cloro, potássio e cálcio. Utilizou-se a equação 5 para calcular a concentração em g/100 g de cada elemento nas cinzas do leite, os resultados gerados para sódio, magnésio, fósforo, cloro, potássio e cálcio foram respectivamente  $0,039 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ;  $0,009 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ;  $0,092 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ;  $0,087 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ;  $0,110 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  e  $0,106 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ .

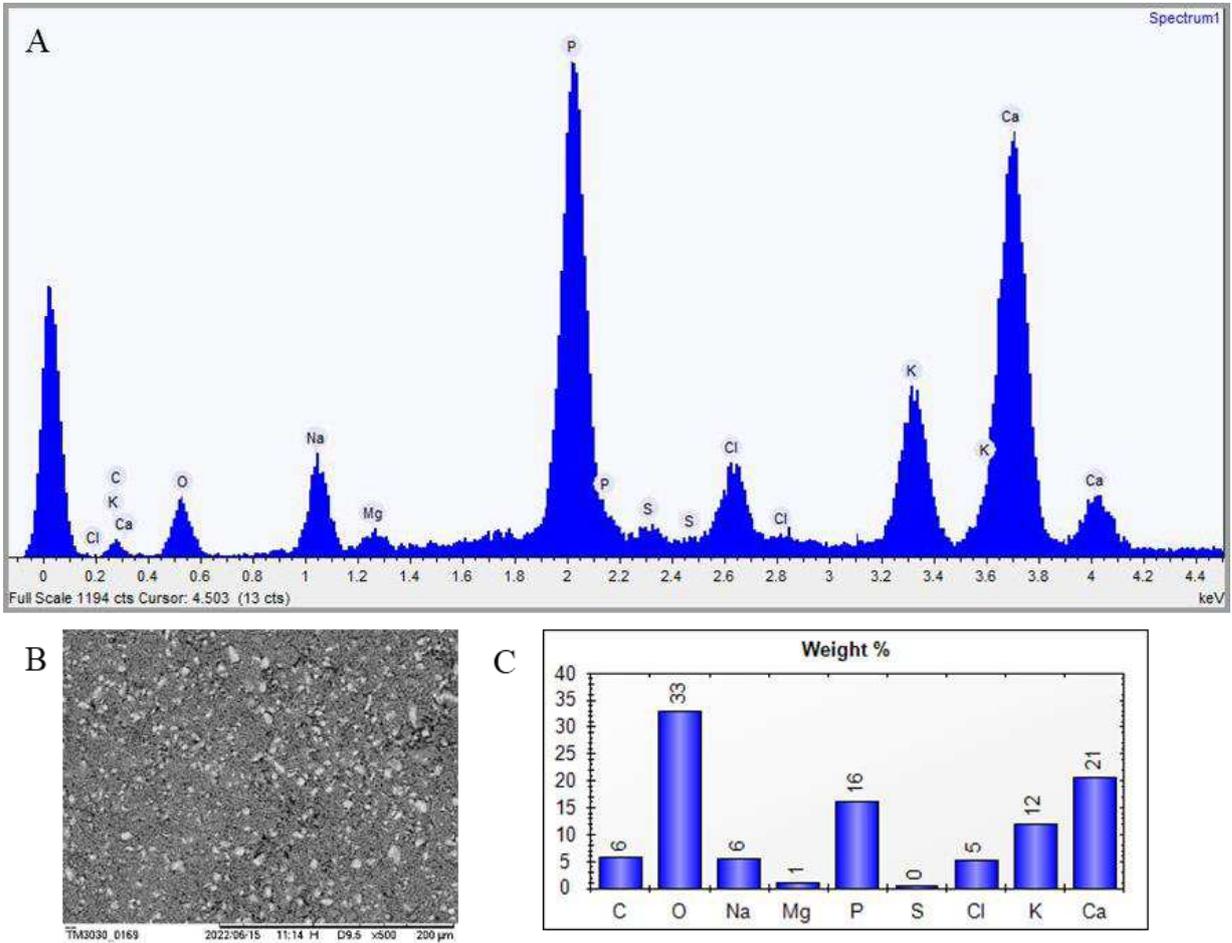
Figura 11 - Análise das cinzas em MEV-EDS do leite usado nas produções. (A) Espectro dos elementos presentes na amostra; (B) Imagem em magnificação de 500x das cinzas; (C) Gráfico da porcentagem em peso de cada elemento presente na amostra analisada.



Fonte. Elaborado pela autora (2023).

Na Figura 12 é apresentado o perfil encontrado na análise realizada pela técnica de MEV-EDS para a caracterização mineral das cinzas obtidas das amostras fabricadas experimentalmente. Os minerais identificados nos quatro tratamentos variando o teor de sacarose (T15, T20, T25 e T30) na fabricação de DL foram Na, Mg, P, Cl, K e Ca. A partir da concentração em % peso de cada elemento obtido na análise, quantificou-se os minerais nas cinzas utilizando a equação 5. A Tabela 12 apresenta os resultados calculados para cada mineral presente nas cinzas do DL, seguido da comparação de médias de Tukey entre as diferentes formulações de doce.

Figura 12 - Análise das cinzas em MEV-EDS do doce produzido com 15% (m/m) de sacarose. (A) Espectro dos elementos presentes na amostra; (B) Imagem em magnificação de 500x das cinzas; (C) Gráfico da porcentagem em peso de cada elemento presente na amostra analisada.



Fonte. Elaborado pela autora (2023).

Tabela 12 - Resultados da composição mineral das amostras de doces fabricadas (n=3).\*

Minerais	Amostras			
	T15	T20	T25	T30
Na (g.100 g <sup>-1</sup> )	0,159 <sup>a</sup> ± 0,031	0,138 <sup>a</sup> ± 0,024	0,115 <sup>b</sup> ± 0,021	0,109 <sup>b</sup> ± 0,010
Mg (g.100 g <sup>-1</sup> )	0,025 <sup>a</sup> ± 0,002	0,020 <sup>a</sup> ± 0,005	0,019 <sup>a</sup> ± 0,010	0,015 <sup>a</sup> ± 0,002
P (g.100 g <sup>-1</sup> )	0,238 <sup>a</sup> ± 0,066	0,200 <sup>a,b</sup> ± 0,059	0,161 <sup>b,c</sup> ± 0,018	0,142 <sup>c</sup> ± 0,033
Cl (g.100 g <sup>-1</sup> )	0,199 <sup>a</sup> ± 0,066	0,147 <sup>b</sup> ± 0,050	0,119 <sup>b</sup> ± 0,033	0,109 <sup>b</sup> ± 0,033
K (g.100 g <sup>-1</sup> )	0,273 <sup>a</sup> ± 0,052	0,192 <sup>b</sup> ± 0,034	0,167 <sup>b,c</sup> ± 0,033	0,140 <sup>c</sup> ± 0,031
Ca (g.100 g <sup>-1</sup> )	0,284 <sup>a</sup> ± 0,099	0,241 <sup>a,b</sup> ± 0,096	0,186 <sup>b,c</sup> ± 0,034	0,164 <sup>b</sup> ± 0,040

Fonte. Elaborado pela autora (2023).

Legenda. <sup>a-d</sup> Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. \*Valores de médias ± desvio padrão. \*\*Amostras: T15 (15% m/m de sacarose sobre a massa de leite), T20 (20% m/m de sacarose sobre a massa de leite), T25 (25% m/m de sacarose sobre a massa de leite) e T30 (30% m/m de sacarose sobre a massa de leite).

Todos os minerais encontrados, com exceção do Mg, mostraram diferença significativa observada entre as amostras. Houve variação de 0,099 a 0,190 g.100 g<sup>-1</sup>; 0,013 a 0,027 g.100 g<sup>-1</sup>; 0,109 a 0,304 g.100 g<sup>-1</sup>; 0,076 a 0,265 g.100 g<sup>-1</sup>; 0,109 a 0,325 g.100 g<sup>-1</sup>; 0,124 a 0,383 g.100 g<sup>-1</sup> para sódio, magnésio, fósforo, cloro, potássio e cálcio, respectivamente, considerando o desvio padrão de cada elemento. Como houve adição de bicarbonato de sódio no processo de fabricação, o teor desse mineral provavelmente têm origem na matéria-prima e acréscimo na forma de bicarbonato de sódio (GAZE *et al.*, 2015). É possível observar que a maioria dos elementos minerais decaem proporcionalmente com o fator de concentração aproximado, calculado para cada amostra DL produzida, sendo ele 2,6 para T15; 2,3 para T20; 1,9 para T25 e 1,7 para T30. O magnésio não teve diferença estatística entre os tratamentos e isso se deve, provavelmente, pelo fato dele ser o mineral com menor concentração no leite, não havendo variação significativa entre as amostras de DL produzidas.

Na literatura não é reportado estudos sobre a composição mineral das cinzas de doces de leite produzidos, no entanto, na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) é apresentado para o DL cremoso, o valor de 195 mg cálcio e 16 mg de magnésio para 100 g de DL, com 27,5% (m/m) de umidade no produto (TACO, 2011). Portanto, as amostras fabricadas variando o teor de sacarose possuem valores de cálcio e magnésio próximos do que

foi referenciado pela TACO. Para melhor entender o efeito do aumento de açúcar na composição mineral dos quatro tratamentos fabricados, foi realizada análise de correlação entre os minerais e cinzas com a adição de açúcar.

A Tabela 13 descreve os resultados de correlação obtido para cinzas, sódio, magnésio, fósforo, cloro, potássio e cálcio ( $r = -1,00$ ;  $r = -0,98$ ;  $r = -0,99$ ;  $r = -0,95$ ;  $r = -0,95$  e  $r = -0,99$  respectivamente), resultando então em uma forte correlação significativa ( $p \leq 0,05$ ) e inversamente proporcional com o teor de açúcar adicionado ao DL. Desse modo, pode-se inferir que com o acréscimo de sacarose na formulação para produção do DL ocorre a redução dos sólidos lácteos, como a cinzas e conseqüentemente há diminuição da quantidade de cada elemento mineral presente nela, sendo assim, o tratamento T15 é o que contém maior conteúdo mineral, seguido do T20, T25 e T30.

Do ponto de vista nutricional, o cálcio é o elemento mais importante do leite, sendo fundamental para a saúde dos ossos e prevenção da osteoporose, no estudo realizado verificase uma grande redução de cálcio ao produzir o DL com 30% (m/m) de sacarose sobre a massa de leite em comparação com um DL fabricado com 15% (m/m) de sacarose sobre a massa de leite, dessa forma, ao fabricar um doce com maior sólidos lácteos, gosto menos enjoativo, têm-se também um produto com maior conteúdo mineral (SMIT, 2000; PERRONE *et al.*, 2019).

Tabela 13 - Correlação entre o teor de minerais e a adição de açúcar nos doces produzidos.

<b>Variáveis</b>	<b>Correlação (r)</b>	<b>Valor da significância (p)*</b>
Cinzas x Adição de açúcar	-1,00	0,00
Na x Adição de açúcar	-0,98	0,02
P x Adição de açúcar	-0,99	0,01
Cl x Adição de açúcar	-0,95	0,05
K x Adição de açúcar	-0,95	0,05
Ca x Adição de açúcar	-0,99	0,01

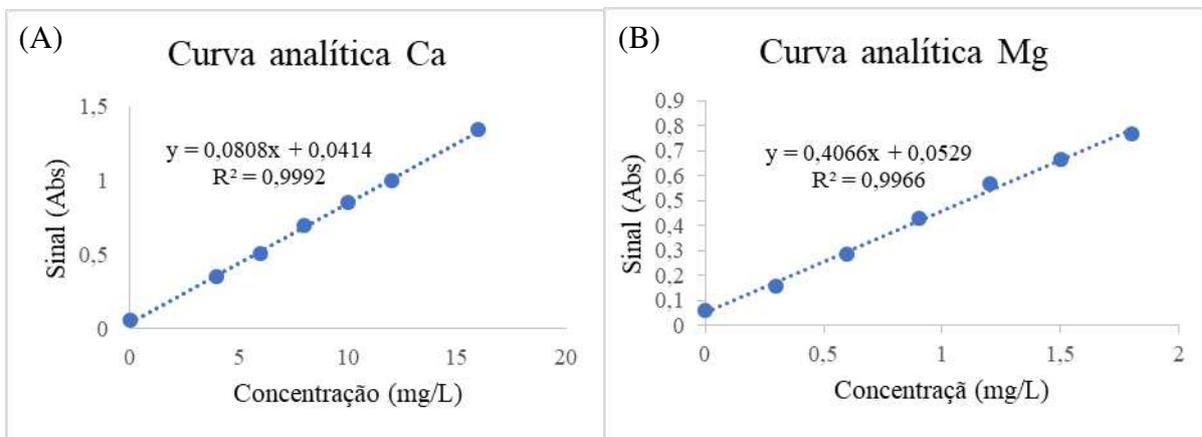
Fonte. Elaborado pela autora (2023).

\*Valores de  $p \leq 0,05$  possuem correlação significativa e valores de  $p > 0,05$  não possuem correlação significativa.

### 5.2.3 Determinação de cálcio e magnésio nas amostras de doce de leite produzidas por espectrometria de absorção atômica com chama

O Gráfico 1 apresenta as curvas analíticas para as soluções padrões de cálcio e magnésio, observa-se uma relação linear na faixa estudada de acordo com o coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

Gráfico 1 - Curvas analíticas para os elementos (A) cálcio e (B) magnésio.



Fonte. Elaborado pela autora (2023).

Com os resultados de sinais obtidos para as amostras foi possível a determinação dos teores de cálcio e magnésio nos diferentes tratamentos de DL a partir da curva analítica. A Tabela 14 apresenta os valores encontrados para esses dois minerais em  $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  de doce, seguido de tratamento estatístico das análises.

Tabela 14 - Concentração de cálcio e magnésio por FAAS nas amostras fabricadas (n=3).

Minerais	Amostras**			
	T15	T20	T25	T30
Ca (g.100 g <sup>-1</sup> )	0,286 <sup>a</sup> ± 0,014	0,240 <sup>b</sup> ± 0,013	0,196 <sup>c</sup> ± 0,015	0,184 <sup>c</sup> ± 0,010
Mg (g.100 g <sup>-1</sup> )	0,021 <sup>a</sup> ± 0,001	0,018 <sup>a</sup> ± 0,001	0,018 <sup>a</sup> ± 0,002	0,016 <sup>a</sup> ± 0,002

Fonte. Elaborado pela autora (2023).

Legenda. <sup>a-d</sup> Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. \*Valores de médias ± desvio padrão. \*\*Amostras: T15 (15% m/m de sacarose sobre a massa de leite), T20 (20% m/m de sacarose sobre a massa de leite), T25 (25% m/m de sacarose sobre a massa de leite) e T30 (30% m/m de sacarose sobre a massa de leite).

Pela análise da Tabela 14, observa-se que os minerais obtidos por FAAS apresentaram a mesma tendência encontrada para a análise através da técnica de MEV-EDS, em que o teor dos elementos decai com o aumento da quantidade de sacarose adicionada em cada formulação de DL. Além disso, estatisticamente o teor de magnésio presente em todas as amostras foi igual, o mesmo ocorreu com os resultados empregando a técnica de MEV-EDS. O cálcio apresentou diferença significativa entre tratamentos, contudo, T25 e T30 são iguais estatisticamente.

Para comparar os resultados obtidos pelas técnicas analíticas utilizadas na caracterização dos minerais presentes nas cinzas de doces fabricados alterando o teor de sacarose, foi realizado um teste de comparação de médias de Tukey, conforme apresentado na Tabela 15.

Tabela 15 - Comparação das concentrações de cálcio e magnésio por FAAS e EDS nas amostras de doces de leite experimentais (n=3).

Técnica	Minerais (g.100 g <sup>-1</sup> )	Amostras**			
		T15	T20	T25	T30
FAAS	Ca	0,286 <sup>aA</sup> ±0,014	0,240 <sup>bA</sup> ± 0,013	0,196 <sup>cA</sup> ± 0,015	0,184 <sup>cA</sup> ± 0,010
EDS	Ca	0,284 <sup>aA</sup> ±0,099	0,241 <sup>abA</sup> ±0,096	0,186 <sup>bcA</sup> ±0,034	0,164 <sup>bA</sup> ± 0,040
FAAS	Mg	0,021 <sup>aA</sup> ±0,001	0,018 <sup>aA</sup> ± 0,001	0,018 <sup>aA</sup> ± 0,002	0,016 <sup>aA</sup> ± 0,002
EDS	Mg	0,025 <sup>aB</sup> ±0,002	0,020 <sup>aA</sup> ± 0,005	0,019 <sup>aA</sup> ± 0,010	0,015 <sup>aA</sup> ± 0,002

Fonte. Elaborado pela autora (2023).

Legenda. <sup>a-c</sup> Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. <sup>A-B</sup> Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna não diferem significativamente entre si para o mesmo elemento, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. \*Valores de médias ± desvio padrão.\*\*Amostras: T15 (15% m/m de sacarose sobre a massa de leite), T20 (20% m/m de sacarose sobre a massa de leite), T25 (25% m/m de sacarose sobre a massa de leite) e T30 (30% m/m de sacarose sobre a massa de leite).

De acordo com a Tabela 15, o elemento mineral cálcio não apresentou diferença significativa em sua concentração quando analisado pela técnica de FAAS e EDS, nas amostras produzidas experimentalmente, o que sugere que o intuito de caracterizar os minerais presentes nas cinzas de doces de leite através do EDS, que conhecidamente é uma técnica semiquantitativa foi bem-sucedido pelo método empregado, visto que a FAAS é uma técnica quantitativa amplamente utilizada para análise de metais. Para o magnésio, apenas o tratamento T15 teve diferença significativa entre as duas técnicas de caracterização, como esse elemento está em menor quantidade no leite essa variação pode ser decorrente desse fato e como o EDS apresenta uma avaliação semiquantitativa, a diferença encontrada pode estar relacionada também com esse fato. Entretanto, analisando todos os resultados obtidos fica evidente que a caracterização e quantificação através da técnica de MEV-EDS foi extremamente satisfatória, sendo que identificou e quantificou os minerais presentes nas cinzas dos doces de leite estudados e ao ser comparada com uma técnica de referência como a espectrometria de absorção atômica com chama apresentou resultados em sua ampla maioria iguais estatisticamente.

### 5.2.4 Análise de cor dos doces de leite produzidos

A medição de cor nos produtos permite verificar diferenciações entre as amostras, proporcionando uma forma interessante de avaliar esse parâmetro de qualidade em amostras de DL (SILVA, 2016). A legislação de DL estabelece a cor como: castanho caramelado proveniente da reação de Maillard (BRASIL, 1997). O DL têm coloração distinta em cada região.

A Tabela 16 apresenta os valores dos parâmetros de cor da escala CIELab medidos, assim como, valor do índice de escurecimento obtido para cada amostra a partir dos valores de L\*, a\* e b\*, seguidos da comparação de média de Tukey.

Tabela 16 - Resultados da análise de colorimetria dos doces de leite produzidos (n=3).\*

Parâmetros	Amostras			
	T15	T20	T25	T30
L*	60,53 <sup>a</sup> ± 3,73	57,62 <sup>a</sup> ± 1,03	56,78 <sup>a</sup> ± 2,76	58,05 <sup>a</sup> ± 3,25
a*	5,06 <sup>a</sup> ± 2,50	5,58 <sup>a</sup> ± 0,79	5,38 <sup>a</sup> ± 1,83	4,61 <sup>a</sup> ± 0,66
b*	26,59 <sup>a</sup> ± 0,77	25,30 <sup>a</sup> ± 1,12	25,16 <sup>a</sup> ± 3,60	25,68 <sup>a</sup> ± 3,17
C*	27,14 <sup>a</sup> ± 1,14	25,91 <sup>a</sup> ± 1,25	25,75 <sup>a</sup> ± 3,79	26,10 <sup>a</sup> ± 3,01
h <sub>ab</sub>	79,40 <sup>a</sup> ± 4,99	77,62 <sup>a</sup> ± 1,22	78,06 <sup>a</sup> ± 3,04	79,63 <sup>a</sup> ± 2,51
BI	62,98 <sup>a</sup> ± 9,61	63,49 <sup>a</sup> ± 3,74	63,88 <sup>a</sup> ± 9,07	62,58 <sup>a</sup> ± 0,04

Fonte. Elaborado pela autora (2023).

Legenda. L\*: luminosidade; -a\*: verde; +a\*: vermelho, -b\*: azul; +b\*: amarelo; C\*: croma; h<sub>ab</sub>: ângulo. <sup>a-d</sup> Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. \*Valores de médias ± desvio padrão. \*\*Amostras: T15 (15% m/m de sacarose sobre a massa de leite), T20 (20% m/m de sacarose sobre a massa de leite), T25 (25% m/m de sacarose sobre a massa de leite) e T30 (30% m/m de sacarose sobre a massa de leite).

Pela análise estatística, percebe-se que os parâmetros de cor L\*, a\*, b\*, C\* e h<sub>ab</sub> não têm diferença estatisticamente entre os tratamentos analisados. O parâmetro de luminosidade teve variação de 54,02 a 64,26, valores que indicam L\* tendendo ao branco. Os valores positivos das coordenadas a\* e b\*, demonstram que o DL tem tendência de vermelho e amarelo, com predominância do segundo, pois o parâmetro b\* têm valores maiores. O valor de h<sub>ab</sub> variou de 76,4 a 82,14, representando, em graus, coloração de vermelho para amarelo. O valor de croma de 21,96 a 28,28 indica uma saturação intensa. Francisquini *et al.* (2018)

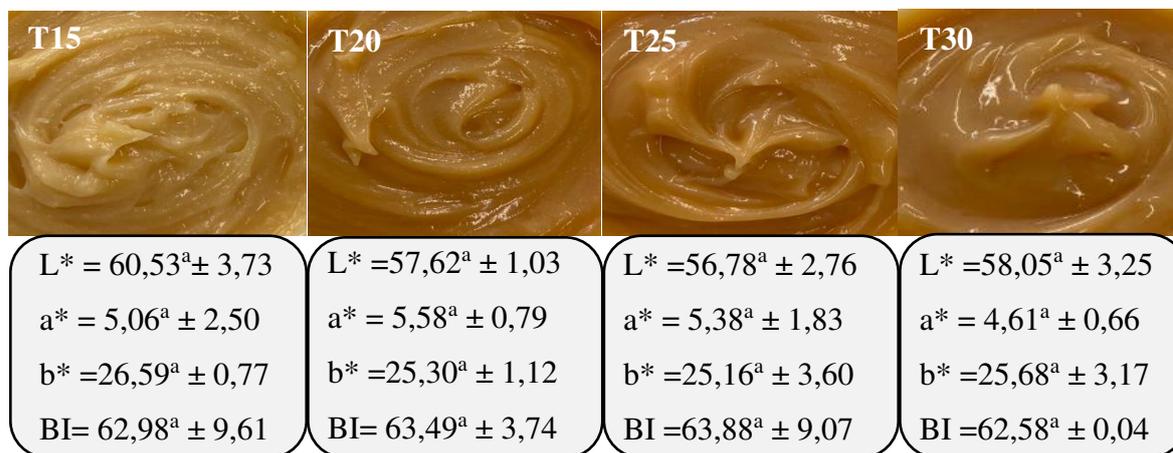
realizaram análise de cor em DL com e sem hidrólise de lactose, com L\* variando de 31,44 a 61,23; a\* entre 5,26 e 10,6; b\* entre 7,00 e 23,40, valores semelhantes ao encontrado neste trabalho. Leddomado *et al.* (2021) produziram seis diferentes formulações de DL modificando o tipo de leite utilizado (integral ou desnatado) e o tipo de prebiótico encontraram valores mínimos e máximos respectivamente, L\*: 44,02 e 47,00; a\*: 12,62 e 13,95; b\*: 17,12 e 19,43, os valores de L\* e b\* são inferiores e valores de a\* são superiores aos medidos no presente trabalho, que demonstra que a modificação da formulação e/ou processo pode influenciar na cor final do DL.

O DL é um produto de cor marrom que pode ter sua intensidade de cor controlada pela manipulação dos ingredientes e condições de processamento. A coloração acastanhada se deve aos pigmentos escuros formados principalmente durante o cozimento. Esses compostos são formados em uma reação não enzimática conhecida como reação de Maillard que ocorre entre proteínas (principalmente com o aminoácido lisina) e açúcares redutores, como a lactose (NETTO *et al.*, 2022). Alguns fatores como tempo de evaporação, pH da mistura leite e açúcar, temperatura e açúcar utilizado podem influenciar a coloração no DL (PERRONE *et al.*, 2011).

Neste estudo, o tempo de evaporação não mostrou diferença significativa entre os tratamentos, a temperatura foi mantida a mesma, o açúcar utilizado foi a sacarose que é um açúcar não redutor, ou seja, não participa da reação de Maillard e o pH foi controlado adicionando bicarbonato de sódio no início da fabricação, em igual quantidade para todos os tratamentos.

O índice de escurecimento é usado para avaliar a intensidade da cor marrom de diferentes produtos alimentícios, na literatura foi encontrado apenas um trabalho em doce de leite com cristalização induzida da lactose com valores de BI entre 50,29 e 52,17 (NETTO *et al.*, 2022). Não foi encontrada diferença estatística significativa no índice de escurecimento das amostras experimentais analisadas nesse estudo, na Figura 13 é mostrado a imagem dos doces de leite produzidos.

Figura 13 - Doces de leite produzidos com os valores de L\*: luminosidade, a\*: vermelho e b\*: amarelo e índice de escurecimento (BI), utilizados para avaliar a intensidade da cor marrom das amostras. \*<sup>a-d</sup> Médias seguidas da mesma letra para o mesmo parâmetro não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



Fonte. Elaborado pela autora (2023).

Legenda. T15 (15% m/m de sacarose sobre a massa de leite); T20 (20% m/m de sacarose sobre a massa de leite); T25 (25% m/m de sacarose sobre a massa de leite); T30 (30% m/m de sacarose sobre a massa de leite).

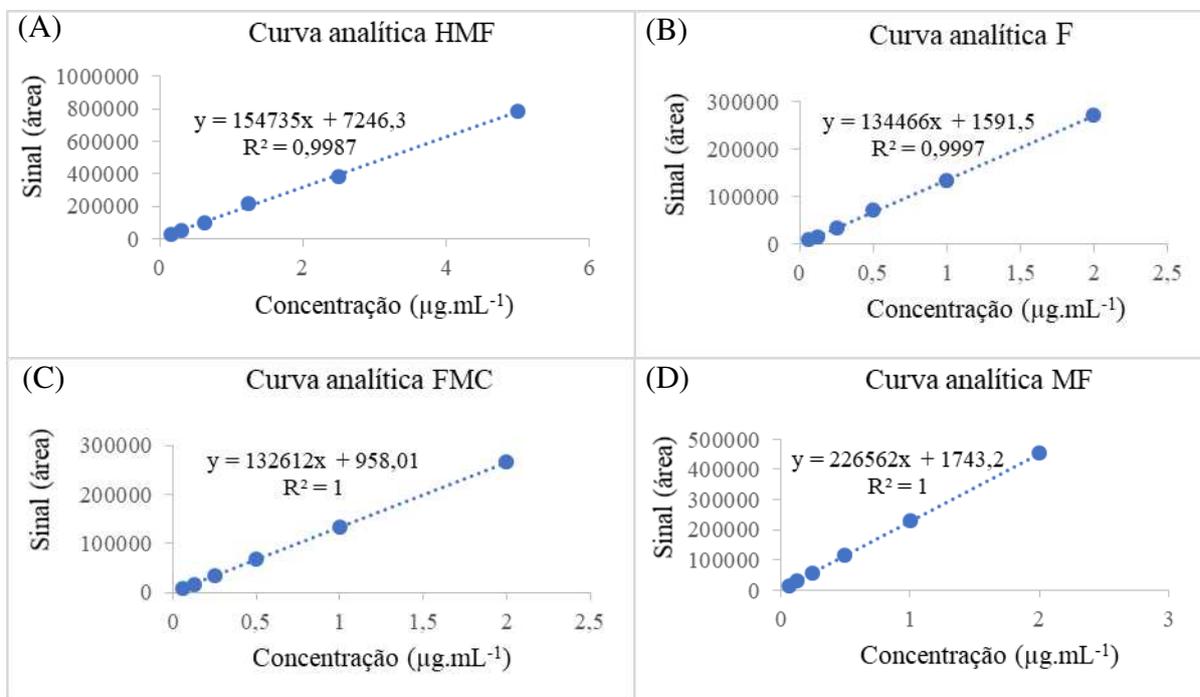
### 5.2.5 Quantificação dos marcadores da reação de Maillard nas amostras de doces de leite

Nesta seção são apresentados os resultados das análises dos marcadores químicos da reação de Maillard.

#### 5.2.5.1 Curvas analíticas para os marcadores da reação de Maillard

O Gráfico 2 apresenta as curvas analíticas obtidas para os quatro marcadores estudados (HMF, F, FMC e MF). Verifica-se a relação linear na faixa de 0,156-5,000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para o HMF e 0,062-2,000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para o F, FMC e MF. De acordo com o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido, todas as curvas possuem comportamento linear.

Gráfico 2 - Curvas analíticas dos marcadores da reação de Maillard:  
 (A) 5-hidroxi metilfurfural (HMF), (B) 2-furaldeído (F), (C) 2- furilmetilcetona (FMC),  
 (D) 5-metil-2-furfural (MF).



Fonte. Elaborado pela autora (2023).

#### 5.2.4.2 Taxa de recuperação

O ensaio de recuperação foi realizado nos diferentes tratamentos de DL fabricados, por meio da fortificação das amostras com concentrações conhecidas dos quatro analitos de interesse da RM. A Tabela 17 apresenta os resultados de recuperação calculados conforme equação 6 para o HMF, pois foi o único analito identificado nas amostras estudadas. As recuperações variaram de 73,79 até 112,39, indicando que a matriz retém parte do HMF, sendo esse efeito mais pronunciado nas amostras com maior teor de sacarose.

Tabela 17 - Resultados do ensaio de recuperação para o HMF nas amostras de doces de leite produzidos.

<b>Amostras</b>	<b>Recuperação %</b>
T15	107,02 ± 0,07
T20	104,94 ± 7,45
T25	77,14 ± 3,35
T30	85,57 ± 1,72

Fonte. Elaborado pela autora (2023).

#### 5.2.4.3 Determinação dos marcadores da reação de Maillard, 5-hidroximetilfurfural (HMF), 2-furaldeído (F), 5-metil-2-furfural (MF) e 2-furilmetilcetona (FMC) por cromatografia líquida de alta eficiência

Os furanos (HMF, F, MF e FMC) são produtos intermediários da RM, encontrados como compostos livres (não ligados a proteínas), sendo que o HMF tem sido usado amplamente para indicar danos causados pela ação do calor em produtos lácteos (LUND *et al.*, 2022). Na Tabela 18 estão apresentados os teores de HMF quantificados, de acordo com o tempo de estocagem analisado para as amostras de doces de leite, alterando a teor de sacarose nas formulações, os demais marcadores (F, MF e FMC) não foram detectados nas amostras estudadas. Foi relatado que o primeiro composto de furfural formado durante a RM é o HMF, e os demais furfurais (F, MF e FMC), são produtos dos estados mais avançados da reação, ou são formados por interconversão, como resultado de maior aquecimento ou períodos de armazenamento mais longos (CHÁVEZ-SERVÍN *et al.*, 2005). Lund *et al.* (2022) também não detectaram F, MF e FMC em nenhuma amostra de fórmula infantil em pó, inferindo que esse resultado corresponde com outros estudos e não é surpreendente, uma vez que esses furanos estão associados a altas cargas de calor. Pinto (2023) encontrou apenas HMF nas amostras comerciais de doces de leite, sendo que os valores encontrados variaram de 49,79 a 262,00  $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ . Francisquini *et al.* (2018) obteve teor de HMF de 19 a 91  $\mu\text{mol.kg}^{-1}$  para doces de leite experimentais. A variabilidade desse índice ocorre devido aos diferentes tipos de ingredientes utilizados na fabricação do DL e às próprias condições de processamento (BARRIOS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2021).

Tabela 18 - Resultados da análise de HMF nas amostras de doces de leite (n=2).\*

Dias	Amostras**			
	T15 HMF ( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ )	T20 HMF ( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ )	T25 HMF ( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ )	T30 HMF ( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ )
D7	28,30 <sup>aA</sup> $\pm$ 0,56	33,31 <sup>bA</sup> $\pm$ 0,77	33,36 <sup>bA</sup> $\pm$ 0,36	39,25 <sup>cA</sup> $\pm$ 0,32
D30	89,77 <sup>aB</sup> $\pm$ 3,65	96,04 <sup>aB</sup> $\pm$ 11,16	168,42 <sup>bB</sup> $\pm$ 6,36	161,66 <sup>bB</sup> $\pm$ 6,62
D45	44,01 <sup>aA</sup> $\pm$ 0,01	42,71 <sup>aA</sup> $\pm$ 11,41	48,10 <sup>aA</sup> $\pm$ 2,90	62,76 <sup>aA</sup> $\pm$ 12,60
D60	44,80 <sup>aA</sup> $\pm$ 6,62	48,60 <sup>aA</sup> $\pm$ 2,44	50,34 <sup>aA</sup> $\pm$ 4,20	56,12 <sup>aA</sup> $\pm$ 3,20

Fonte. Elaborado pela autora (2023).

Legenda. <sup>a-c</sup> Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. <sup>A-B</sup> Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. \*Valores de médias  $\pm$  desvio padrão. \*\*Amostras: T15 (15% m/m de sacarose sobre a massa de leite), T20 (20% m/m de sacarose sobre a massa de leite), T25 (25% m/m de sacarose sobre a massa de leite) e T30 (30% m/m de sacarose sobre a massa de leite).

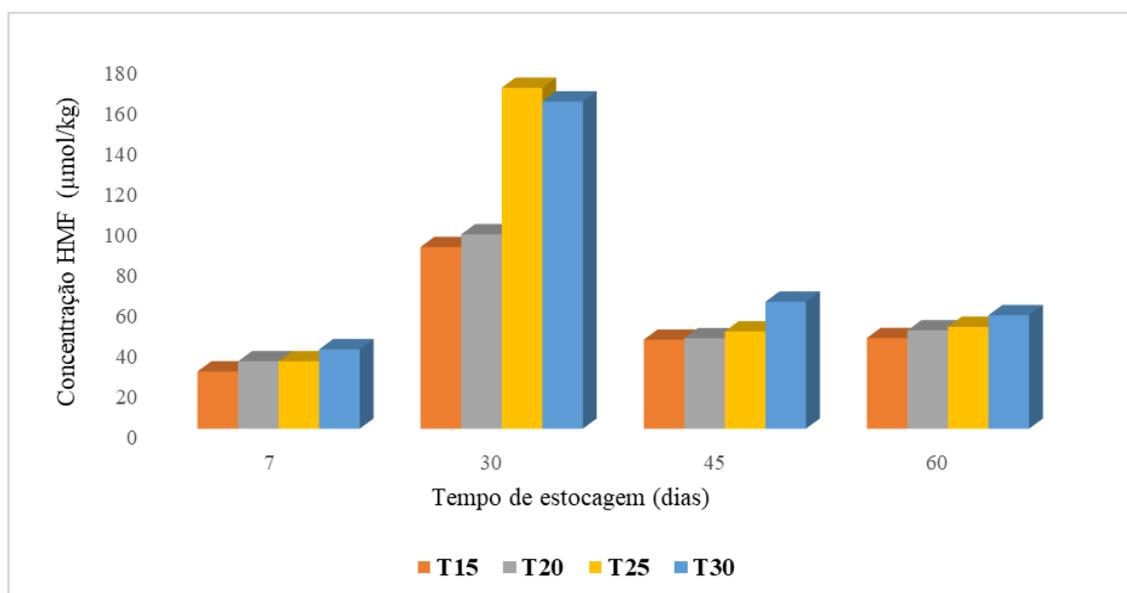
Com relação à formação de HMF não houve diferença estatística significativa entre as amostras T20 e T25 para a análise sete dias após a produção dos doces, as outras amostras apresentaram diferença significativa entre o teor de HMF encontrado. Com trinta dias após a fabricação, os doces T15 e T20 não tinham diferença significativa, assim como, T25 e T30 também não apresentavam diferença significativa entre si. Já com quarenta e sessenta dias após o preparo dos doces de leite, todos os tratamentos já não apresentavam diferenças significativas entre a concentração de HMF presente em cada amostra analisada, sugerindo que a presença de maior quantidade de sacarose não afetou a formação deste marcador. Francisquini *et al.* (2019) em seu trabalho sobre formação de 5-hidroximetilfurfural e mudança de cor em doce de leite hidrolisado com lactose observaram que o aumento na concentração de sacarose não resultou necessariamente em maiores taxas de acúmulo de HMF e sua contribuição à formação de HMF não era aparente. A sacarose é um açúcar não redutor e não participa diretamente da reação de Maillard com a formação de HMF (NEWTON *et al.*, 2012).

Através do Gráfico 3, verifica-se o comportamento do teor de HMF encontrado com o tempo de estocagem analisado, em D7 é o valor de HMF obtido é baixo para todas as amostras, em D30 a concentração de HMF tem um elevado aumento em todos os tratamentos estudados, em D45 o teor de HMF nas amostras de doces de leite decaiu e permanece na mesma faixa de concentração em D60. Na Tabela 18, a análise estatística demonstra esse

perfil analisado, onde tem-se os valores de HMF estatisticamente iguais para D7, D45 e D60 em todos os tratamentos, observando apenas diferença significativa entre os dias de estocagem analisados em D30, que é o dia em que a análise apontou o maior pico de HMF em todas as amostras estudadas.

Francisquini *et al.* (2018) acompanharam a evolução do índice de HMF livre ao longo da fabricação e após trinta dias de armazenamento em temperatura ambiente, e os resultados da do índice HMF livre com trinta dias de armazenamento era  $87 \mu\text{mol.kg}^{-1}$  sendo que as amostras dos quatro tratamentos fabricados apresentaram aumento na concentração de HMF livre ao longo da produção e armazenamento. Contudo, não foi observado como o HMF se comporta após os trinta dias de estocagem como foi feito nesse estudo, no entanto, com trinta dias Francisquini *et al.* (2018) também observaram alta concentração de HMF. A determinação de HMF livre fornece dados que demonstram como a severidade do tratamento térmico pode ser monitorada analiticamente durante a fabricação, aquecimento e armazenamento, colaborando para controlar e prevenir perdas nutricionais durante o tratamento térmico (FRANCISQUINI *et al.*, 2018).

Gráfico 3 - Análise tempo de estocagem versus concentração de HMF nos tratamentos T15, T20, T25 e T30.



Fonte. Elaborado pela autora (2023).

Legenda. T15 (15% m/m de sacarose sobre a massa de leite); T20 (20% m/m de sacarose sobre a massa de leite); T25 (25% m/m de sacarose sobre a massa de leite); T30 (30% m/m de sacarose sobre a massa de leite).

Este perfil sugere que após um mês de armazenamento a quantidade de HMF aumentou nas amostras, Gökmen *et al.* (2014) relata que, em geral, aumentar o tempo de armazenamento também aumenta a quantidade de HMF formado nos alimentos. No entanto, nesse estudo foi mostrado que com maior tempo de estocagem D45 houve diminuição e em D60 a concentração se manteve constante em relação à medida anteriormente. Além disso, o HMF é um composto intermediário da reação de Maillard e após esta etapa outros compostos são formados utilizando furfurais como precursores. Para avaliar o que estava ocorrendo neste estudo, foi realizada análise de cor e a partir dos parâmetros encontrados calculou-se o índice de escurecimento das amostras com trinta dias, quarenta e cinco dias e sessenta dias de produção, os resultados obtidos são mostrados na Tabela 19.

Tabela 19 - Resultados da análise de BI dos doces de leite durante a estocagem (n=2).\*

BI	Amostras**			
	T15	T20	T25	T30
BI30	68,43 <sup>aA</sup> ± 0,39	57,57 <sup>bA</sup> ± 0,33	53,71 <sup>cA</sup> ± 0,53	56,42 <sup>bA</sup> ± 0,20
BI45	70,06 <sup>aAB</sup> ± 0,54	58,95 <sup>bA</sup> ± 0,61	55,82 <sup>bAB</sup> ± 0,34	59,21 <sup>bAB</sup> ± 1,07
BI60	71,15 <sup>aB</sup> ± 0,05	63,34 <sup>bB</sup> ± 0,37	56,68 <sup>cB</sup> ± 0,12	61,54 <sup>bB</sup> ± 0,53

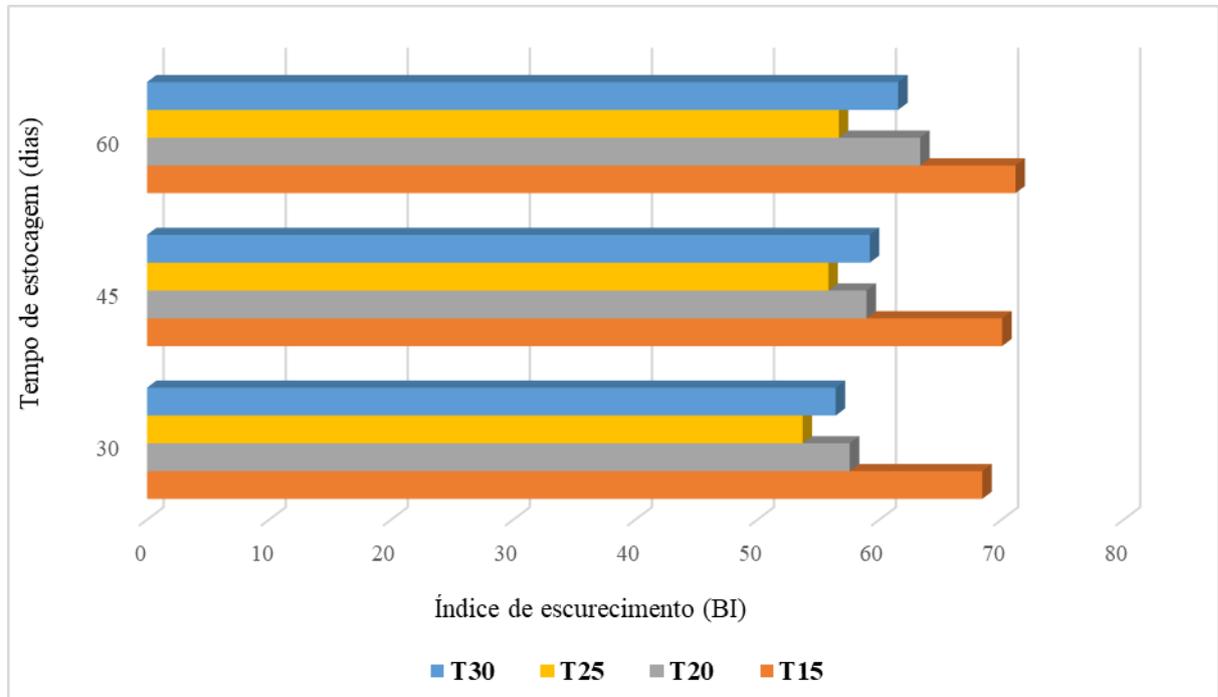
Fonte. Elaborado pela autora (2023).

Legenda. BI30: índice de escurecimento com 30 dias; . BI45: índice de escurecimento com 45 dias; BI60: índice de escurecimento com 60 dias; <sup>a-c</sup> Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. <sup>A-B</sup> Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. \*Valores de médias ± desvio padrão.\*\*Amostras: T15 (15% m/m de sacarose sobre a massa de leite), T20 (20% m/m de sacarose sobre a massa de leite), T25 (25% m/m de sacarose sobre a massa de leite) e T30 (30% m/m de sacarose sobre a massa de leite).

Observa-se pela Tabela 19 que o índice de escurecimento para os tratamentos T20 e T30 são iguais estatisticamente para os tempos de trinta e sessenta dias de estocagem e as demais amostras apresentaram diferença significativa. Com quarenta e cinco dias de estocagem, apenas o tratamento T15 não é igual estatisticamente aos outros doces produzidos. Verifica-se ao avaliar cada amostra nos tempos de estocagem analisados que há diferença significativa entre BI30 e BI60 para todos os tratamentos, com aumento do índice de escurecimento com o passar dos dias de fabricação dos doces, conforme é mostrado no Gráfico 4. O que corrobora para a hipótese do HMF estar sendo consumido para haver formação de compostos de etapas mais avançadas da reação de Maillard, como as

melanoidinas, que são compostos de coloração marrom produzidas no estágio final da RM (METHA & DEETH, 2016).

Gráfico 4 - Análise BI versus tempo de estocagem para os tratamentos T15, T20, T25 e T30.



Fonte. Elaborado pela autora (2023).

Legenda. T15 (15% m/m de sacarose sobre a massa de leite); T20 (20% m/m de sacarose sobre a massa de leite); T25 (25% m/m de sacarose sobre a massa de leite); T30 (30% m/m de sacarose sobre a massa de leite).

## 6 CONCLUSÃO

Com o desenvolvimento do presente estudo, pode-se determinar e estimar a composição mineral das cinzas das seis diferentes marcas de doce de leite comerciais analisadas e dos quatro tratamentos de doces produzidos experimentalmente utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplada com espectroscopia de energia dispersiva (EDS). Foram encontrados nas amostras de mercado e nas fabricadas os minerais sódio, magnésio, fósforo, cloro, potássio e cálcio. O teor de cálcio e magnésio encontrado via EDS para os doces de leite fabricados foi igual estatisticamente quando comparado com a concentração desses minerais obtida através da espectrometria de absorção atômica com chama.

Amostras produzidas com menor teor de açúcar resultaram no aumento da porcentagem de cinzas, gordura, proteína e lactose e por consequência um aumento na concentração de cada mineral presente na amostra. Com destaque para cálcio, um elemento mineral importante para a saúde dos ossos que teve acentuada diminuição com o acréscimo de sacarose nas formulações. A recomendação de consumo diário de Ca para adultos é de 1000 a 1300 mg, em uma porção de 20 g de doce de leite da amostra T15 a ingestão de cálcio seria 57 mg, enquanto, para a amostra T30 o consumo seria de 33 mg, modificando significativamente o aporte de cálcio fornecido pelo doce de leite.

Os parâmetros de cor e o índice de escurecimento não apresentaram diferença significativa com o aumento do teor de sacarose nos tratamentos experimentais. Além disso, com maior adição de açúcar houve aumento do rendimento, sacarose no produto final e carboidratos totais.

Através da análise dos marcadores da reação de Maillard foi possível a identificação e quantificação de HMF (composto intermediário) nas diferentes amostras fabricadas experimentalmente, em distintos dias de análise após a produção dos doces. Avaliou-se que o HMF teve maior concentração obtida após trinta dias de fabricação de todas as amostras e em seguida houve redução do teor de HMF encontrado, o que sugere que esteja havendo formação de outros compostos, como as melanoidinas (compostos de coloração marrom). Esse fato foi corroborado pelo aumento do índice de escurecimento calculado para esses mesmos dias de análise.

Os doces fabricados obtiveram valores de BI menor do que os encontrados nos doces de mercado, o que ocasionou um maior desvio quando comparados. Não houve grande variação entre a composição mineral dos doces comerciais e produzidos. Ademais, as análises

realizadas demonstraram alguns doces comerciais e experimentais fora dos parâmetros exigidos pela legislação vigente.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do trabalho apresentado neste documento foi possível fazer uma discussão tecnológica com relação ao efeito do uso da menor quantidade de sacarose sobre a produção do doce de leite. Estudo em parceria com a FUNARBE no programa de mestrado acadêmico para inovação. Como resultado obtidos de acordo com as condições experimentais empregadas, pode-se afirmar que com a menor concentração de sacarose adicionada na formulação para a fabricação do doce de leite os sólidos lácteos (cinzas, gordura, proteína e lactose) aumentam proporcionalmente, sendo que valores de cinzas foram superiores aos permitidos pela legislação vigente e conseqüentemente há influência na composição mineral das amostras.

Para caracterizar e quantificar os minerais nessas amostras empregou-se uma técnica analítica alternativa devido a sua fácil utilização, rapidez e baixo custo, a espectroscopia de energia dispersiva. Através dessa técnica foi possível detectar sódio, magnésio, cloro, fósforo, potássio e cálcio e determinar suas concentrações nas amostras. Para confirmar a veracidade dos valores obtidos, determinou-se cálcio e magnésio por espectrometria de absorção atômica com chama, que é uma técnica de referência para a análise de metais. O resultado encontrado comparando as concentrações de ambas técnicas de análise foi igual estatisticamente, o que foi muito satisfatório para o estudo, visto que o EDS fornece uma análise semiquantitativa que para os minerais estudados apresentou-se confiável e compatível com a técnica quantitativa.

Outro ponto importante a ser considerado é em relação determinação de HMF via cromatografia líquida de alta eficiência em diferentes dias de estocagem, mostrando que a concentração de HMF não aumenta como observado para maiores tempos de processamento, para o armazenamento foi observado a possível transformação desse composto em compostos de etapas posteriores, como as melanoidinas (inferido devido ao aumento do índice de escurecimento).

Desse modo, o presente estudo contém assuntos de interesse industrial e acadêmico sobre o doce de leite. Sendo essa matriz ainda pouco estudada na literatura, esse estudo traz uma abordagem de composição centesimal em relação aos parâmetros de legislação, composição físico-química apresentando as variações encontradas no mercado para doce de leite, composição mineral caracterizando os elementos presentes nas cinzas dos doce através de duas técnicas analíticas, identifica a concentração de HMF no armazenamento em amostras de doce de leite alterando a formulação de sacarose.

## REFERÊNCIAS

- AMORIM, F. A. C. et al. Espectrometria de absorção atômica: o caminho para determinações multi-elementares. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1784-1790, 2008.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. Washington (D.C), 2005.
- ARAÚJO, J. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa: EDITORA UFV, 2004.
- BASTOS, D. H. M. et al. J. Produtos da reação de Maillard em alimentos industrializados. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.**, v. 36, n. 3, p. 63-78, 2011.
- BARRERA, J. et al. In house validation for the direct determination of 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) in “Dulce de Leche”. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 95, p. 103665, 2021.
- BEESTMA, J. The CIELAB L\*a\*b\* System – the Method to Quantify Colors of Coatings. Santa Fé, 11 de setembro de 2020. Disponível em: <https://knowledge.ulprospector.com/10780/pc-the-cielab-lab-system-the-method-to-quantify-colors-of-coatings/>. Acesso em 01 de Julho de 2022.
- BELITZ, H. D. et al. **Food Chemistry**. Springer Heidelberg, 2004.
- BERTRAND, E. et al. **The Maillard Reaction in Food: An Introduction**. Elsevier, 2018.
- BORGES, E. et al. Possibilidades e limitações no uso da temperatura em cromatografia líquida de fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 945–953, 2010.
- BRANDÃO, G. C. **Estratégias alternativas de preparo de amostras para a determinação de metais em alimentos por espectrometria de absorção atômica em chama**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 239, de 26 de Julho de 2018. Aprova o regulamento técnico para aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em suplementos alimentares. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília: ANVISA, 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria nº 354, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Doce de Leite. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, n. 172, p. 37-38, 08 set. 1997. Seção I.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Laboratório Nacional Agropecuário-LANAGRO/RS. Laboratório de Produtos de Origem Animal. **Determinação de acidez titulável em leite fluido**. RS, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Laboratório Nacional Agropecuário-LANAGRO/RS. Laboratório de Produtos de Origem Animal. **Determinação do Resíduo Mineral Fixo em Leite e Derivados Lácteos**. RS, 2014.

BRIÃO, V. B. et al. 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.

BARRIOS-RODRÍGUEZ, Y. F. et al. Effect of formulation and heat treatment on 5-hydroxymethylfurfural formation and quality parameters in dulce de leche. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 38, n. 7, p. 1118-1125, 2021.

BUERA, M.P.; PETRIELLA, C.; LOZANO, R.D. **Definition of colour in the non-enzymatic browning**. Die Farbe, 1985.

CAMPÍNS-FALCÓ, P. et al. Liquid Chromatography - Instrumentation. In: **Encyclopedia of Analytical Science**. 3. ed. Elsevier, 2019. p. 108-116.

CAMPOS, N. D. et al. Characterization of the white dots defect (“PIPS”) in “Doce de leite”. **European Food Research and Technology**, p. 1-11, 2022.

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

CASHMAN, K. D. Milk minerals (including trace elements) and bone health. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 11, p. 1389-1398, 2006.

CASHMAN, K. D. Milk salts| Macroelements, Nutritional Significance. In: **Encyclopedia of Dairy Sciences**. Food Science, 2011. p. 925-932.

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.

CHÁVEZ-SERVÍN, J. L.; CASTELLOTE, A. I.; LÓPEZ-SABATER, M. C. 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.

CHEUNG, P. C. K; MEHTA, B. M. **Handbook of food chemistry**. Springer Berlin Heidelberg, 2015.

CNS, Clinical Nutrition Service (2001): Facts About Dietary Supplements. National Institutes of Health Warren Grant Magnuson Clinical Center, Bethesda.

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

CUI, Y. et al. The effects of heat treatment and fermentation processes on the formation of furfurals in milk-based dairy products using a QuEChERS technique followed by gas chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 313, p. 125930, 2020.

DAMODARAN, S. Amino acids, peptides and proteins. **Fennema’s food chemistry**, v. 4, p. 425-439, 2008.

DEDAVID, B. A. et al. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. EdiPUCRS, 2007.

DEMIATE, I. M.; KONKEL, F. E.; PEDROSO, R. A. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de doce de leite pastoso-composição química. **Food Science and Technology**, v. 21, n. 1, p. 108-114, 2001.

DE PAULA, I. L. et al. Energy-dispersive spectroscopy for the quantitative determination of the major chemical elements in milk. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e280101018910-e280101018910, 2021.

DI MONACO, R. et al. Strategies to reduce sugars in food. **Current opinion in food science**, v. 19, p. 92-97, 2018.

DUARTE, L. C. al. Aplicações de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e sistema de energia dispersiva (EDS) no estudo de gemas exemplos brasileiros. **Pesquisas em Geociências**. Porto Alegre, RS. v. 30, n. 2, p. 3-15, 2003.

DURCO, B. B. et al. Influence of different levels of ethnocentrism of the Brazilian consumer on the choice of dulce de leche from different countries of origin. **Food Research International**, v. 148, p. 110624, 2021.

ERBERSDOBLER, H. F.; SOMOZA, V. Forty years of furosine—Forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods. **Molecular nutrition & food research**, v. 51, n. 4, p. 423-430, 2007.

FERNÁNDEZ GARCÍA, B. et al. Atomic absorpton spectrometry| fundamentals, instrumentation and capabilities. **Encyclopedia of analytical Science**. En P. Worsfold, 2018. p. 137-143.

FENNEMA, O. R.; SRINIVASAN D.; KIRK, L. P. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

FERREIRA, L. O. Avaliação das características de qualidade de doces de leite comerciais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 387, p. 05-11, 2012.

FERREIRA, V. F. et al. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, p. 623-638, 2009.

FERREIRA, V. L. P. et al. Cor de doce de leite pastoso. **Colet. Inst. Tecnol. Alimentos**, p. 134-43, 1989.

FERRER-ERES, M. A. et al. Archaeopolymetallurgical study of materials from an Iberian culture site in Spain by scanning electron microscopy with X-ray microanalysis, chemometrics and image analysis. **Microchemical Journal**, v. 95, n. 2, p. 298-305, 2010.

FERRER, E. et al. High-performance liquid chromatographic determination of Maillard compounds in store-brand and namebrand ultra-high-temperature-treated cows' milk. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 599-606, 2000.

FLYNN, A. Minerals and trace elements in milk. **Advances in food and nutrition research**, v. 36, p. 209-252, 1992.

FLYNN, A.; CASHMAN, K. Nutritional aspects of minerals in bovine and human milk. In Fox PF (ed): **“Advanced Dairy Chemistry: Lactose, Water, Salts and Vitamins,”** v. 3, 2. ed. London: Chapman & Hall, p 257–302, 1997.

FRANCISQUINI, J. d'A. et al. Formação de 5-hidroxiacetilfurfural e mudança de cor em doce de leite hidrolisado com lactose. **Journal of Dairy Research**, v. 86, n. 4, p. 477-482, 2019.

FRANCISQUINI, J. d'A. et al. Physico-chemical and compositional analyses and 5-hydroxymethylfurfural concentration as indicators of thermal treatment intensity in experimental dulce de leche. **Journal of Dairy Research**, v. 85, n. 4, p. 476-481, 2018.

FRANCISQUINI, J. d'A. et al. Reação de Maillard: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 1, p. 48-57, 2017.

FRANCISQUINI, J. D'A. et al. Avaliação da intensidade da reação de Maillard, de atributos físico-químicos e análise de textura em doce de leite. **Revista Ceres**, v. 63, n. 5, p. 589-596, 2016.

FOX, P. F. et al. Salts of milk. In: **Dairy chemistry and biochemistry**. Springer, 2015.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. Springer, 1998.

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

GAUCHERON, F. Milk and dairy products: a unique micronutrient combination. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 30, n. 5, p. 400S-409S, 2011.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, n. 4, p. 473-483, 2005.

GAZE, L. V. et al. Dulce de Leche, a typical product of Latin America: Characterisation by physicochemical, optical and instrumental methods. **Food Chemistry**, v. 169, p. 471-477, 2015.

GIKA, H. et al. **Chromatography-High Performance Liquid Chromatography**. Aristotle University of Thessaloniki, 2015.

GÖKMEN, V.; MORALES, F. J. **Processing contaminants: hydroxymethylfurfural**. Elsevier, 2014.

GONÇALVES, G. R. F. et al. Caracterização físico-química do doce de leite em barra com diferentes concentrações de líquido de cacau. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.16, n. 1, p. 27-32, 2014.

GUIMARÃES, I. C. O. et al. Development and description of light functional dulce de leche with coffee. **Ciênc. agrotec.**, v. 36, n. 2, p. 195 -203, 2012.

HILL, S. J.; FISHER, A. S. Atomic absorption, methods and instrumentation. **Encyclopedia of analytical science**, 2017.

IAL, INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3. ed. São Paulo: Imesp, v. 1, 2008.

IMPERIALE, S. et al. Fast Detection of 5-Hydroxymethylfurfural in Dulce de Leche by SPE-LC-MS. **Food Analytical Methods**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2022.

INOVALEITE. Innovadoce 2022. Disponível em: <https://www.inovaleite.com/innovadoce>. Acesso em 22 de Janeiro de 2023.

IVANOVA, E. H. **Atomic Absorption Spectrometry: Principles and Instrumentation**. 2005.

ISMAIL, A. F. et al. RO membrane characterization. **Reverse Osmosis; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands**, p. 57-90, 2019.

ISO, International Organization for Standardization.

IVANOV, K. et al. Scanning electron microscopy and X-ray diffraction in the determination of macroelements in soil and plants. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 50, n. 7, p. 878–893, 2019.

JOHNSON, G. H. (2010): Sodium, Ph.D. Disponível em: <http://jn.nutrition.org/nutinfo/content/sodi.shtml>. Acesso em 01 de Julho de 2022.

JUNIOR, J. B. P. et al. Determinação direta de Ca, Mg, Mn e Zn em amostras de leite de búfala da ilha de Marajó por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). **Química Nova**, v. 32, p. 2333-2335, 2009.

KORIFI, R. et al. CIEL\* a\* b\* color space predictive models for colorimetry devices - Analysis of perfume quality. **Talanta**, v. 104, p. 58-66, 2013.

LACOURSE, M. E.; LACOURSE, W. R. General instrumentation in HPLC. In: **Liquid Chromatography**. Elsevier, 2017. p. 417-429.

LEDDOMADO, L. S. et al. Technological benefits of using inulin and xylooligosaccharide in dulce de leche. **Food Hydrocolloids**, v. 110, p. 106158, 2021.

LIMA, P. C. et al. Obtaining and characterizing “dulce de leche” prepared with sheep’s and cow’s milk in different proportions. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 4, p. 832-837, 2020.

LUCEY, J. A.; HORNE, D. S. Milk salts: Technological significance. In: **Advanced Dairy Chemistry: Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents**. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 297-338.

LUKASKI, H. C. Vitamin and mineral status: effects on physical performance. **Nutrition**, v. 20, n. 7-8, p. 632-644, 2004.

LUND, M. N.; RAY, C. A. Control of Maillard reactions in foods: Strategies and chemical mechanisms. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 23, p. 4537-4552, 2017.

LUND, P. 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, 2022.

MAJORS, R.E. Column Technology for Modern High Performance Liquid Chromatography (HPLC). In: **Liquid Chromatography**. Elsevier, 2019.

MATTAROZZI, M. et al. ESEM-EDS-based analytical approach to assess nanoparticles for food safety and environmental control. **Talanta**, v. 196, p. 429-435, 2019.

MANHANI, T. M. et al. Sacarose, suas propriedades e os novos edulcorantes. **Revista Brasileira Multidisciplinar-ReBraM**, v. 17, n. 1, p. 113-125, 2014.

MARTINS, F. C. et al. The role of 5-hydroxymethylfurfural in food and recent advances in analytical methods. **Food Chemistry**, v. 395, p. 133539, 2022.

MCCARTHY, William P. et al. Energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry as a tool for the rapid determination of the five major minerals (Na, Mg, K, P and Ca) in skim milk powder. **International Journal of Dairy Technology**, v. 73, n. 2, p. 459-467, 2020.

MEKMENE, O.; LE GRAËT, Y.; GAUCHERON, F. A model for predicting salt equilibria in milk and mineral-enriched milks. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 233-239, 2009.

MEHTA, B. M.; DEETH, H. C. Blocked lysine in dairy products: formation, occurrence, analysis, and nutritional implications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 206-218, 2016.

MILAGRES, M. et al. Análise físico-química e sensorial de doce de leite produzido sem adição de sacarose. **Rev. Ceres**, v. 57, n. 4, p. 439-445, 2010.

MOREIRA, K. M. M. et al. Produção de doce de leite com teor reduzido de lactose por  $\beta$ -galactosidase. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, v. 7, n. 4, p. 375-382, 2009.

MORETTI, L. et al. Statistical analyses of SEM-EDS results to predict the quantity of added quicklime in a treated clayey soil. **Construction and Building Materials**, v. 253, p. 118852, 2020.

MORITA, M. Scanning Electron Microscope Energy Dispersive X-Ray Spectrometry. In: **Compendium of Surface and Interface Analysis**. Springer, Singapore, 2018. p. 557-561.

MOHAPATRA, D. et al. Postharvest hardness and color evolution of white button mushrooms (*Agaricus bisporus*). **Journal of food science**, v. 75, n. 3, p. E146-E152, 2010.

NETTO, G. G. et al. The effect of induced crystallization of lactose on dulce de leche properties. **European Food Research and Technology**, v. 249, n. 2, p. 283-294, 2023.

NEWTON, A. E. et al. The role of the Maillard reaction in the formation of flavour compounds in dairy products—not only a deleterious reaction but also a rich source of flavour compounds. **Food & Function**, v. 3, n. 12, p. 1231-1241, 2012.

NGO, P. D. Energy dispersive spectroscopy. In: **Failure Analysis of Integrated Circuits**. Springer, Boston, MA, 1999. p. 205-215.

NOOSHKAM, M.; VARIDI, M.; BASHASH, M. The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems. **Food chemistry**, v. 275, p. 644-660, 2019.

ORDOÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de Alimentos: componentes dos alimentos e processos**. V. 1. Porto Alegre: Artmed, 2005.

OLIVEIRA, M. N. et al. Garcia. Production of evaporated milk, sweetened condensed milk and ‘Dulce de Leche’. **Dairy powders and concentrated products**, p. 149-179, 2009.

PAULETTI, M. S. et al. Color y textura del dulce de leche. Selección de métodos instrumentales para el control de calidad industrial. **Revista Española de Ciencia y Tecnología Alimentaria**, Valencia, v. 32, n. 3, p. 291-305, 1992.

PADOVANI, R. M. et al. Dietary reference intakes: application of tables in nutritional studies. **REVISTA DE NUTRICAÇÃO-CAMPINAS**, v. 19, n. 6, p. 741, 2006.

PAPACHRISTODOULOU, C. et al. Determination of minerals in infant milk formulae by energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 72, p. 39-47, 2018.

PASSOS, F. R. et al. Avaliação da qualidade de marcas comerciais de doce de leite pastoso comercializados na região do Alto Paranaíba/MG. **Magistra**, v. 25, n. 3-4, p. 251-259, 2013.

PEREIRA, J. P. F. et al. Determinação da composição, partição e bioacessibilidade de cálcio em queijos Minas Padrão comerciais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 73, n. 4, p. 226-234, 2018.

PERRONE, I. T. et al. **Doce de leite: Química e Tecnologia**, CAP-LAB, São Paulo, 2019.

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

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

PRATA, R. et al. Simultaneous determination of furfural, 5-hydroxymethylfurfural and 4-hydroxy-2, 5-dimethyl-3 (2H)-furanone in baby foods available in the Brazilian market. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 99, p. 103874, 2021.

POINTILLART, A., GUÉGUEN, L. Intérêts nutritionnels du calcium et du phosphore des produits laitiers. In Gaucheron F (ed): “**Minéraux et Produits Laitiers**”. Paris: Tec et Doc, 2004. p 703-738.

RANALLI, N. et al. Physicochemical and rheological characterization of “dulce de leche”. **Journal of Texture Studies**, v. 43, n. 2, p. 115-123, 2012.

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

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

SHARMA, V.; BHARDWAJ, A. Scanning electron microscopy (SEM) in food quality evaluation. In: **Evaluation Technologies for Food Quality**. Woodhead Publishing, 2019. p. 743-761.

SILVA, A. C. **Desenvolvimento de doce de leite sem adição de sacarose e sem lactose**. 2016. Dissertação (Mestrado Profissional Ciência e Tec. do Leite e Derivados) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2016.

SILVA, R. et al. Dulce de leche submitted to ohmic heating treatment: Consumer sensory profile using preferred attribute elicitation (PAE) and temporal check-all-that-apply (TCATA). **Food Research International**, v. 134, p. 109217, 2020.

SILVA, T. A. R. et al. Desenvolvimento de doce de leite pastoso light com ou sem hidrólise da lactose. **Tecnolat – Centro de Tecnologia de Laticínios**. ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2009.

SMIT, G. **Dairy processing: improving quality**. Elsevier, 2003.

STEPHANI, R. et al. Dulce de Leche - Chemistry and Processing Technology. In: **Milk Production, Processing and Marketing**. IntechOpen, 2019.

SOARES, V. A. et al. Determination of nutritional and toxic elements in pasteurized bovine milk from Vale do Paraíba region (Brazil). **Food Control**, v. 21, n. 1, p. 45-49, 2010.

SOUZA, A. B. **Avaliação da influência tecnológica da relação soro-proteína/caseínas durante condições simuladas de processamento térmico**. 2013. Dissertação (Mestrado Profissional em Leite e Derivados) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

TACO, Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Campinas – SP. 2011.

TURCATEL, L. C. et al. Que doce de leite é esse? Uma discussão sobre o padrão de identidade e qualidade do doce de leite pastoso. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 3, p. 302-308, 2014.

VAHČIĆ, N. et al. Essential minerals in milk and their daily intake through milk consumption. **Mljekarstvo/Dairy**, v. 60, n. 2, 2010.

VARGAS, M. O. et al. Dulce de leche: product types, production processes, quality aspects and innovations minor EDITS. **International Journal of Dairy Technology**, v. 74, n. 2, p. 262-276, 2021.

VIEIRA, M. E. M. et al. Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) acoplada ao microscópio eletrônico de varredura (MEV): fundamentos e aplicações em produtos lácteos. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e262101018622-e262101018622, 2021.

WALSTRA, P. et al. **Dairy science and technology**. CRC press, 2006.

ZENG, X. et al. Char burnout characteristics of five coals below and above ash flow temperature: TG, SEM, and EDS analysis. **Applied Thermal Engineering**, v. 103, p. 1156-1163, 2016.