

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

Gabriel Pereira Portes Cerqueira

**Influência do tratamento térmico e do pH na produção do doce de leite:
determinação de 5-hidroximetilfurfural (HMF) livre e desenvolvido**

Juiz de Fora
2025

Gabriel Pereira Portes Cerqueira

**Influência do tratamento térmico e do pH na produção do doce de leite:
determinação de 5-hidroximetilfurfural (HMF) livre e desenvolvido**

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.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Stephani

Juiz de Fora
2025

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

Cerqueira, Gabriel Pereira Portes.

Influência do tratamento térmico e do pH na produção do doce de leite : determinação de 5-hidroximetilfurfural (HMF) livre e desenvolvido / Gabriel Pereira Portes Cerqueira. -- 2025.
64 f.

Orientador: Rodrigo Stephani

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2025.

1. Doce de leite. 2. Tratamento térmico. 3. Reação de Maillard. 4. 5-hidroximetilfurfural (HMF). I. Stephani, Rodrigo, orient. II. Título.

Gabriel Pereira Portes Cerqueira

Influência do tratamento térmico e do pH na produção do doce de leite: determinação de 5-hidroximetilfurfural (HMF) livre e desenvolvido

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: Química.

Aprovada em 30 de julho de 2025.

BANCA EXAMINADORA

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

Dra. Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá
ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos

Prof. Dr. Alexandre Cuin
Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 25/07/2025.



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Stephani, Professor(a)**, em 30/07/2025, às 15:38, 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 **Alexandre Cuin, Professor(a)**, em



30/07/2025, às 15:38, 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 **Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá, Usuário Externo**, em 30/07/2025, às 16:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2518887** e o código CRC **68172543**.

Dedico este trabalho à minha família,
amigos e àqueles que sempre me
apoiaram nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à minha mãe, pelo carinho, pela presença constante e por todo o apoio incondicional ao longo dos anos. Tudo com você fica mais fácil. Te amo. Ao meu pai (*in memoriam*), dedico um agradecimento especial por todos os momentos que compartilhamos, pelos ensinamentos que carrego comigo e pelo amor que permanece vivo na memória e no coração.

Aos meus irmãos, mesmo à distância, agradeço por estarem sempre presentes com palavras de incentivo, conselhos, risos e apoio nas mais diversas formas. À minha família, tios, tias e primos, expresso minha gratidão pela união que sempre nos fortaleceu e por acreditarem no meu caminho, mesmo nos momentos mais desafiadores.

À minha namorada, Júlia, meu mais profundo agradecimento por sua presença, mesmo quando à distância, pelos incentivos, pela compreensão nos momentos difíceis, por me manter focado e por compartilhar sonhos comigo. Sua parceria foi essencial em todas as fases deste percurso.

Aos amigos que a vida acadêmica me deu, Arthur Velasco, Luiz Felipe Cantarino, Fillipe Caitano, Luiza Conforte, Larissa Silva e Mateus Moura, obrigado pela amizade, pela cumplicidade e por todas as experiências que compartilhamos. Aos amigos de longa data, José Augusto Brancato, Alexandre Bravin, Juliano Brant, Pedro Dode e Igor Nagen, sou grato por estarem sempre ao meu lado, acompanhando e apoiando minha trajetória.

Agradeço, de maneira especial, ao meu orientador, professor Rodrigo Stephani, por sua orientação generosa, pelos ensinamentos técnicos e humanos, e por acreditar no meu potencial desde o início. Sua confiança e dedicação foram determinantes para meu crescimento pessoal e profissional. Estendo meus agradecimentos à professora Juliana Costa e ao professor Ítalo Perrone pelas contribuições valiosas ao longo desta jornada.

Aos amigos do Laboratório Bioquimtec, minha sincera gratidão pelo companheirismo, apoio e troca de conhecimentos, que tornaram o dia a dia da pesquisa mais leve e motivador. Em especial, agradeço à Caroline Barroso, Vitória Souza, Monisa Gouvêa, Igor Lima, Paola Lazzarini e Natália Alves, por tornarem a rotina do laboratório mais divertida e acolhedora.

Aos docentes e técnicos do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, agradeço pela formação sólida, pelo suporte e pelo ambiente acadêmico que contribuíram para minha formação.

Por fim, agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo financiamento que tornou este trabalho possível, bem como à Universidade Federal de Juiz de Fora, por acolher e promover a pesquisa científica de qualidade.

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

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos do tratamento térmico e do pH na produção de doce de leite, com ênfase na formação de compostos derivados da Reação de Maillard e nas propriedades físico-químicas e reológicas do produto final. Foram elaboradas formulações submetidas a diferentes tempos de aquecimento (0 a 55 minutos a 121,1 °C), sendo os respectivos valores de F_0 calculados para cada tratamento. O HMF (5-hidroximetilfurfural), principal marcador da Reação de Maillard, foi avaliado em duas formas: HMF livre, diretamente quantificado por HPLC nas amostras recém-produzidas, e HMF desenvolvido, obtido por reaquecimento das amostras a 90 °C por até 3 horas. As análises demonstraram que o HMF livre segue uma tendência de formação exponencial com o aumento do F_0 , até atingir um patamar estacionário. A avaliação do HMF desenvolvido revelou que ainda há potencial expressivo de formação adicional do composto, mesmo após o processamento térmico, justificando o uso do termo “desenvolvido” em substituição ao tradicional “total”. Paralelamente, os dados físico-químicos revelaram que o tratamento térmico influenciou diretamente a queda do pH, o aumento da acidez titulável e a liberação de cálcio iônico para a fase solúvel, demonstrando desestruturação das micelas de caseína sob condições mais intensas de aquecimento. Os parâmetros de cor, avaliados por colorimetria CIE-Lab e espectrofotometria UV-Vis, mostraram escurecimento progressivo relacionado à formação de melanoidinas, sendo esse efeito mais pronunciado durante o processamento do que ao longo do *shelf life*. Por fim, as análises reológicas ajustadas ao modelo de *Herschel-Bulkley* confirmaram o comportamento pseudoplástico dos doces, sendo que os produtos mais aquecidos apresentaram maior tensão de escoamento, maior consistência e menor índice de fluxo, com variações na viscosidade aparente indicativas de mudanças estruturais relevantes. Os resultados obtidos oferecem uma contribuição relevante para a compreensão dos efeitos térmicos sobre a qualidade do doce de leite, propondo uma nova abordagem conceitual para avaliação do HMF em alimentos processados termicamente.

Palavras-chave: Doce de leite; HMF; Tratamento térmico; Reação de Maillard; Propriedades físico-químicas.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the effects of thermal treatment and pH on the production of dulce de leche, with a focus on the formation of compounds derived from the Maillard Reaction and on the physicochemical and rheological properties of the final product. Formulations were prepared and subjected to different heating times (0 to 55 minutes at 121.1 °C), with F_0 values calculated for each treatment. HMF (5-hydroxymethylfurfural), the main marker of the Maillard Reaction, was evaluated in two forms: free HMF, directly quantified by HPLC in freshly produced samples, and developed HMF, obtained by reheating the samples at 90 °C for up to 3 hours. The analyses showed that free HMF follows an exponential formation trend with increasing F_0 , reaching a stationary phase. The evaluation of developed HMF revealed that there is still significant potential for further formation of this compound even after thermal processing, which supports the use of the term “developed” instead of the traditional “total.” Additionally, physicochemical data indicated that thermal treatment directly influenced the reduction in pH, the increase in titratable acidity, and the release of ionic calcium into the soluble phase, demonstrating the disintegration of casein micelles under more intense heating conditions. Color parameters, evaluated by CIE-Lab colorimetry and UV-Vis spectrophotometry, showed progressive darkening related to the formation of melanoidins, with this effect being more pronounced during processing than throughout shelf life. Finally, rheological analyses fitted to the Herschel-Bulkley model confirmed the pseudoplastic behavior of the samples, with the most intensely heated products exhibiting higher yield stress, greater consistency, and lower flow behavior index, with variations in apparent viscosity suggesting relevant structural changes. The results provide valuable insight into the thermal effects on dulce de leche quality and propose a new conceptual approach for evaluating HMF in thermally processed foods.

Keywords: *Dulce de leche*; HMF; thermal treatment; Maillard Reaction; physicochemical properties.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática adaptada da proposta de Hodge (1953) sobre os mecanismos envolvidos na Reação de Maillard	19
Figura 2 - Estrutura química do 5-hidroximetilfurfural (HMF).....	20
Figura 3 - Desenho experimental do projeto.	24
Figura 4 - Doces de leite produzidos, a partir do leite condensado integral, com a mesma composição centesimal, a 121,1°C, mas com tempo de exposição ao aquecimento diferente.	35
Figura 5 - Parâmetros Físico-Químicos ao longo do Shelf Life (n = 3).....	39
Figura 6 - Cromatograma dos padrões dos indicadores da Reação de Maillard.....	40
Figura 7 - Formação de HMF livre em três estágios de F0.	42
Figura 8 – Valores de HMF desenvolvido para os diferentes tratamentos térmicos durante o shelf life.	47
Figura 9 - Doces de leite produzidos a 121,1 °C em autoclave com diferentes tratamentos térmicos.	49
Figura 10 – Luminosidade (L) em função do tratamento térmico representado por F0 (min) (n = 3).....	51
Figura 11– Valores de absorbância por grama de proteína para o DL em função do tratamento térmico representado por F0 (min).	52
Figura 12 – Tensão de cisalhamento do doce de leite (Pa) com base na taxa de cisalhamento variando de 100 s ⁻¹ a 0,1 s ⁻¹ , a 25 °C.	55
Figura 13 - Viscosidade aparente do doce de leite (Pa.s) baseada na taxa de cisalhamento descendente de 100 s ⁻¹ a 0,1 s ⁻¹ , a 25 °C.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Modo de eluição gradiente para a determinação dos indicadores da Reação de Maillard.....	30
Tabela 2 - Análises composicionais do leite condensado integral.....	34
Tabela 3 - Resultados das análises físico-químicas dos doces de leite em diferentes tratamentos térmicos no dia 0 (D0) de <i>shelf life</i>	36
Tabela 4 - HMF livre ($\mu\text{mol.kg}^{-1}$) em função do tempo de produção, pH medido diretamente no DL e pH na solução 10% (m.m^{-1}) de doce ($n = 2$).....	41
Tabela 5 - Comparação da formação dos HMF livre nos diferentes dias de <i>shelf life</i> por HPLC (D0 – D107).	43
Tabela 6 - Máximo de consumo teórico diário recomendado de doce de leite em relação ao limite de ingestão diária de HMF (1,6 mg de HMF por pessoa por dia).	44
Tabela 7 - Valores de HMF desenvolvido após 1, 2 e 3 horas de aquecimento a 90 °C com ajuste de pH = 7 por HPLC ($n = 2$).	46
Tabela 8 - Valores de ΔHMF em mmol.kg^{-1} em diferentes dias de <i>shelf life</i>	48
Tabela 9 – Valores de Luminosidade (L), em função do <i>shelf life</i> ($n = 3$).....	50
Tabela 10 – Valores de absorvância (Abs) da fase solúveis, medidos em 420 nm, por grama de proteína para os DL produzidos ao longo do tempo de <i>shelf life</i> ($n = 2$).....	52
Tabela 11 - Parâmetros do modelo <i>Herschel-Bulkley</i> (taxa de cisalhamento descendente) registrados para os doces de leite.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°Brix	Índice de sólidos solúveis
a*	Parâmetro que varia de verde (-) a vermelho (+) para a colorimetria
b*	Parâmetro que varia de azul (-) a amarelo (+) para a colorimetria
D0	Dia 0 após a fabricação
D107	Dia 107 após a fabricação
D15	Dia 15 após a fabricação
D30	Dia 30 após a fabricação
D60	Dia 60 após a fabricação
DL	Doce de Leite
F	2-Furaldeído
FMC	2-furil-metilcetona
HMF	5-hidroximetilfurfural
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
ISO	International Organization for Standardization
L	Parâmetro de luminosidade da colorimetria
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MF	5-metilfurfural
PDA	Photodiode Array Detector
pH	Potencial hidrogeniônico
RM	Reação de Maillard
RMF	Resíduo mineral fixo
UV-Vis	Ultravioleta Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	MODO DE PRODUÇÃO E TRATAMENTO TÉRMICO	16
1.2	REAÇÃO DE MAILLARD	17
1.3	5-Hidroximetilfurfural livre e desenvolvido	20
1.4	Técnicas analíticas aplicadas à detecção de intermediários da Reação de Maillard	21
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	METODOLOGIA	24
3.1	PREPARO DOS DOCES DE LEITE	25
3.2	CARACTERIZAÇÃO DO LEITE CONDENSADO INTEGRAL	25
3.2.1	Umidade	25
3.2.2	Índice de sólidos solúveis	26
3.2.3	Gordura	26
3.2.4	Proteína	26
3.2.5	Resíduo mineral fixo (RMF)	27
3.3	CÁLCULO DO F_0	27
3.4	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	28
3.4.1	Potencial hidrogeniônico	28
3.4.2	Acidez titulável	28
3.4.3	Cálcio iônico livre	29
3.5	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	29
3.5.1	Parâmetros cromatográficos	29
3.5.2	Reagentes	30
3.5.3	Preparo de amostra: 5-hidroximetilfurfural livre e desenvolvido	30
3.6	PARÂMETROS DE COR.....	31
3.6.1	Determinação da cor	31
3.6.2	Espectrofotômetro UV-vis	31
3.7	COMPORTAMENTO REOLÓGICO	32
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
4.1	DOCES DE LEITE PRODUZIDOS: ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E F_0	35
4.2	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS AO LONGO DO <i>SHELF LIFE</i>	37
4.3	QUANTIFICAÇÃO DOS MARCADORES DA REAÇÃO DE MAILLARD POR HPLC	39

4.3.1	Formação de HMF livre em função do tratamento térmico e <i>shelf life</i>	40
4.3.2	Formação de HMF desenvolvido em função do tratamento térmico e <i>shelf life</i>	45
4.4	PARÂMETROS DE COR.....	48
4.4.1	Determinação da cor por colorimetria CIE-Lab.....	49
4.4.2	Absorbância.....	51
4.5	REOLOGIA.....	53
5	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

O doce de leite (DL) é um produto tradicionalmente consumido em diversos países da América Latina, com destaque para o Brasil, Argentina e Uruguai, que desempenha um papel significativo tanto na cultura alimentar quanto na indústria de laticínios (Francisquini *et. al.*, 2019). No contexto brasileiro, a produção desse alimento é, em sua maioria, realizada em pequena escala industrial ou de forma artesanal, refletindo a diversidade regional do país. Em razão da vasta extensão territorial e da riqueza cultural do Brasil, o DL não apresenta uma identidade padronizada em âmbito nacional. As preferências variam amplamente, quanto ao sabor, cor e textura, evidenciando a influência de fatores locais no modo de produção e consumo (Gomes *et. al.*, 2020).

Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), divulgados no relatório Brasil *Dairy Trends 2020*, a produção de DL inspecionada pelo Sistema de Inspeção Federal (SIF) concentra-se predominantemente nas regiões Sudeste (62,1%) e Sul (33,3%) do país, sendo o estado de Minas Gerais responsável por aproximadamente 58,1% da produção nacional (Gomes *et. al.*, 2020). Tais dados reforçam a relevância econômica e cultural do produto nessas regiões.

De acordo com o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Doce de Leite aprovado pela Portaria nº 354, de 4 de setembro de 1997, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), “entende-se por doce de leite o produto, com ou sem adição de outras substâncias alimentícias, obtido por concentração e ação do calor à 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)” (Brasil, 1997).

Quimicamente, o DL é definido como uma mistura de leite, sacarose e bicarbonato de sódio que atua como redutor de acidez, evitando a precipitação de proteínas e favorecendo a ocorrência da Reação de Maillard (RM). Assim como o leite condensado, leite evaporado, leite em pó e soro de leite em pó, o DL passa por um processo de evaporação. Esse processo consiste na remoção da água do leite sob pressão atmosférica ou reduzida, com transferência de energia na forma de calor (Stephani *et al.*, 2019). Portanto, há formas diferentes para produzir o DL, fazendo com

que o tratamento térmico e a escolha do método de produção, sejam responsáveis pelas características finais do produto desejado (Pinto *et al.*, 2025).

1.1 MODO DE PRODUÇÃO E TRATAMENTO TÉRMICO

O processo de fabricação do DL tem início com a mistura de leite, sacarose e bicarbonato de sódio. Em seguida, essa mistura é submetida à etapa de evaporação, na qual ocorre a remoção da água por meio do fornecimento de energia térmica, sob pressão atmosférica ou reduzida, até que se atinja um teor de sólidos solúveis entre 68 e 70 °Brix (Carneiro *et al.*, 2021). Embora a formulação do produto envolva poucos ingredientes e aditivos, as características finais do DL podem variar significativamente em função da tecnologia empregada. Dessa forma, o controle rigoroso de parâmetros como tempo, intensidade do aquecimento e pressão é fundamental para assegurar a padronização e a qualidade do produto (Gaze *et al.*, 2015; Ranalli, Andrés & Califano, 2011).

O DL pode ser produzido com tempos de concentração variando entre 30 minutos e 6 horas utilizando o mesmo volume de leite, o que diferencia é o tipo de equipamento utilizado por cada empresa. A maioria dos fabricantes utiliza dois tipos de evaporadores na sua cadeia de produção, o evaporador de pressão atmosférica, também conhecido como tacho, e o evaporador de pressão reduzida, conhecido na indústria como evaporador a vácuo e posteriormente um sistema de aquecimento (Pinto *et al.*, 2025).

Com os diferentes métodos de produção, não há um processo padronizado para a fabricação de DL, e essa variabilidade é, sem dúvida, uma das principais razões para a ampla diversidade de produtos disponíveis, mesmo com ingredientes obrigatórios bem definidos (Perrone *et al.*, 2019).

Um dos métodos empregados na produção de DL é a fabricação com concentração em evaporador e finalização por calor indireto em ambiente fechado. Esta etapa inicial de evaporação é a mesma utilizada para a fabricação do leite condensado (Stephani, 2023). Sendo assim, esse processo pode ser adotado tanto em contextos industriais quanto em preparações artesanais. Neste último caso, é frequente o uso de panela de pressão para o cozimento do leite condensado, uma vez que este já apresenta os ingredientes na sua forma concentrada, promovendo sua

caramelização e resultando em um DL com características que variam dependendo do tempo de cozimento.

Com este método de produção, por se tratar de um ambiente fechado e não acontecer a perda de água, é possível usar a representação de F_0 para se definir o tratamento térmico utilizado sobre o produto.

O conceito de F_0 é utilizado como uma forma padronizada de quantificar a intensidade de um tratamento térmico (Bylund, 2015). Ele expressa o tempo, em minutos, necessário para atingir um determinado efeito de letalidade microbiana, quando o produto é exposto a uma temperatura de referência de 121,1 °C (Pistolesi, Mascherpa, 2015). Apesar de ser uma medida para a contagem de letalidade de microrganismos, é também reportado na literatura a sua utilização para a intensidade do tratamento térmico em produtos lácteos, mas não há indícios na literatura de sua utilização para a produção do DL (Bylund, 2015).

O F_0 combina o tempo em minutos e a temperatura de exposição, para garantir a esterilização sem comprometer as propriedades organolépticas do alimento (Pistolesi, Mascherpa, 2015). Por exemplo, um F_0 de 1 minuto significa manter o produto a 121,1 °C, o que resulta em uma redução de 4 log da quantidade de esporos de *Clostridium botulinum*. Assim, pode-se utilizar o conceito do F_0 para realizar o monitoramento do tratamento térmico indiretamente no produto. A aplicação de temperaturas elevadas por um tempo controlado, permite alcançar o F_0 adequado, destruindo os microrganismos além de não favorecer um escurecimento excessivo devido à RM.

1.2 REAÇÃO DE MAILLARD

A Reação de Maillard foi descrita pela primeira vez em 1912 como um processo químico complexo que envolve a interação entre açúcares redutores e grupamentos amina presentes em aminoácidos, peptídeos e proteínas, sob condições específicas de pH, temperatura e atividade de água (Starowicz & Zieliński, 2019). Essa reação desempenha um papel crucial na formação de características sensoriais dos alimentos, como cor, sabor, aroma e textura (Carneiro *et. at.*, 2021). Entretanto, seus produtos também podem impactar negativamente no valor nutricional, uma vez que reduzem a digestibilidade de proteínas, promovem a degradação de aminoácidos

essenciais e originam compostos potencialmente tóxicos e inibidores (Damodaran; Parkin & Fennema, 2008; Nooshkam, Varidi & Bashash, 2019).

De acordo com Francisquini *et al.* (2017), a RM ocorre em três estágios distintos: inicial, intermediário e final. Na etapa inicial, ocorre o ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio da amina dos aminoácidos, peptídeos ou proteínas ao grupo carbonila do açúcar redutor, resultando na formação de uma base de Schiff. Essa base, ao perder uma molécula de água, origina a N-glicosilamina, que posteriormente se rearranja de acordo com a estrutura do açúcar redutor. Quando se trata de um açúcar com grupo aldose, forma-se o produto de Amadori; já no caso de uma cetose, obtém-se o produto de Heyns. Esses compostos iniciais são estáveis e não promovem alterações perceptíveis de cor, sabor, fluorescência ou toxicidade (Bertrand *et al.*, 2018; Francisquini *et al.*, 2017).

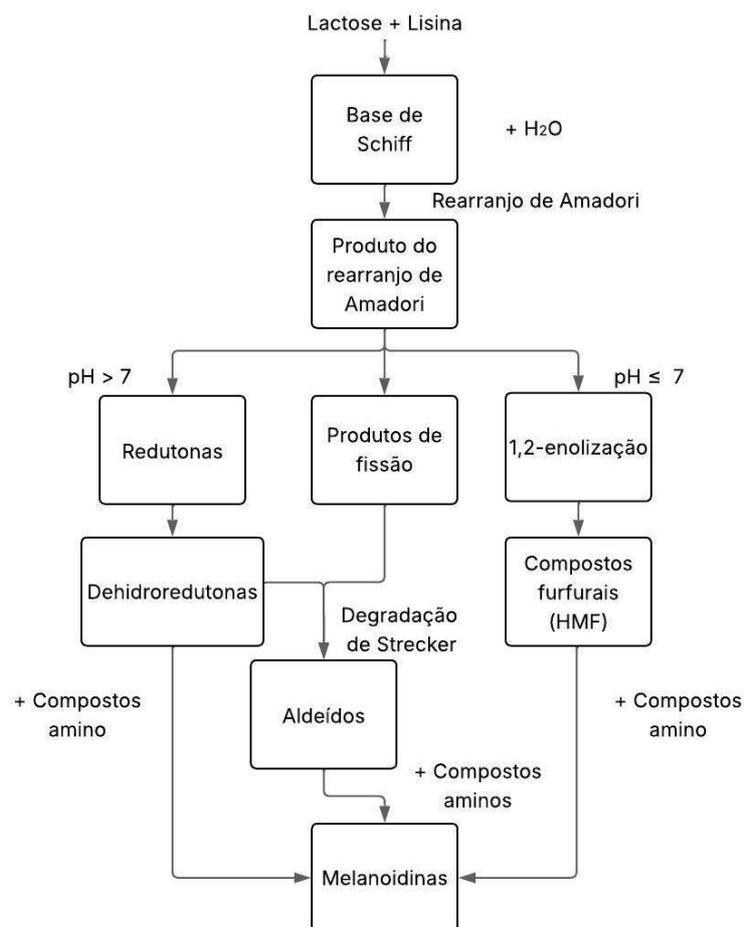
Na fase intermediária, os produtos de Amadori ou Heyns sofrem degradações distintas conforme o pH do meio. Em ambiente básico ($\text{pH} > 7,0$), a degradação se dá predominantemente pela via de 2,3-enolização, com perda de duas moléculas de água e formação de compostos dicarbonílicos e produtos da degradação de Strecker. Já em condições neutras ou ácidas ($\text{pH} < 7,0$), ocorre a 1,2-enolização, com eliminação de três moléculas de água e formação de compostos furfurais como 5-hidroximetilfurfural (HMF) (Bertrand *et al.*, 2018; Nooshkam *et al.*, 2019).

Por fim, na etapa final da RM, os intermediários formados anteriormente sofrem reações de polimerização, resultando na geração de melanoidinas — pigmentos poliméricos de alta massa molecular, que conferem coloração escura aos alimentos aquecidos, sendo amplamente associados ao escurecimento não enzimático dos produtos (Pinto & Wolfschon-Pombo, 1984; Bertrand *et al.*, 2018).

Há vários fatores que podem influenciar a velocidade da RM, incluindo a temperatura, o pH, a atividade de água (a_w), a reatividade dos açúcares e aminoácidos envolvidos e presença de inibidores (Damodaran *et al.* 2008). A cinética da RM é influenciada pela temperatura, em temperatura mais baixas a reação ocorre, mas com velocidade significativamente reduzida. Em contrapartida, em temperaturas mais altas a cada incremento de 10 °C na faixa entre 40 °C e 70 °C a velocidade da reação é duplicada (Damodaran *et al.* 2008). Isso explica o fato de a reação acontecer durante o aquecimento e armazenamento do produto. Além disso, a temperatura interfere na composição físico-química e na intensidade da coloração formada (Damodaran *et al.*, 2008; Francisquini *et al.*, 2017).

Outro parâmetro que exerce influência significativa sobre a cinética da RM é o potencial hidrogeniônico (pH), uma vez que altera a reatividade dos grupamentos amina. Na etapa inicial da reação, é necessário que o par de elétrons livres do nitrogênio do grupo amina esteja disponível para reagir com a carbonila do açúcar redutor (Carneiro *et. al.*, 2021). Em condições de pH ácido, a presença elevada de íons hidrogênio (H^+) leva à protonação do grupo amina, inibindo sua capacidade nucleofílica e dificultando o início da reação. Por outro lado, a RM é favorecida em meio alcalino, apresentando sua maior taxa de reação na faixa de pH entre 9 e 10 (Bertrand *et. al.*, 2018; Damodaran *et. al.*, 2008). A extensão da RM pode ser monitorada com base nos níveis dos intermediários formados ao longo da reação. Os intermediários mais utilizados para o monitoramento do tratamento térmico e o andamento da RM são os furfurais, principalmente o HMF (Francisquini *et al.*, 2019).

Figura 1 - Representação esquemática adaptada da proposta de Hodge (1953) sobre os mecanismos envolvidos na Reação de Maillard.

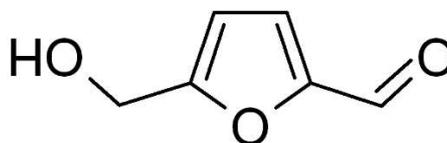


Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

1.35-HIDROXIMETILFURFURAL LIVRE E DESENVOLVIDO

O 5-hidroximetilfurfural (HMF) em sua forma pura, apresenta-se como um sólido cristalino branco, com baixo ponto de fusão (31,5 °C), sendo solúvel em água e em diversos solventes orgânicos. A molécula é composta por um anel furano contendo grupos funcionais aldeído e álcool (NCBI, 2005). Além disso, o HMF possui odor característico semelhante ao de flores de camomila e pode apresentar textura associada a manteiga, caramelo ou mesmo mofo. Sua densidade é de 1,2062 g.mL⁻¹ a 25 °C, e a pressão de vapor, também a 25 °C, é de $5,28 \times 10^{-3}$ mmHg, o que indica volatilidade relativamente baixa sob condições ambientais (NCBI, 2005). Essas propriedades físico-químicas são relevantes para a compreensão do comportamento do HMF em matrizes alimentares, especialmente no que diz respeito à sua formação, estabilidade e possível impacto sensorial e toxicológico.

Figura 2 - Estrutura química do 5-hidroximetilfurfural (HMF).



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Na literatura é reportado que o HMF pode interferir em funções biológicas, impactando o crescimento celular, digestão e absorção de proteínas, além de causar hipertrofia de órgãos e diminuir a atividade enzimática intestinal (Francisquini *et. al.*, 2019). Adicionalmente, a reação entre aminoácidos essenciais e açúcares redutores presentes nos alimentos pode acarretar perdas nutricionais significativas (Shibao & Bastos, 2011).

Estudos indicam que o HMF está correlacionado com atividades carcinogênicas e mutagênicas, tanto *in vitro* quanto em ensaios com animais (Monaro, 2012; Kavousi, *et. al.*, 2015). Além disso, esse composto apresenta propriedades citotóxicas e é irritante para os olhos, trato respiratório, pele e mucosas (Barrera, *et. al.*, 2021). Embora os estudos toxicológicos ainda não sejam definitivos, os possíveis riscos da ingestão de HMF na dieta destacam a importância de investigar sua presença nos alimentos (De Andrade, *et. al.*, 2016).

O HMF é praticamente inexistente em alimentos frescos, mas seu nível aumenta durante o armazenamento ou após tratamentos térmicos intensos (Barrera, *et. al.*, 2021). É possível a determinação de HMF livre e a de HMF desenvolvido em alimentos (Francisquini *et. al.*, 2017). De acordo com Pinto & Wolfschoon-Pombo (1984), considera-se HMF livre aquele determinado sem a presença de aquecimento, ou original do processamento, e o HMF desenvolvido corresponde àquela substância formada por resultado de aquecimento intenso. Os valores de HMF desenvolvido permitem estimar o quanto a reação de formação desse composto pode prosseguir (Pinto & Wolfschoon-Pombo, 1984).

Os fatores que influenciam a formação de HMF são os mesmos que influenciam a RM, incluem temperatura, pH, atividade de água, presença de cátions e o tipo de sacarídeo. A atividade de água (*aw*) diz respeito à fração de água livre disponível para participar de reações químicas, como a RM, sendo distinta do teor de umidade total do alimento (Madhumathy, S. 2021). O HMF pode ser facilmente detectado por espectrofotometria, sendo amplamente utilizado como indicador de exposição térmica intensa em alimentos (Carneiro *et. al.*, 2021).

1.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS À DETECÇÃO DE INTERMEDIÁRIOS DA REAÇÃO DE MAILLARD

Uma metodologia clássica amplamente utilizada para a determinação e quantificação de HMF em produtos lácteos é a técnica espectrofotométrica descrita por Kenney e Bassette (1958). O método baseia-se na extração do HMF em meio acidificado, após a desproteinização da amostra com ácido tricloroacético, seguida de filtração e reação com ácido tiobarbitúrico, que atua como reagente cromóforo. A quantificação é realizada por espectrofotometria no comprimento de onda de 443 nm. A concentração de HMF, expressa em $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, é obtida a partir da construção de uma curva analítica gerada pela correlação entre os diferentes níveis do padrão de HMF e os valores de absorvância correspondentes.

Apesar de ser um método bem definido, a técnica espectrofotométrica apresenta limitações em termos de seletividade e especificidade, especialmente em matrizes complexas como o DL. Por essa razão, métodos cromatográficos vêm sendo adotados em pesquisas mais recentes para a análise de compostos intermediários da RM. Um exemplo é o estudo desenvolvido por Pinto e colaboradores (2024), no qual

foi proposto e validado um método de extração e quantificação simultânea de 5-hidroximetilfurfural (HMF), 5-metil-2-furaldeído (MF), 2-furaldeído (F) e 2-furilmetilcetona (FMC) em amostras de DL, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de fotodiodos (HPLC-PDA). O método demonstrou alta sensibilidade, com limites de detecção e quantificação de $0,33 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,99 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, possibilitando a identificação e monitoramento preciso de diferentes marcadores da RM em produtos lácteos.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*) é uma técnica analítica consagrada por sua elevada precisão, sensibilidade e confiabilidade na separação, identificação e quantificação de compostos presentes em matrizes complexas, como os alimentos. A técnica baseia-se na interação entre duas fases: a fase estacionária, normalmente um material como sílica ou polímeros, e a fase móvel, que consiste em um solvente ou mistura de solventes bombeados sob alta pressão (Chavez-Servin *et. al.*, 2005).

O cromatógrafo é composto por um sistema de reservatórios da fase móvel, bombas de alta pressão, módulo de injeção da amostra, compartimento da coluna cromatográfica e um sistema de detecção, que pode empregar diferentes métodos, como detecção por UV-Vis, fluorescência ou espectrometria de massas, além de um sistema de aquisição e análise de dados por software especializado (Harris, 2008). À medida que a fase móvel percorre a coluna cromatográfica, os analitos presentes na amostra interagem de maneira seletiva com a fase estacionária. Substâncias mais polares tendem a interagir menos com colunas apolares, como as do tipo C18, sendo eluídas mais rapidamente; enquanto compostos apolares interagem mais fortemente, retardando seu tempo de retenção (Collins, 2009; Borges *et. al.*, 2010).

No contexto da ciência de alimentos, a aplicação da HPLC para a detecção de compostos furânicos, como o HMF, tem se mostrado fundamental no controle de qualidade. A capacidade da técnica em oferecer resultados com alta resolução e em curto intervalo de tempo a torna ideal para avaliar o impacto de tratamentos térmicos e o progresso da RM em alimentos, garantindo maior segurança e qualidade aos consumidores (Chavez-Servin *et. al.*, 2005).

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo avaliar a influência do tratamento térmico e do pH sobre a produção do doce de leite, com foco na formação de compostos derivados da Reação de Maillard e nas características físico-químicas do produto final.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

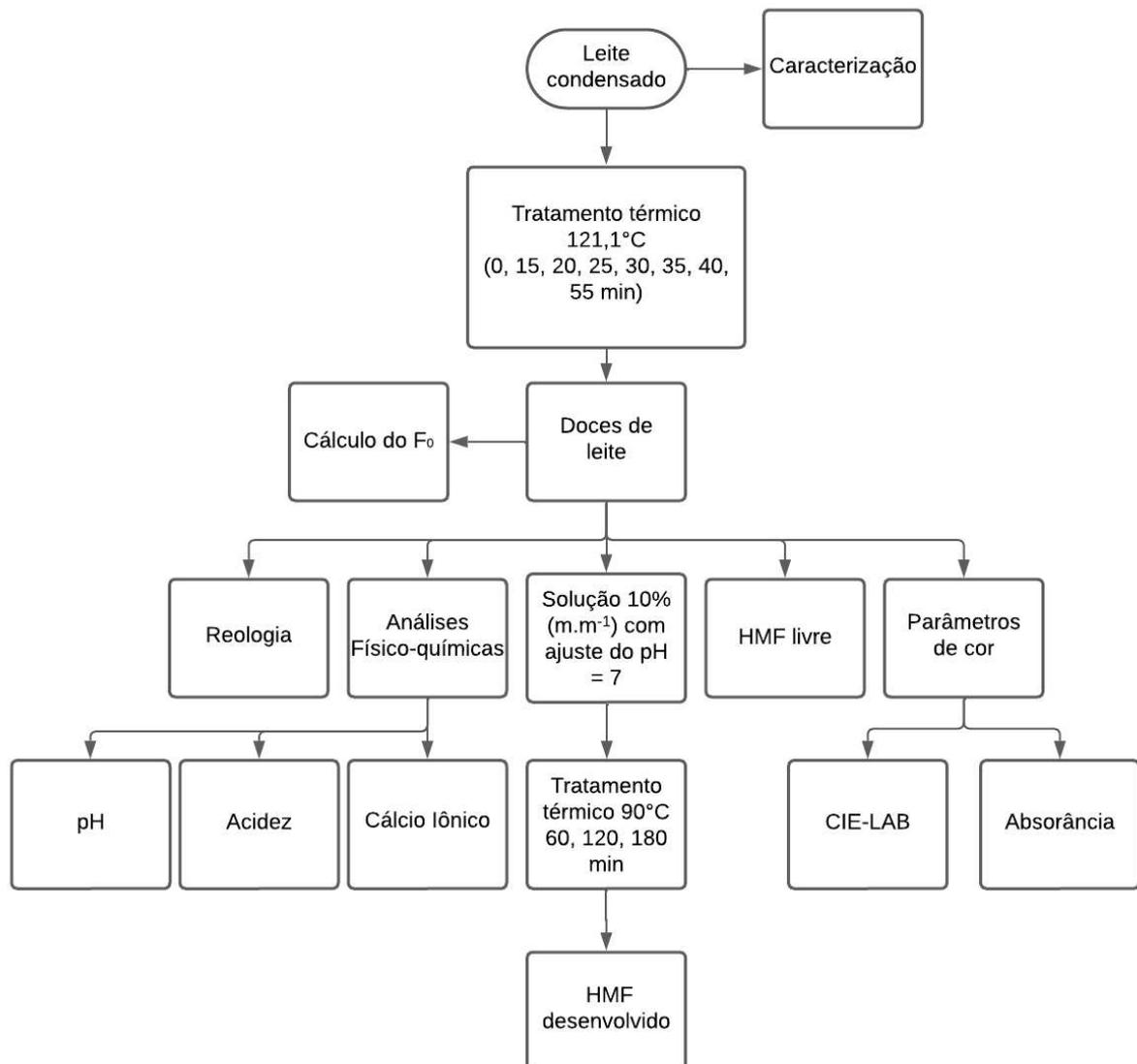
- a) Estudar a influência de diferentes tratamentos térmicos aplicados ao doce de leite produzido e calcular o F_0 para cada tratamento realizado;
- b) Avaliar a presença de HMF livre e HMF desenvolvido no doce de leite por HPLC;
- c) Estudar a influência do pH nos doces produzidos;
- d) Determinar a acidez total desenvolvida;
- e) Estudar a relação do cálcio com o tratamento térmico aplicado no doce de leite através das análises dos teores cálcio iônico;
- f) Analisar a variação da coloração dos doces de leite produzidos por colorimetria e espectrofotometria UV-Vis.

3 METODOLOGIA

Apresenta-se, a seguir, a metodologia adotada para a condução deste estudo, na qual abrange as seguintes etapas: preparo dos doces de leite a partir de leite condensado integral; caracterização da matéria-prima; determinação do valor de F_0 ; análises físico-químicas; análises cromatográficas; avaliação dos parâmetros de cor; comportamento reológico e aplicação de tratamento estatístico aos dados obtidos.

O desenho experimental do projeto pode ser visto através da Figura 3, em que é possível observar todas as etapas do projeto.

Figura 3 - Desenho experimental do projeto.



3.1 PREPARO DOS DOCES DE LEITE

Para a produção dos doces de leite, foi adotada uma matriz única, o leite condensado integral obtido no comércio de Juiz de Fora – Minas Gerais, na qual o único fator variável foi o tratamento térmico. A partir dessa matriz, foram aplicados 8 tratamentos térmicos distintos, com cada porção de leite condensado sendo aquecida separadamente em autoclave a 121,1°C. A nomenclatura utilizada para cada amostra seguia o tempo referente ao tratamento térmico na qual era exposta, sendo estes 0 (controle), 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 55 minutos.

Durante todo o processo, a temperatura foi monitorada com sensores apropriados para posteriormente utilizá-los para o cálculo de F_0 . Cinco lotes ($n = 5$) distintos de doces foram produzidos para que os mesmos testes fossem realizados em diferentes períodos de *shelf life*. Todas as amostras foram analisadas nos dias de *shelf life*: 0, 15 e 30, 60 e 107 após a produção do DL.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO LEITE CONDENSADO INTEGRAL

Apresenta-se, a seguir, as metodologias utilizadas para a caracterização da matéria prima (leite condensado integral) para a produção dos doces de leite. Deste estudo, a qual abrange as seguintes metodologias: Umidade, índice de sólidos solúveis, gordura, proteína e resíduo mineral fixo.

3.2.1 Umidade

A umidade do leite condensado integral foi determinada por meio de uma balança termogravimétrica com aquecimento por infravermelho, modelo MA 150 (Sartorius). O equipamento monitora a variação de massa em função da temperatura previamente programada. Para a análise, foi utilizada a temperatura de 145 °C, e o valor de umidade foi registrado quando a primeira variação de 0,05 g ou menor na perda de água fosse observada. A análise foi realizada em triplicata e seguindo a metodologia descrita por Silva; Sá; Perrone (2011).

3.2.2 Índice de sólidos solúveis

O índice de sólidos solúveis (°Brix) foi determinado por refratometria, utilizando-se um refratômetro digital HI96801 (Hanna). As amostras foram aplicadas diretamente no leitor do equipamento, e as medições foram realizadas de forma direta. As leituras foram obtidas a uma temperatura de $(22 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C})$. A análise foi realizada em triplicata.

3.2.3 Gordura

O teor de gordura dos produtos foi determinado pela metodologia de Gerber. Inicialmente, preparou-se uma solução a $20\% \text{ m.m}^{-1}$ de leite condensado diluído em água deionizada. No butirômetro, foram adicionados 10 mL de ácido sulfúrico concentrado, seguidos por 11 mL da solução leite condensado e 1 mL de álcool isoamílico. O butirômetro foi então selado, e a mistura foi homogeneizada manualmente. Após essa etapa, o conjunto foi centrifugado por 4 minutos a 1200 RPM. Em seguida, a leitura foi realizada de forma direta e em seguida, multiplicou-se o fator de 5 para que fosse obtido a quantidade de gordura no DL de origem (Horwitz, 2016). A análise foi realizada em triplicata.

3.2.4 Proteína

A metodologia utilizada para a determinação do teor de proteínas no leite condensado foi baseada no método semi micro Kjeldahl, adaptado de Wolfschoon-Pombo (1980), que quantifica o nitrogênio total presente na amostra, sendo este um indicador indireto da concentração de proteínas. Inicialmente, aproximadamente 1 mL de uma solução $10\% \text{ m.m}^{-1}$ de leite condensado foi submetida à digestão com ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, na presença de catalisadores, como sulfato de cobre (CuSO_4) e sulfato de potássio (K_2SO_4), para promover a decomposição das moléculas orgânicas e conversão do nitrogênio em íon amônio (NH_4^+). A digestão em meio ácido é realizada em bloco digestor por aproximadamente 3:30 horas, numa rampa de temperatura gradual de $25 \text{ } ^\circ\text{C}$ a $400 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Após a digestão, a solução foi neutralizada com hidróxido de sódio (NaOH) $50\% \text{ m.v}^{-1}$, liberando o amônio na forma de gás amônia (NH_3), que foi destilado e capturado em uma solução de ácido bórico (H_3BO_3) na presença de indicador misto, composto

de azul de metileno e vermelho de metila. A quantificação do nitrogênio foi realizada por meio de titulação com solução de ácido clorídrico 0,1 M previamente padronizada, permitindo o cálculo do teor de nitrogênio na amostra. Por fim, o conteúdo proteico foi determinado multiplicando o teor de nitrogênio por um fator de conversão (6,38 para lácteos), de acordo com Wolfschoon-Pombo (1980).

3.2.5 Resíduo mineral fixo (RMF)

O teor de RMF, também conhecido como cinzas, do leite condensado integral, foi determinado em forno mufla modelo Q318M21 (Quimis). Antes da análise, os cadinhos foram aquecidos a 550 °C por 30 minutos, resfriados em dessecador e posteriormente pesados. Para a análise, colocou-se os cadinhos contendo aproximadamente 3 g de leite condensado dentro da mufla, primeiramente aquecidos a 105 °C por 2 horas, seguidos de 550 °C por mais 6 horas, até completa incineração. O tempo total de incineração foi até a obtenção de cinzas completamente brancas. Após esse processo, o cadinho com as cinzas foi retirado da mufla e colocado em dessecador até esfriar, sendo novamente pesado. A porcentagem de cinzas foi então determinada pela diferença entre as massas. A análise foi realizada em triplicata, conforme a metodologia descrita em Brasil, 2014.

3.3 CÁLCULO DO F_0

O valor de F_0 representa uma medida da intensidade de um processo térmico, indicando o tempo equivalente, em minutos, necessário para alcançar uma redução microbiana específica sob uma temperatura de referência de 121,1 °C (Bylund, 2015). Dessa forma, o F_0 permite comparar diferentes processos térmicos, mesmo que realizados sob temperaturas e tempos variados, traduzindo todos eles em um único valor equivalente de impacto térmico (Pistolesi, Mascherpa, 2015).

Para a obtenção dos dados de temperatura ao longo dos tratamentos térmicos, foram utilizados sensores digitais da marca LASCAR Electronics (faixa operacional de -40 °C a 125 °C), programados por meio do software EasyLog USB, fornecido pelo mesmo fabricante. A coleta de dados foi realizada em intervalos regulares de 5 segundos durante todo o processo de aquecimento em autoclave. Os sensores foram posicionados ao lado de cada lata de leite condensado dentro da autoclave para o

registro dos dados. As medições foram realizadas após cada ciclo, totalizando sete diferentes tempos de exposição térmica (15, 20, 25, 30, 35, 40 e 55 minutos). A amostra controle, que não foi submetida à autoclave a 121,1 °C, foi atribuída como F_0 igual a zero.

Com os dados obtidos, foi utilizada uma planilha eletrônica desenvolvida por Mullan (2018), intitulada *Macro-based Thermal Process Calculator*, para a estimativa dos valores de F_0 . Essa ferramenta aplica as regras de integração de Simpson e do Trapézio para calcular a área sob a curva de temperatura, considerando as etapas de aquecimento, tempo de manutenção à temperatura-alvo e resfriamento. O resultado representa a letalidade térmica acumulada ao longo do processo e o valor do F_0 .

3.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

A seguir, são apresentadas as metodologias empregadas nas análises físico-químicas realizadas nas amostras de DL. As determinações contemplaram os seguintes parâmetros: potencial hidrogeniônico (pH), acidez titulável e concentração de cálcio iônico livre (Ca^{2+}).

3.4.1 Potencial hidrogeniônico

O potencial hidrogeniônico (pH) das amostras foi medido a temperatura 22 ± 2 °C usando o medidor de pH PG1400 (Gehaka). O equipamento foi calibrado com soluções padrão de pH 4,0 e 7,0. Além do pH lido pelo equipamento, os resultados também foram apresentados como Δ pH que corresponde à diferença entre o pH da amostra controle (tempo 0) e o pH de cada doce produzido.

3.4.2 Acidez titulável

A metodologia para determinação de acidez titulável foi conforme a ISO/TS 11869:2012 que descreve o uso da titulação potenciométrica para calcular a acidez em produtos lácteos fermentados. O procedimento foi adaptado para o uso em DL. O método se baseia na titulação de uma solução de 20% m.m⁻¹ de DL com uma solução padrão de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol. L⁻¹, até que o pH da solução atinja 8,30

$\pm 0,01$. A acidez titulável é calculada com base no volume de NaOH gasto e é expressa em gramas de ácido láctico por 100 g de produto.

3.4.3 Cálcio iônico livre

Os teores de cálcio iônico livre (Ca^{2+}) foram realizados utilizando o eletrodo íon seletivo portátil para cálcio LAQUAtwin (Horiba Instruments) conforme descrito por Singh et al. (2019). O eletrodo foi calibrado usando soluções padrão de cálcio de 0,374 mM (15 ppm) e 3,74 mM (150 ppm) antes de cada experimento. A solução padrão de 150 ppm foi adquirida pelo fornecedor do equipamento. A solução de 15 ppm foi produzida a partir da diluição da solução de 150 ppm em uma solução de KCl 0,1 M, para fim de ajuste de força iônica. Para a determinação do Ca^{2+} livre, foi preparada uma solução de 20% m.m⁻¹ de DL e uma pequena alíquota da amostra foi adicionada diretamente no sensor do equipamento para leitura.

3.5 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

A partir dos DL produzidos, foram analisados quatro intermediários da RM, comumente utilizados como indicadores da intensidade dos tratamentos térmicos aplicados (Carneiro *et. al.*, 2021). Os compostos avaliados foram: 5-hidroxiacetilfurfural (HMF), 2-furaldeído (F), 2-furil-metilcetona (FMC) e 5-metil-2-furaldeído (MF). A quantificação desses analitos foi realizada com base na metodologia descrita por Pinto (2024). Para cada composto, foram preparadas curvas analíticas específicas, aplicadas nos diferentes tempos de análise. A aquisição dos dados cromatográficos foi realizada por meio do software Empower™, e o tratamento posterior dos dados foi conduzido utilizando o Microsoft Excel.

3.5.1 Parâmetros cromatográficos

A quantificação dos analitos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em modo de fase reversa, utilizando um sistema cromatográfico modelo 1525 (Waters), equipado com detector de arranjo de diodos (PDA – *Photodiode Array Detector*). A separação foi conduzida em regime de eluição em gradiente, conforme especificado na Tabela 1, com vazão de 1 mL.min⁻¹. Utilizou-se

uma coluna Waters Spherisorb (150 mm × 4,6 mm; 3 µm), mantida a 30 °C, com volume de injeção de 20 µL. A detecção dos compostos foi realizada no comprimento de onda de 284 nm (Pinto, 2024).

Tabela 1 - Modo de eluição gradiente para a determinação dos indicadores da Reação de Maillard.

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

Fonte: (PINTO, 2024)

3.5.2 Reagentes

Os padrões analíticos de 5-hidroxiacetilfurfural, 2-furaldeído, 5-metil-2-furfural e 2-furilmetilcetona, bem como o solvente acetonitrila, foram adquiridos da Sigma-Aldrich, todos com grau de pureza analítico (> 99%).

3.5.3 Preparo de amostra: 5-hidroxiacetilfurfural livre e desenvolvido

Para a determinação do HMF livre, uma alíquota de 1 g de DL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com água ultrapura. Dessa solução, retirou-se 1 mL, o qual foi diluído com 200 µL de água ultrapura em tubo tipo Eppendorf e homogeneizado em vórtex por 20 segundos. Adicionaram-se 300 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 55% m.v⁻¹, com nova homogeneização por 20 segundos. A mistura foi centrifugada a 2680 g por 10 minutos, e 500 µL do sobrenadante foram transferidos para novo tubo contendo 100 µL de água ultrapura e 300 µL de TCA 55% m.v⁻¹. A mistura foi centrifugada novamente a 2680 g por 20 minutos e o sobrenadante foi filtrado (0,45 µm) para que em seguida, injetado no sistema HPLC-PDA (Pinto *et. al.*, 2024).

Para a quantificação do HMF desenvolvido, preparou-se uma solução a 10% m.m⁻¹ de DL com ajuste do pH para 7,0. Essa solução foi submetida a novo tratamento térmico a 90 °C em banho maria, com tempos de exposição de 60, 120 e 180 minutos em tubos fechados para evitar a perda de água. Após o aquecimento, as amostras

foram submetidas ao mesmo procedimento de preparo descrito anteriormente. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3.6 PARÂMETROS DE COR

A seguir, são apresentadas as metodologias nas análises de coloração realizadas nas amostras de DL. As análises se dão pelos métodos: medidor colorimétrico portátil CIE-LAB e espectrofotômetro UV-Vis.

3.6.1 Determinação da cor

A avaliação da cor dos DL produzidos e do controle foi realizada por colorimetria utilizando o medidor colorimétrico modelo CR-400 (Konica Minolta), conforme a escala CIE Lab (CIE, 1974). O modelo do dispositivo de separação espectral foi de grade de difração planar, empregando o SCI (*specular component included*), a faixa de medição de refletância e de comprimento de onda foi de 360 até 740 nm com intervalo de comprimento de onda de 10 nm.

Esse sistema de cores utiliza três parâmetros: O parâmetro L refere-se à luminosidade do produto, variando de 0 (preto) a 100 (branco). O parâmetro a^* vai de valores negativos (verde) a positivos (vermelho), enquanto o parâmetro b^* varia de valores negativos (azul) a positivos (amarelo) (De Oliveira *et al.*, 2020; Gadonski *et al.*, 2018).

3.6.2 Espectrofotômetro UV-vis

A análise da cor por absorvância foi realizada utilizando um espectrofotômetro UV-Vis a 420 nm, conforme a metodologia adaptada por Morales & Van Boekel, 1998 e Pinto, *et al.*, 2024. Retirou-se 5 mL de uma solução de DL 10% m.m⁻¹, e em seguida foi submetido a uma diluição com 1 mL de água ultrapura em tubo tipo Falcom e homogeneizado em vórtex por 20 segundos. Adicionaram-se 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 55% m.v⁻¹, com nova homogeneização por 20 segundos. A mistura foi centrifugada a 2680 g por 10 minutos, e 5,0 mL do sobrenadante foram transferidos para novo tubo contendo 1,0 mL de água ultrapura e 1,5 mL de TCA 55% m.v⁻¹. A mistura foi centrifugada novamente a 2680 g por 20 minutos e o sobrenadante

foi filtrado (0,45 μm) para que em seguida, fosse feito a leitura no espectrofotômetro UV-Vis a 420 nm.

O valor do branco, foi obtido a partir de uma amostra com 1,5 mL de TCA 55% m.v⁻¹ e 1,0 mL de água ultrapura. O resultado foi definido como a diferença entre a absorbância medida entre 420 nm e grama de proteína.

3.7 COMPORTAMENTO REOLÓGICO

O comportamento reológico descreve a forma como um material responde mecanicamente quando submetido a esforços de deformação ou escoamento, sendo uma propriedade fundamental para caracterizar alimentos com textura complexa, como o DL (Carneiro *et. al.*, 2021). Neste estudo, amostras dos doces produzidos nos tempos de 0 (controle), 20, 35 e 55 minutos de tratamento térmico foram analisadas utilizando um reômetro modelo HAAKE da *ThermoFisher Scientific*, sob temperatura controlada de 25 °C. As análises foram realizadas em triplicata para garantir a reprodutibilidade dos dados.

O ensaio reológico foi conduzido em quatro etapas sequenciais, visando avaliar o comportamento do produto em diferentes regimes de escoamento. A primeira etapa consistiu na aplicação de uma taxa de cisalhamento constante de 0,1 s⁻¹ por 10 segundos, com o objetivo de minimizar a tixotropia, que é a propriedade de certos materiais de apresentarem redução da viscosidade com o tempo sob cisalhamento constante e posterior recuperação da estrutura ao cessar a deformação.

A segunda etapa envolveu a varredura ascendente da taxa de cisalhamento – parâmetro que representa a velocidade com que camadas adjacentes do fluido se movimentam entre si – variando de 0,1 a 100 s⁻¹ durante 200 segundos, permitindo identificar o comportamento de escoamento sob condições de agitação crescente. Em seguida, na terceira etapa, foi aplicada uma taxa constante de 100 s⁻¹ por 30 segundos para avaliar a estabilidade da amostra em uma condição simulada de fluxo contínuo. Por fim, a quarta etapa consistiu na varredura descendente da taxa de cisalhamento de 100 a 0,1 s⁻¹, também durante 200 segundos, o que possibilita observar possíveis efeitos de histerese, associados à quebra parcial da estrutura do produto durante o escoamento.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas aplicando a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey em um nível de significância de 0,05 com auxílio do Software R versão 4.4.2 (The R[®] Foundation for Statistical Computing).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A caracterização físico-química do leite condensado utilizado neste estudo foi realizada a partir dos métodos oficiais de análise e os resultados obtidos foram comparados com os parâmetros estabelecidos pela Instrução Normativa nº 47, de 26 de outubro de 2018, que fixa a identidade e os requisitos de qualidade para o leite condensado integral. De acordo com a legislação vigente, o produto deve apresentar teor de gordura entre 8,0 e 16,0 g.100 g⁻¹, proteína mínima de 34,0 g.100 g⁻¹ nos sólidos não gordurosos e pelo menos 28,0 g.100 g⁻¹ de sólidos lácteos totais.

Os resultados obtidos na amostra analisada encontram-se dentro dos limites exigidos por essa regulamentação como pode-se observar na Tabela 2. Adicionalmente, parâmetros complementares como umidade, carboidratos, teor de sólidos solúveis (°Brix) e RMF também foram determinados, embora não sejam exigidos pela normativa brasileira. Esses valores foram avaliados com base em referências técnico-científicas e são amplamente utilizados na literatura como indicadores da qualidade tecnológica e estabilidade do produto.

Tabela 2 - Análises composicionais do leite condensado integral.

Composição	Dados		Referência
	Experimentais	Teóricos	
Umidade (% m.m ⁻¹)	25,3 ± 0,6	~26 – 28 g.100 g ⁻¹	SILVA; SÁ; PERRONE (2011)
°Brix	70,1 ± 0,1	~72,0 – 74,0 °Brix	SILVA; SÁ; PERRONE (2011)
Gordura (% m.m ⁻¹)	8,3 ± 0,2	8,0 – 16,0 g.100 g ⁻¹	IN nº 47, de 26/10/2018
Proteína (% m.m ⁻¹)	39,27 ± 0,17	mínimo de 34,0 g.100 g ⁻¹ em sólidos não gordurosos	IN nº 47, de 26/10/2018
Cinzas (% m.m ⁻¹)	1,8 ± 0,1	< 2,0 g.100 g ⁻¹	SILVA; SÁ; PERRONE (2011)
Carboidratos (% m.m ⁻¹)	56,3 ± 0,7	~55 – 60 g.100 g ⁻¹	SILVA; SÁ; PERRONE (2011)

Fonte: elaborada pelo autor (2025).

4.1 DOCES DE LEITE PRODUZIDOS: ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E F_0

Os diferentes DL elaborados ao longo deste estudo foram submetidos a tratamentos térmicos controlados em autoclave, resultando em variações significativas em suas propriedades físico-químicas. O grau de tratamento térmico aplicado a cada amostra foi quantificado por meio do valor de F_0 . É possível ver uma notável diferença entre os doces produzidos conforme a Figura 4. No caso dos DL analisados, os valores de F_0 variaram entre $17,19 \pm 1,85 \text{ min}^{-1}$ e $52,30 \pm 2,4 \text{ min}^{-1}$, refletindo uma grande diferença de intensidades térmicas que as amostras foram submetidas. Como observado na Tabela 3, essas variações promoveram mudanças expressivas nas amostras, principalmente em relação ao pH, à acidez titulável e à concentração de Ca^{2+} , o que demonstra o impacto direto do aquecimento prolongado sobre a composição físico-química do produto.

Figura 4 - Doces de leite produzidos, a partir do leite condensado integral, com a mesma composição centesimal, a $121,1^\circ\text{C}$, mas com tempo de exposição ao aquecimento diferente.



Fonte: Figura elaborada pelo autor (2025).

Tabela 3 - Resultados das análises físico-químicas dos doces de leite em diferentes tratamentos térmicos no dia 0 (D0) de *shelf life*.

Tempo. (min)	F ₀ (min)	Ca ²⁺ (mmol.L ⁻¹)	pH	ΔpH	Acidez (g ácido láctico.100 g ⁻¹)
0	0,00 ± 0,00	0,89 ± 0,03 ^e	6,40 ± 0,02 ^h	0,00 ± 0,00	0,47 ± 0,02 ^f
15	17,19 ± 1,85 ^e	1,39 ± 0,01 ^d	5,78 ± 0,03 ^g	0,62 ± 0,01 ^g	0,64 ± 0,02 ^e
20	20,51 ± 3,70 ^{de}	1,55 ± 0,01 ^c	5,65 ± 0,01 ^f	0,75 ± 0,02 ^f	0,72 ± 0,02 ^d
25	25,58 ± 4,18 ^{cde}	1,58 ± 0,01 ^c	5,60 ± 0,01 ^e	0,80 ± 0,02 ^e	0,76 ± 0,01 ^{cd}
30	30,92 ± 3,92 ^{bcd}	1,59 ± 0,01 ^c	5,53 ± 0,02 ^d	0,87 ± 0,02 ^d	0,79 ± 0,04 ^c
35	36,28 ± 3,06 ^{bc}	1,80 ± 0,01 ^b	5,35 ± 0,01 ^c	1,05 ± 0,02 ^c	0,85 ± 0,01 ^b
40	40,54 ± 4,04 ^{ab}	1,87 ± 0,06 ^{ab}	5,30 ± 0,02 ^b	1,10 ± 0,01 ^b	0,90 ± 0,01 ^{ab}
55	52,30 ± 2,4 ^a	1,93 ± 0,01 ^a	5,20 ± 0,01 ^a	1,20 ± 0,02 ^a	0,94 ± 0,01 ^a

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Legenda: ΔpH representa a diferença entre o pH do doce controle (tempo 0 minutos) e o pH final da amostra. Medidas de mesma letra na mesma coluna, não diferem estatisticamente, por teste Tukey ($p > 0,05$).

Uma das alterações mais evidentes foi a diminuição progressiva do pH à medida que o F₀ aumentava, comportamento típico de produtos lácteos submetidos a elevadas temperaturas. Essa tendência é melhor representada pela análise do ΔpH, que representa a diferença entre o pH inicial (do leite condensado) e o pH final do doce. O aquecimento favorece diversas reações químicas, como a degradação da lactose e a RM, que geram compostos ácidos e, conseqüentemente, acidificam o meio (Carneiro *et. al.*, 2021). A diminuição do pH resulta na precipitação de proteínas, favorece a cristalização da lactose e prejudica a ocorrência da RM (Penci & Marín, 2016; Stephani *et al.*, 2019).

Os resultados mostram que a acidez (em g de ácido láctico.100 g⁻¹) aumentou de 0,47 ± 0,02 no controle (sem tratamento térmico) para 0,94 ± 0,01 na amostra submetida ao maior F₀. Estes resultados estão de acordo com a literatura, visto que o aumento está associado à formação de ácidos orgânicos, como o láctico e o acético, e à liberação de íons das estruturas proteicas. De acordo com Stephani *et. al.*, (2023), estes compostos ácidos geram um aumento na acidez total desenvolvida (ATD) que é resultado da degradação térmica de constituintes do leite, como a lactose, além da desfosforilação de caseínas e a precipitação do fosfato de cálcio.

Além disto, a acidez mais elevada contribui para a percepção sensorial de maior intensidade e sabor mais amargo, mesmo entre amostras com composição centesimal semelhante (Stephani *et. al.*, 2023). Essa correlação entre pH e textura está relacionada à reorganização estrutural das proteínas, que podem sofrer coagulação parcial, afetando a viscosidade e a consistência do doce (Rovedo *et. al.*, 1991).

Outro parâmetro diretamente afetado pelo tratamento térmico foi o aumento de Ca^{2+} livre. Os resultados mostram que o teor de Ca^{2+} aumentou de $0,89 \pm 0,03 \text{ mmol.L}^{-1}$ no controle para $1,93 \pm 0,01 \text{ mmol.L}^{-1}$ na amostra com F_0 mais elevado. Embora a literatura sobre leite reporte uma redução do cálcio solúvel com o aquecimento — devido à migração para a fase solúvel para a fase coloidal (Da Silva, 2003; Lewis, 2011) — no DL, com a queda significativa de pH induzida pelo calor, ocorre o oposto. O ambiente ácido, promove a liberação do cálcio antes ligado à fase coloidal, devido à desmineralização das micelas de caseína (Carneiro *et. al.*, 2021). A desfosforilação proteica e a protonação de grupos fosfato e carboxila diminuem a capacidade de retenção de cálcio, promovendo sua migração para a fase solúvel (Mekmene *et. al.*, 2010).

Esses resultados demonstram que o tratamento térmico altera profundamente as características físico-químicas dos DL. As transformações observadas são reflexo direto da complexa interação entre constituintes lácteos, temperatura e tempo de processamento, o que destaca a importância de se compreender e controlar o F_0 .

4.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS AO LONGO DO *SHELF LIFE*

A aplicação de diferentes intensidades de tratamento térmico nos DL produziu variações significativas em seus parâmetros físico-químicos iniciais (D0), como pH, acidez titulável e cálcio iônico. Esses parâmetros também foram monitorados ao longo do *shelf life* (D15, D30, D60 e D107), revelando tendências consistentes e estatisticamente significativas com base na análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey em um nível de significância de 0,05.

Os resultados indicam uma tendência clara de redução do pH com o aumento do tempo de tratamento térmico no D0. Ao longo do armazenamento, é possível observar, conforme a Figura 5, que o pH dos doces tende a se manter com o mesmo padrão de decaimento nos primeiros 30 dias (D0, D15 e D30), com oscilações leves,

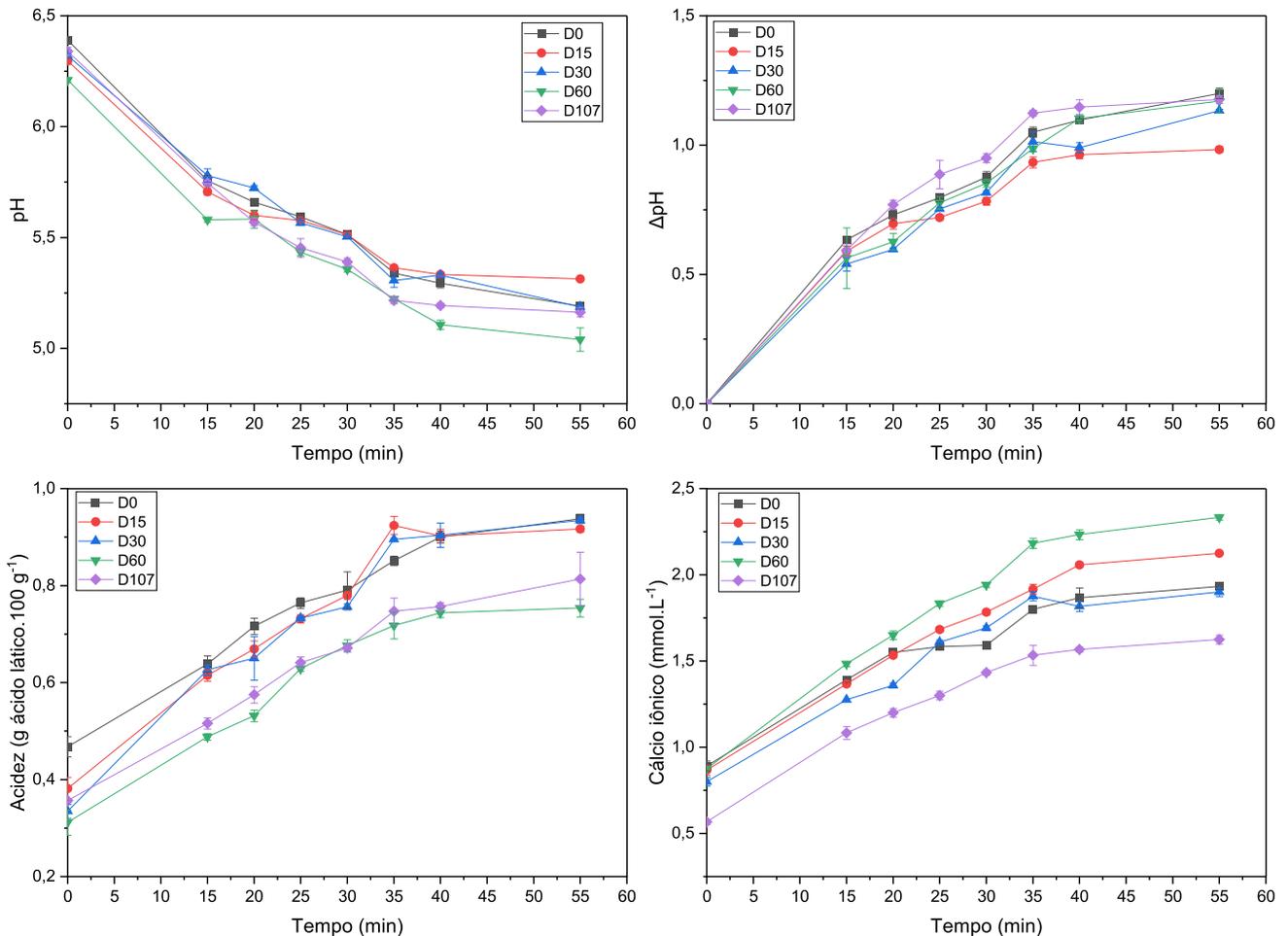
e uma queda mais acentuada em dias de *shelf life* mais estendidos (D60 e D107). Isto mostra que a cinética da reação de formação dos ácidos provinda da RM, ocorre em velocidades diferentes ao longo dos dias, no que reflete nesta oscilação dos valores de pH. Notavelmente, a amostra controle (DL0) apresentou um decréscimo expressivo no pH, refletindo na ocorrência da RM mesmo de forma lenta e contínua em produtos que não passaram por tratamento térmico. Este fato já é difundido pela literatura, como reportado por Carneiro e colaboradores, 2021 (Carneiro *et. al.*, 2021).

Os valores de ΔpH , aumentaram significativamente com o F_0 e permaneceu com este aumento durante todo o *shelf life*, especialmente nas amostras DL35, DL40 e DL55. No entanto, ao longo dos dias analisados, os resultados estatísticos indicam que esse aumento no ΔpH não é mantido de forma significativa, conforme ilustrado na Figura 5. Isso sugere que, embora o tratamento térmico inicial influencie diretamente a redução do pH, o armazenamento não causa variações adicionais marcantes no pH do produto ao longo do tempo. Esse comportamento pode estar associado à estabilização dos compostos formados durante o processo térmico, como os produtos intermediários da Reação de Maillard, que atingem um equilíbrio, limitando assim novas mudanças no pH durante o *shelf life* (Bertrand *et. al.*, 2018).

Observando os valores de acidez na Figura 5, pode-se relacionar com o mesmo fenômeno da diferença da cinética da RM durante o *shelf life*. Nos D0, D15 e D30, não há diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os valores de acidez. No entanto, com o prolongamento do *shelf life* (D60 e D107) é observado uma queda nos valores de acidez, mostrando que a RM continua acontecendo, com a formação dos ácidos orgânicos responsáveis pela diminuição do pH, e aumento da acidez, mas com menor intensidade.

Durante o *shelf life*, o Ca^{2+} também apresentou tendência de elevação contínua, especialmente nas amostras DL35, DL40 e DL55. Este aumento pode estar relacionado à contínua progressão da dissociação dos complexos cálcio-caseinato e à perda da capacidade de complexação por compostos como citrato e lactato em pH mais ácido.

Figura 5 - Parâmetros Físico-Químicos ao longo do *Shelf Life* (n = 3).



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

D0 = dia 0; D15 = dia 15; D30 = dia 30; D60 = dia 60, D107 = dia 107.

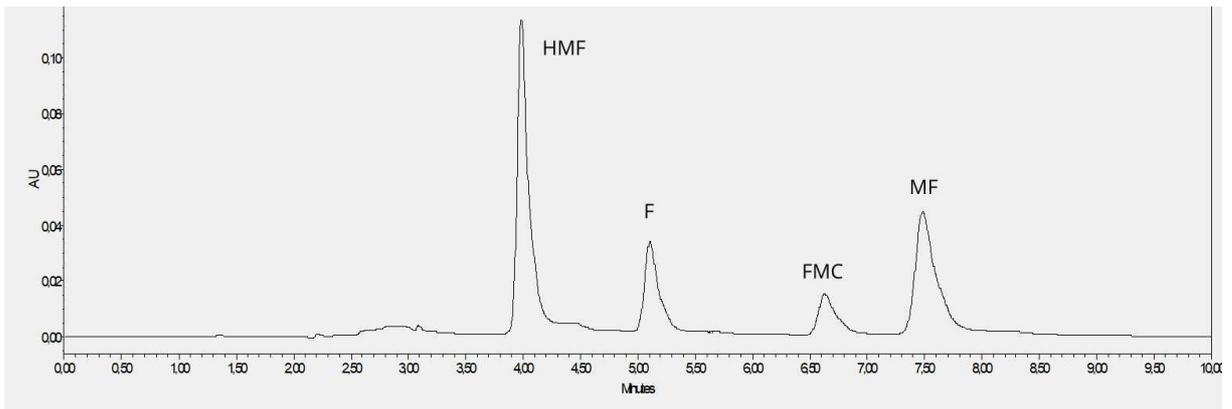
4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS MARCADORES DA REAÇÃO DE MAILLARD POR HPLC

Foram avaliados, neste estudo, quatro compostos intermediários da RM: 5-hidroxiacetilfurfural (HMF), 2-furaldeído (F), 5-metilfuraldeído (MF) e 2-furil-metilcetona (FMC), conforme apresentado na Figura 6. Esses marcadores representam etapas distintas do progresso da reação, sendo utilizados para estimar o impacto térmico sobre alimentos. Dentre eles, o HMF é o composto mais citado na literatura científica como indicador da intensidade do tratamento térmico e da degradação de açúcares redutores (Lund & Ray, 2017).

A análise cromatográfica com o detector de arranjo de diodos, permitiu a detecção e a quantificação de HMF em todas as amostras, confirmando sua formação sob as condições aplicadas. O F também foi identificado, embora em baixas

concentrações. Por outro lado, MF e FMC não foram detectados nas amostras avaliadas. Este resultado está de acordo com outros estudos conduzidos com produtos lácteos, nos quais a presença de MF e FMC também não foi observada (Chávez-Servín *et. al.*, 2005; Ferrer *et. al.*, 2000; Lund *et. al.*, 2021).

Figura 6 - Cromatograma dos padrões dos indicadores da Reação de Maillard.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

4.3.1 Formação de HMF livre em função do tratamento térmico e *shelf life*

A formação de HMF nas amostras de doce de leite apresentou relação direta com a intensidade do tratamento térmico aplicado e com o tempo de armazenamento. A Tabela 4 apresenta os valores de pH (medidos diretamente e em solução a 10% m.m⁻¹) e as concentrações de HMF livre em função do tempo de cocção. Observa-se que, à medida que o tempo de tratamento térmico aumenta, o pH das amostras diminui significativamente ($p < 0,05$), o que favorece a rota sintética para a formação de HMF. Essa tendência confirma que ambientes mais ácidos catalisam a conversão dos intermediários da Reação de Maillard, como os compostos de Amadori, em produtos furânicos, entre eles o próprio HMF (Carneiro *et. al.*, 2021).

Tabela 4 - HMF livre ($\mu\text{mol.kg}^{-1}$) em função do tempo de produção, pH medido diretamente no DL e pH na solução 10% (m.m^{-1}) de doce ($n = 2$).

Tempo (min)	F ₀ (min)	pH	pH Solução 10% (m.m^{-1})	HMF livre ($\mu\text{mol.kg}^{-1}$)
0	0,00 ± 0,00	6,40 ± 0,02 ^h	6,79	32 ± 1 ^f
15	17,19 ± 1,85 ^e	5,78 ± 0,03 ^g	6,26	77 ± 4 ^{ef}
20	20,51 ± 3,70 ^{de}	5,65 ± 0,01 ^f	6,17	131 ± 18 ^{de}
25	25,58 ± 4,18 ^{cde}	5,60 ± 0,01 ^e	6,04	178 ± 16 ^{cd}
30	30,92 ± 3,92 ^{bcd}	5,53 ± 0,02 ^d	5,97	241 ± 3 ^c
35	36,28 ± 3,06 ^{bc}	5,35 ± 0,01 ^c	5,62	370 ± 9 ^b
40	40,54 ± 4,04 ^{ab}	5,30 ± 0,02 ^b	5,58	441 ± 14 ^{ab}
55	52,30 ± 2,4 ^a	5,20 ± 0,01 ^a	5,52	472 ± 16 ^a

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Medidas de mesma letra, não diferem estatisticamente, por teste Tukey ($p > 0,05$).

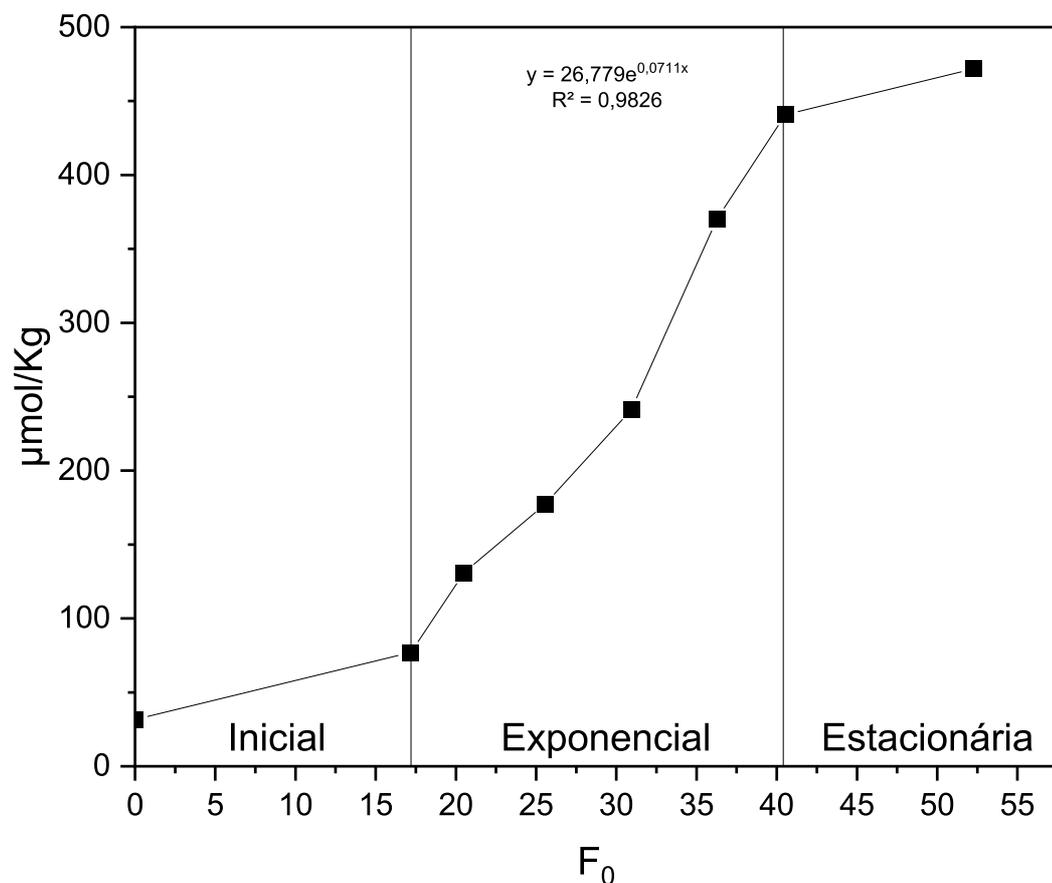
Os valores de HMF livre variaram de $32 \pm 1 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ na amostra controle (tempo 0 min, pH $6,40 \pm 0,02$) até $472 \pm 16 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ para a amostra submetida a 55 minutos de tratamento térmico em autoclave (pH $5,20 \pm 0,01$). A Figura 7 propõe uma representação gráfica interpretativa da formação de HMF em função do tempo de tratamento térmico, dividida em três fases distintas: inicial, exponencial e estacionária. Esta figura, construída com base nos dados obtidos experimentalmente, é apresentada como um postulado deste trabalho, com o intuito de descrever e propor um modelo de comportamento para a formação de HMF na matriz DL. Observa-se que, na fase inicial ($F_0 < 15$), a formação de HMF não apresentou diferença estatística significativa ($p > 0,05$), o que se justifica pela necessidade de um tempo mínimo de aquecimento para que as reações da etapa inicial da RM sejam ativadas, assim como para a própria transformação do leite condensado em doce de leite. A ausência de mais pontos experimentais nesta região se deve ao fato de que, com F_0 muito baixos, ainda não ocorre a conversão efetiva da matriz.

O padrão observado revela uma fase exponencial entre F_0 15 e 40, com crescimento acelerado do HMF, seguida por uma fase estacionária, onde a concentração do composto se estabiliza, sugerindo uma saturação da via de formação frente às condições impostas. Essa estabilização sugere que o sistema atinge um equilíbrio entre a taxa de formação e a conversão de HMF em produtos de maior

complexidade, como as melanoidinas (Pinto & Wolfschon Pombo, 1984; Bertrand *et al.*, 2018).

O ponto final, correspondente ao tempo de 55 minutos ($F_0 \approx 52$), foi selecionado intencionalmente como uma condição de tratamento térmico extremo, sem aplicação prática direta, com o objetivo específico de avaliar os limites superiores da formação de HMF em uma condição de severidade térmica máxima.

Figura 7 - Formação de HMF livre em três estágios de F_0 .



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

O armazenamento também desempenha um papel relevante na concentração de HMF livre. A Tabela 5 apresenta os valores obtidos ao longo de cinco momentos do *shelf life* (D0, D15, D30, D60 e D107). De forma geral, observa-se um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de HMF nas amostras entre D0 e D15, para praticamente todos os tempos de tratamento térmico. Esse padrão está alinhado à literatura, que indica que o HMF pode continuar sendo formado durante o

armazenamento, principalmente em função da temperatura e da presença residual de açúcares redutores e grupos amina ativos (Francisquini *et. al.*, 2017).

No entanto, após D30, verifica-se uma redução ou estabilização das concentrações de HMF em várias amostras, como nos doces tratados por 25, 30 e 35 minutos. Essa tendência pode ser atribuída ao consumo do HMF como substrato em etapas posteriores da RM, que resultam na formação de polímeros de alta massa molecular, como as melanoidinas. A queda observada em D107, especialmente nas amostras de menor F_0 , reforça essa hipótese, sugerindo que o sistema avança para estágios finais da reação, em que a formação de pigmentos escuros e compostos aromáticos se intensifica (Bertrand *et. al.*, 2018)

Tabela 5 - Comparação da formação dos HMF livre nos diferentes dias de *shelf life* por HPLC (D0 – D107).

Tempo (min)	HMF livre ($\mu\text{mol.kg}^{-1}$)				
	D0	D15	D30	D60	D107
0	32 ± 1 ^{Bf}	136 ± 24 ^{Ae}	34 ± 14 ^{Be}	88 ± 1 ^{Ad}	21 ± 1 ^{Bf}
15	77 ± 4 ^{Cef}	182 ± 6 ^{Ade}	65 ± 1 ^{Ce}	148 ± 6 ^{Bd}	67 ± 1 ^{Cef}
20	131 ± 18 ^{ABde}	214 ± 41 ^{Acde}	148 ± 8 ^{ABd}	182 ± 7 ^{Ad}	87 ± 14 ^{Be}
25	178 ± 16 ^{ABcd}	219 ± 1 ^{Accd}	190 ± 9 ^{ABcd}	221 ± 46 ^{Ac}	108 ± 1 ^{Bde}
30	241 ± 3 ^{ABc}	270 ± 10 ^{Ac}	227 ± 12 ^{ABc}	327 ± 56 ^{Abc}	148 ± 1 ^{Bcd}
35	370 ± 9 ^{ABb}	400 ± 17 ^{Ab}	312 ± 17 ^{Bb}	373 ± 25 ^{ABab}	194 ± 10 ^{Cbc}
40	441 ± 14 ^{Aab}	471 ± 14 ^{Aab}	366 ± 8 ^{ABa}	388 ± 59 ^{Aab}	269 ± 19 ^{Ba}
55	472 ± 16 ^{ABa}	539 ± 23 ^{Aa}	404 ± 12 ^{Ba}	479 ± 9 ^{ABab}	234 ± 21 ^{Cab}

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

D0 = dia 0; D15 = dia 15; D30 = dia 30; D60 = dia 60, D107 = dia 107.

Médias seguidas do mesmo índice em maiúsculo na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$). Médias seguidas do mesmo índice em minúsculo na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Com a Tabela 5 pode-se observar que, embora o HMF continue se formando após o processamento térmico, sua progressão não é linear durante todo o período de armazenamento. Observa-se também que os níveis de HMF em D107 são consistentemente inferiores aos de D60 para todas as amostras, o que reforça a hipótese de degradação ou conversão do HMF em compostos mais complexos ao longo do tempo, como as melanoidinas.

Do ponto de vista de segurança alimentar, a Tabela 6 apresenta os valores máximos teóricos de consumo diário de doce de leite com base no limite de ingestão de HMF estabelecido por Morales e colaboradores (2009), de 1,6 mg por pessoa por dia. Os resultados indicam que o doce submetido a 55 minutos de tratamento térmico ultrapassa este limite com apenas 26,9 g de consumo, enquanto o produto tratado por 15 minutos permitiria um consumo teórico de até 165,5 g dia⁻¹. Esses dados ressaltam a importância de um controle rigoroso dos parâmetros de cocção e armazenamento, para preservar a qualidade sensorial do doce, e mitigar possíveis riscos toxicológicos associados à ingestão excessiva de HMF.

Em conjunto, os dados obtidos evidenciam que o controle do pH, do tempo de aquecimento e das condições de armazenamento são determinantes para o teor final de HMF no doce de leite, e que a quantificação deste composto pode ser utilizada como um importante indicador do histórico térmico e da estabilidade química do produto durante sua vida útil.

Tabela 6 - Máximo de consumo teórico diário recomendado de doce de leite em gramas, em relação ao limite de ingestão diária de HMF (1,6 mg de HMF por pessoa por dia).

Tempo (min)	Consumo diário de doce de leite (g de doce de leite por 1,6 mg.HMF ⁻¹ .pessoa ⁻¹)				
	D0	D15	D30	D60	D107
0	403,3	93,3	373,7	143,50	599,86
15	165,5	69,5	195,7	85,36	188,77
20	97,0	59,3	85,6	69,61	145,72
25	71,3	57,9	66,8	57,35	117,59
30	52,7	46,9	55,9	38,73	85,40
35	34,2	31,8	40,6	33,97	65,31
40	28,8	26,9	34,7	32,75	47,25
55	26,9	23,5	31,4	26,50	54,19

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

D0 = dia 0; D15 = dia 15; D30 = dia 30; D60 = dia 60, D107 = dia 107.

4.3.2 Formação de HMF desenvolvido em função do tratamento térmico e *shelf life*

Na literatura científica, o teor HMF total tem sido amplamente utilizado como marcador da intensidade do tratamento térmico em produtos lácteos. Em estudos prévios, como os de Morales *et. al.*, (2000) e Chávez-Servín *et. al.*, (2005), a determinação do HMF total foi realizada após aquecimentos padronizados, geralmente entre 25 e 60 minutos a 100 °C, em matrizes como leite UHT, fórmulas infantis e leite em pó. Barrera *et. al.*, (2021), por exemplo, utilizaram esse protocolo para amostras de DL. No entanto, a escassez de estudos voltados especificamente para a matriz DL justifica a necessidade de investigações mais aprofundadas, especialmente considerando o perfil físico-químico desse produto.

Os dados obtidos no presente trabalho demonstram que, mesmo após o tratamento mencionado pelos autores acima, a formação de HMF pode continuar de forma significativa, principalmente quando as amostras são submetidas a períodos prolongados de aquecimento. Esse comportamento evidencia que o valor de HMF atingido em 1 hora não representa um limite absoluto ou “total”, como frequentemente sugerido na literatura, mas sim um estágio de progressão da RM.

Diante disso, neste estudo optou-se pelo uso do termo “HMF desenvolvido”, por refletir com maior rigor o caráter progressivo e dependente do tempo de formação desse composto. Como mostram os resultados obtidos para o HMF desenvolvido ao longo de 1, 2 e 3 horas de aquecimento (Tabela 7), observou-se um crescimento contínuo e estatisticamente significativo dos níveis do composto em quase todas as condições, com variações de até quatro vezes em relação ao valor inicial. Portanto, essa nomenclatura se mostra mais apropriada do ponto de vista técnico, já que reconhece a continuidade da reação e evita a falsa impressão de que o sistema atinge um platô definitivo após um intervalo de reaquecimento.

Com base nisso, o presente estudo investigou a formação de HMF desenvolvido a partir de um novo aquecimento padronizado (90 °C) aplicado às amostras previamente processadas. Para isolar o efeito da temperatura e do tempo, o pH das amostras foi ajustado para 7,0 antes do reaquecimento, eliminando interferências relacionadas à acidez da matriz.

Tabela 7 - Valores de HMF desenvolvido após 1, 2 e 3 horas de aquecimento a 90 °C com ajuste de pH = 7 por HPLC (n = 2).

Tempo (min)	HMF ($\mu\text{mol.kg}^{-1}$)				
	Livre	1 hora	2 horas	3 horas	ΔHMF
0	32 ± 1 ^f	68 ± 11 ^f	116 ± 43 ^f	141 ± 22 ^e	109
15	77 ± 4 ^{ef}	196 ± 21 ^e	232 ± 47 ^{ef}	292 ± 35 ^d	215
20	131 ± 18 ^{de}	290 ± 11 ^d	331 ± 8 ^{de}	305 ± 62 ^{cd}	174
25	178 ± 16 ^{cd}	367 ± 1 ^c	405 ± 25 ^{cd}	417 ± 36 ^{bc}	239
30	241 ± 3 ^c	418 ± 23 ^c	476 ± 3 ^c	505 ± 13 ^b	264
35	370 ± 9 ^b	648 ± 6 ^b	629 ± 20 ^b	730 ± 17 ^a	360
40	441 ± 14 ^{ab}	673 ± 0 ^{ab}	744 ± 26 ^{ab}	796 ± 37 ^a	355
55	472 ± 16 ^a	722 ± 13 ^a	800 ± 34 ^a	835 ± 45 ^a	363

Elaborado pelo autor (2025).

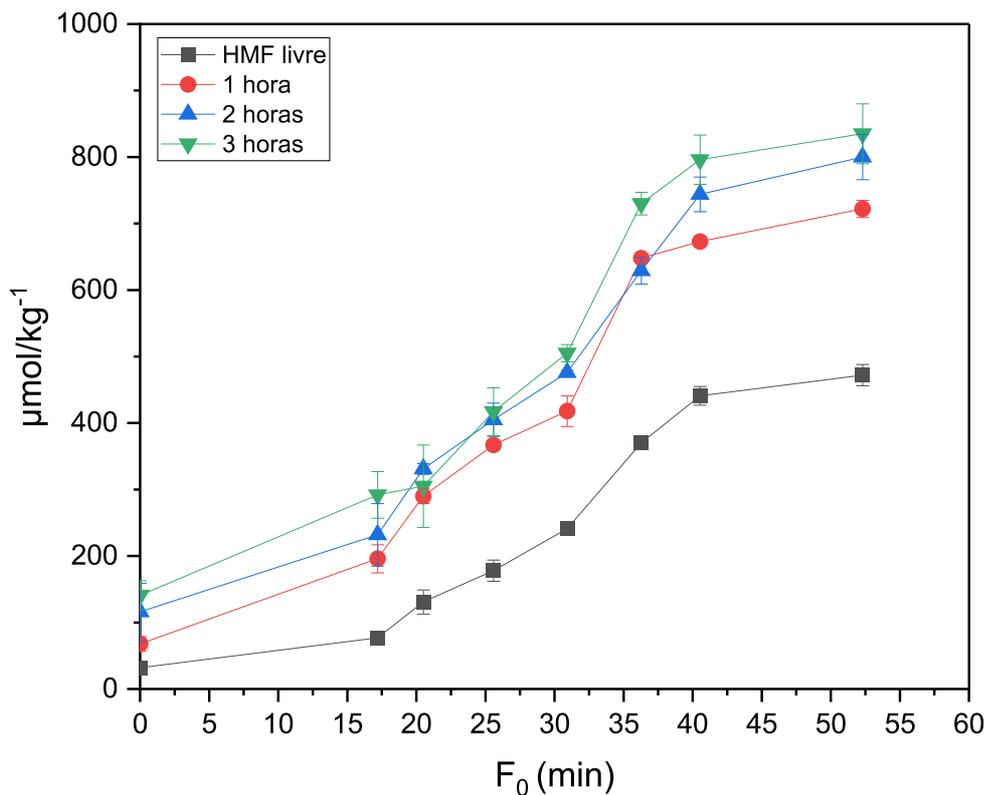
Médias seguidas do mesmo índice em minúsculo na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$). ΔHMF = diferença entre o HMF desenvolvido e o HMF livre após 3 horas de aquecimento a 90 °C.

Observa-se que, de maneira geral, o teor de HMF desenvolvido aumenta progressivamente com o tempo de aquecimento, mesmo após a etapa inicial de produção do doce. Esse comportamento indica que os intermediários da RM ainda permanecem ativos e disponíveis, promovendo a formação contínua de HMF mesmo em condições prolongadas de aquecimento. Isso é reforçado pelos valores de ΔHMF (diferença entre o HMF desenvolvido em 3 horas e o HMF livre), que indicam um incremento de até 363 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ nas amostras mais severamente tratadas (Tabela 7), revelando que a RM não se encerra com o tratamento térmico inicial, mas pode progredir consideravelmente com o reaquecimento.

É visto um aumento significativo na concentração de HMF entre 1 hora e 3 horas, especialmente para os valores de F_0 mais elevados. Por exemplo, para o doce com $F_0 = 40$, o HMF aumenta de 673 para 796 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ com o prolongamento do aquecimento, e para $F_0 = 55$, vai de 722 para 835 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$. Ainda que o incremento tenda a se estabilizar a partir de 2 horas, como evidenciado pela inclinação suavizada das curvas na Figura 4, a diferença entre 1 hora e 3 horas permanece estatisticamente relevante para os níveis mais intensos de tratamento ($F_0 \geq 35$), indicando que o tempo adicional pode ser necessário em estudos que buscam entender a extensão total da RM em doces com alto grau de aquecimento.

É importante destacar que o tempo limite de 3 horas foi adotado neste estudo não por sua aplicabilidade prática na indústria, mas sim por representar uma condição extrema de calor, visando avaliar o potencial máximo de formação de HMF e a persistência da RM.

Figura 8 – Valores de HMF desenvolvido para os diferentes tratamentos térmicos durante o *shelf life*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

No que diz respeito ao *shelf life*, os dados da Tabela 8 mostram que o valor de Δ HMF diminui de forma expressiva nos primeiros 30 dias de armazenamento, sugerindo a estabilização da RM. Essa tendência indica que, com o tempo, os intermediários reativos vão sendo consumidos e convertidos em produtos finais, como as melanoidinas. A exceção ocorre nas amostras do D60, onde a formação de HMF desenvolvido após 3 horas de reaquecimento ainda persiste de forma relevante até o D107, reforçando que, em condições de tratamento térmico extremo, o sistema mantém sua capacidade reacional.

Esses resultados confirmam que o HMF desenvolvido é um marcador sensível da carga térmica acumulada e que sua determinação deve considerar tanto o histórico térmico inicial quanto as possíveis reações secundárias ao longo do tempo.

Tabela 8 - Valores de Δ HMF em $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ em diferentes dias de *shelf life*.

Tempo (min)	Δ HMF (HMF 3 horas - HMF livre) $\mu\text{mol.kg}^{-1}$				
	D0	D15	D30	D60	D107
0	109	33	28	159	105
15	215	109	209	276	205
20	174	185	171	312	216
25	239	279	207	336	231
30	264	301	195	304	320
35	360	360	296	429	389
40	355	393	281	553	431
55	363	344	246	540	470

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

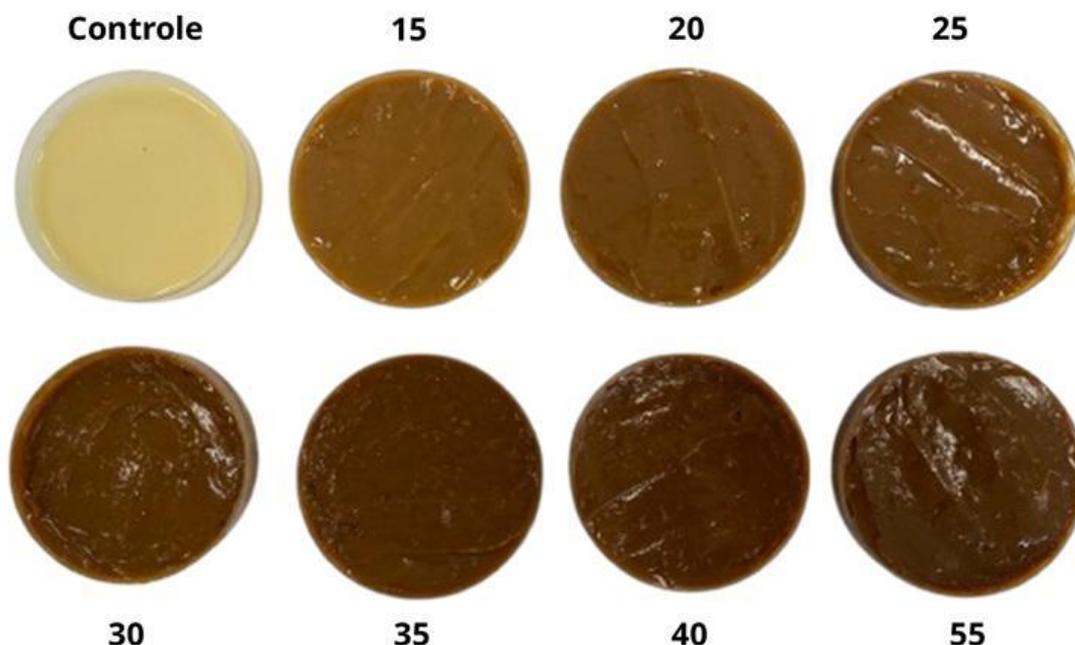
D0 = dia 0; D15 = dia 15; D30 = dia 30; D60 = dia 60 e D107 = dia 107

4.4 PARÂMETROS DE COR

A avaliação da cor dos DL constitui uma etapa fundamental para compreender as transformações físico-químicas induzidas pelo tratamento térmico e pelo tempo de armazenamento. A coloração, além de ser um atributo sensorial determinante na aceitação do consumidor, está diretamente relacionada à formação de compostos da RM, especialmente as melanoidinas, que são responsáveis pelo escurecimento típico desses produtos. Assim, para investigar essas alterações, foram utilizadas duas abordagens complementares: a colorimetria CIE-Lab e a análise espectrofotométrica em 420 nm, cada uma fornecendo diferentes perspectivas sobre a progressão do escurecimento.

A Figura 9 mostra a diferença clara entre os DL produzidos a partir da mesma matriz centesimal, modificando apenas o tratamento térmico.

Figura 9 - Doces de leite produzidos a 121,1 °C em autoclave com diferentes tratamentos térmicos (controle, 15 a 55 minutos).



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

4.4.1 Determinação da cor por colorimetria CIE-Lab

Os resultados da análise colorimétrica dos DL ao longo dos diferentes tempos de tratamento térmico e dias de *shelf life* são apresentados na Tabela 9. A luminosidade (L) demonstrou uma tendência decrescente com o aumento da intensidade térmica, indicando escurecimento progressivo das amostras desde o início até os 55 minutos. Essa redução é atribuída à formação de melanoidinas, produtos de elevada massa molecular formados nos estágios finais da Reação de Maillard.

A Figura 10 ilustra essa relação, evidenciando uma queda acentuada da luminosidade nos primeiros tratamentos (de $F_0 = 0$ até $F_0 \approx 36$), com uma estabilização a partir de $F_0 > 40$. Estatisticamente, os valores de L para os tempos de 40 e 55 minutos não diferiram significativamente ($p > 0,05$), sugerindo que, a partir de determinado ponto, o escurecimento do produto tende a um platô.

No acompanhamento do *shelf life*, verifica-se que os valores de L permanecem relativamente estáveis entre D15 e D30, o que pode indicar uma estabilização na formação de novos pigmentos após o processamento térmico inicial. Embora fosse

esperado um escurecimento progressivo ao longo do tempo de estocagem, a ausência de diferenças estatísticas marcantes após D30 sugere que o sistema alcançou um equilíbrio na formação de compostos cromóforos, possivelmente pela limitação dos precursores disponíveis ou pela natureza mais lenta das reações em temperatura ambiente.

Tabela 9 – Valores de Luminosidade (L), em função do *shelf life* (n = 3).

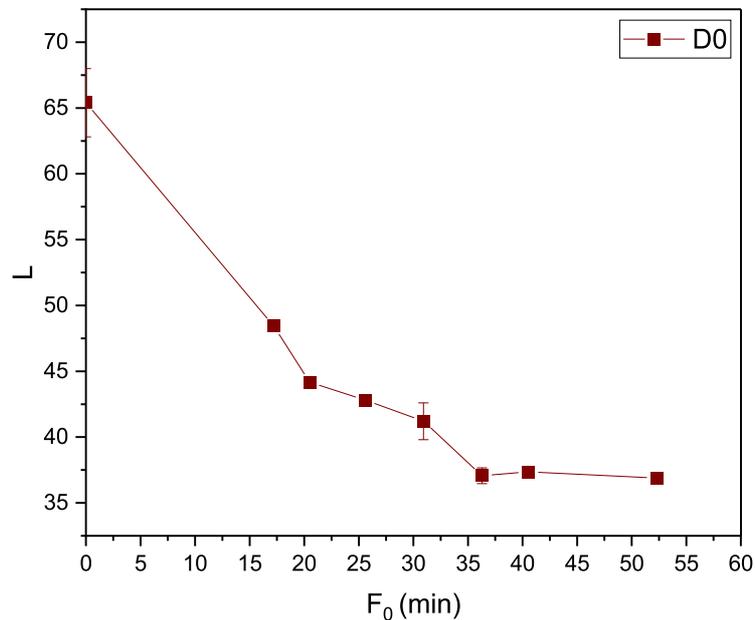
Tempo (min)	L				
	D0	D15	D30	D60	D107
0	65,41 ± 2,59 ^{BCa}	69,15 ± 2,01 ^{ABa}	62,38 ± 1,56 ^{Ca}	73,74 ± 0,03 ^{Aa}	67,66 ± 3,34 ^{BCa}
15	48,45 ± 0,24 ^{Bb}	50,67 ± 0,21 ^{Ab}	48,22 ± 0,40 ^{Bb}	48,02 ± 0,45 ^{Bb}	48,31 ± 0,13 ^{Bb}
20	44,17 ± 0,18 ^{Cc}	46,66 ± 0,15 ^{Ac}	45,84 ± 0,13 ^{ABc}	45,67 ± 0,85 ^{ABb}	44,82 ± 0,30 ^{BCbc}
25	42,81 ± 0,22 ^{Ac}	43,32 ± 0,39 ^{Ad}	42,80 ± 0,46 ^{Ad}	42,53 ± 0,58 ^{Ac}	43,52 ± 0,80 ^{Ac}
30	41,21 ± 1,40 ^{Ac}	41,35 ± 0,30 ^{Ad}	40,81 ± 0,18 ^{Ae}	40,55 ± 1,32 ^{AcD}	39,39 ± 0,08 ^{Ad}
35	37,08 ± 0,60 ^{Bd}	38,71 ± 0,28 ^{Ae}	39,04 ± 0,37 ^{Aef}	38,92 ± 0,91 ^{AcD}	37,98 ± 0,29 ^{ABd}
40	37,35 ± 0,37 ^{DdE}	38,97 ± 0,23 ^{ABe}	38,72 ± 0,13 ^{BCf}	40,03 ± 0,85 ^{Ad}	37,72 ± 0,23 ^{CDd}
55	36,89 ± 0,14 ^{Ad}	38,72 ± 0,24 ^{Ae}	38,16 ± 0,58 ^{Af}	37,59 ± 2,05 ^{Ad}	37,40 ± 0,95 ^{Ad}

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

D0 = dia 0; D15 = dia 15; D30 = dia 30; D60 = dia 60, D107 = dia 107.

Médias seguidas do mesmo índice em maiúsculo na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$). Médias seguidas do mesmo índice em minúsculo na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Figura 10 – Luminosidade (L) em função do tratamento térmico representado por F_0 (min) (n = 3).



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

4.4.2 Absorbância

Complementando a análise de cor, a Tabela 10 apresenta os valores de absorbância por grama de proteína das amostras ao longo do tempo de *shelf life*. A análise foi realizada em 420 nm, comprimento de onda característico para detecção de melanoidinas solúveis em meio aquoso. Os resultados mostraram um aumento progressivo da absorbância com o incremento do tratamento térmico, evidenciando a intensificação da formação de pigmentos de escurecimento, o que corrobora os dados obtidos por colorimetria CIE-Lab.

A Figura 11 mostra que a absorbância aumentou com o aumento do F_0 até aproximadamente 40 minutos, após o qual o crescimento foi mais sutil. Esse padrão sugere que a formação de melanoidinas solúveis também tende à saturação em tratamentos mais intensos, similar ao comportamento da luminosidade.

Durante o *shelf life*, o comportamento da absorbância difere da luminosidade: enquanto a L se estabiliza, a absorbância continua aumentando em alguns tratamentos, especialmente nos tempos mais longos. Esse resultado reforça que, mesmo com coloração aparente constante, alterações estruturais ainda podem

ocorrer em compostos solúveis, o que é coerente com a progressão das reações intermediárias e finais da RM.

Tabela 10 – Valores de absorbância (Abs) da fase solúveis, medidos em 420 nm, por grama de proteína para os DL produzidos ao longo do tempo de *shelf life* (n = 2).

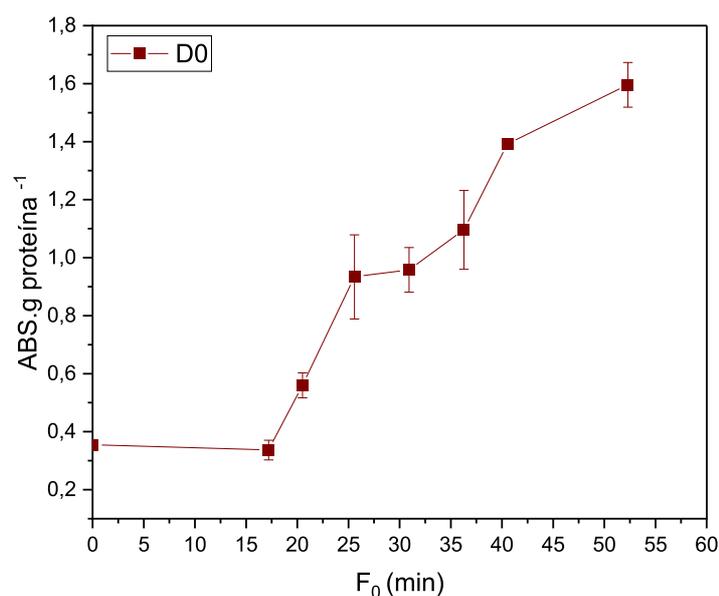
Tempo (min)	Abs/ g proteína				
	D0	D15	D30	D60	D107
0	0,36 ± 0,01 ^{Ad}	0,14 ± 0,01 ^{Be}	0,13 ± 0,03 ^{Bd}	0,13 ± 0,01 ^{Bf}	0,08 ± 0,02 ^{Bf}
15	0,34 ± 0,03 ^{BCd}	0,50 ± 0,03 ^{Ade}	0,23 ± 0,03 ^{Ccd}	0,52 ± 0,02 ^{Ae}	0,42 ± 0,05 ^{ABe}
20	0,56 ± 0,04 ^{Bd}	0,70 ± 0,01 ^{ABcd}	0,38 ± 0,03 ^{Cc}	0,80 ± 0,08 ^{Ad}	0,55 ± 0,02 ^{Bd}
25	0,93 ± 0,1 ^{Ac}	1,00 ± 0,2 ^{Abc}	0,73 ± 0,08 ^{Ab}	1,05 ± 0,1 ^{Ac}	0,74 ± 0,03 ^{Ac}
30	0,96 ± 0,08 ^{ABc}	1,27 ± 0,2 ^{Aab}	0,84 ± 0,03 ^{ABb}	1,16 ± 0,03 ^{ABbc}	0,76 ± 0,03 ^{Bc}
35	1,10 ± 0,1 ^{Bbc}	1,50 ± 0,1 ^{Aa}	1,21 ± 0,08 ^{ABa}	1,33 ± 0,03 ^{ABb}	1,25 ± 0,02 ^{ABb}
40	1,39 ± 0,01 ^{CDab}	1,61 ± 0,03 ^{Ba}	1,30 ± 0,09 ^{Da}	1,58 ± 0,01 ^{BCa}	1,81 ± 0,04 ^{Aa}
55	1,60 ± 0,08 ^{ABa}	1,55 ± 0,1 ^{ABa}	1,36 ± 0,07 ^{Ba}	1,64 ± 0,03 ^{ABa}	1,75 ± 0,03 ^{Aa}

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

D0 = dia 0; D15 = dia 15; D30 = dia 30; D60 = dia 60, D107 = dia 107.

Médias seguidas do mesmo índice em maiúsculo na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$). Médias seguidas do mesmo índice em minúsculo na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Figura 11– Valores de absorbância por grama de proteína para o DL em função do tratamento térmico representado por F_0 (min).



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

4.5 REOLOGIA

O estudo do comportamento reológico é fundamental para compreender as propriedades físico-mecânicas dos alimentos, especialmente aqueles com estrutura densa e complexa, como o DL. Durante o processamento térmico, ocorrem transformações estruturais nas proteínas, carboidratos, que impactam diretamente a textura, a viscosidade e a resistência ao escoamento do produto. Essas modificações são ainda mais relevantes considerando que, nos ensaios realizados, a formulação dos doces permaneceu constante, variando-se apenas o tempo de tratamento térmico aplicado.

As análises reológicas foram conduzidas a 25 °C, empregando a curva de cisalhamento descendente (de 100 a 0,1 s⁻¹), e os dados foram ajustados ao modelo de *Herschel-Bulkley*, conforme descrito na Tabela 11 e ilustrado nas Figura 12 e 13.

Equação 1: modelo de *Herschel-Bulkley*:

$$\tau = \tau_0 + k\dot{\gamma}^n$$

Sendo: τ tensão de cisalhamento aplicada (Pa); τ_0 tensão de escoamento inicial (Pa); K índice de consistência (Pa·sⁿ); n índice de comportamento do fluxo; $\dot{\gamma}$ taxa de deformação ou taxa de cisalhamento (s⁻¹)

Observou-se que todos os doces de leite apresentaram comportamento não newtoniano do tipo pseudoplástico ($n < 1$), com valores de coeficiente de determinação (R^2) superiores a 0,998, indicando a excelente adequação do modelo às amostras.

O controle ($F_0 = 0$) foi o único que apresentou tensão de escoamento nula ($\tau_0 = 0$), refletindo a ausência de uma rede estruturada suficientemente coesa para resistir ao escoamento inicial. A partir de $F_0 = 20$, houve um aumento expressivo na tensão de escoamento (43,62 Pa), alcançando seu pico em $F_0 = 55$ (108,76 Pa). Esse aumento progressivo de τ_0 indica maior resistência inicial ao fluxo, compatível com a formação de estruturas proteicas e polissacarídicas mais densas, intensificadas pela RM e pela redução do pH discutidas nos capítulos anteriores.

O índice de consistência (K), que representa a espessura do fluido em repouso, também aumentou drasticamente após os tratamentos térmicos. O valor mais elevado foi observado para o doce de leite com $F_0 = 20$ (106,15 Pa.s), seguido por $F_0 = 55$ e 35.

Quanto ao índice de comportamento de fluxo (n), houve uma queda significativa após o tratamento térmico, com o controle apresentando valor próximo de 1 (0,92), o que se aproxima de um comportamento aproximado de um fluido newtoniano. Já os doces tratados apresentaram valores entre 0,48 e 0,44, evidenciando seu caráter pseudoplástico. Produtos com n baixos ($n < 1$) indicam maior sensibilidade à força aplicada, apresentam alta viscosidade em repouso e fluidez sob cisalhamento (Rovedo *et. al.*, 1991).

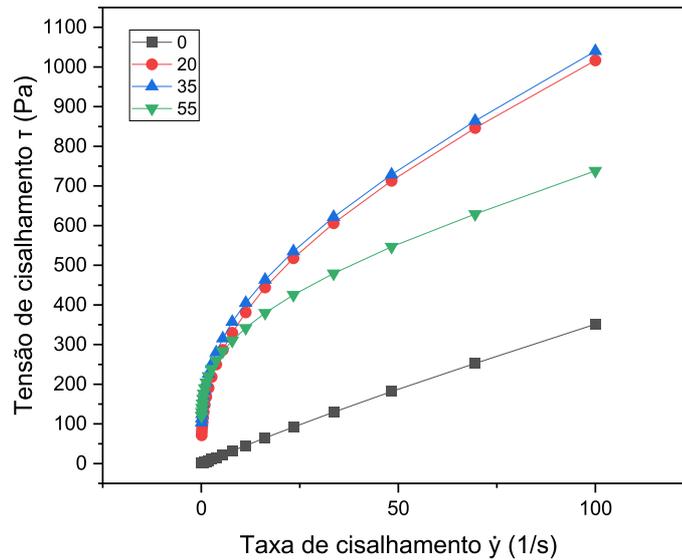
A viscosidade aparente média calculada a 100 s^{-1} de taxa de cisalhamento (η_a) também apresentou variações interessantes. O controle teve o menor valor (3,51 Pa.s), enquanto os valores mais altos foram encontrados em $F_0 = 20$ e 35 (10,17 e 10,40 Pa.s, respectivamente), com uma leve redução para $F_0 = 55$ (7,75 Pa.s). Essa redução pode estar associada à intensa exposição térmica, que, apesar de fortalecer a estrutura inicial, pode levar à degradação parcial de polímeros estruturantes como proteínas e açúcares, diminuindo a viscosidade final em taxas de cisalhamento elevadas.

A Figura 13, que representa a viscosidade em função da taxa de cisalhamento, confirma o comportamento pseudoplástico das amostras, à medida que o cisalhamento aumenta, a viscosidade diminui de forma exponencial, mais acentuadamente nas amostras tratadas. A curva do controle é significativamente inferior às demais, revelando uma matriz estrutural ainda pouco organizada. Os DL tratados (especialmente $F_0 = 20$ e 35) apresentam comportamento semelhante, com sobreposição das curvas, sugerindo que o ponto de consistência máxima ocorre antes do tratamento extremo de $F_0 = 55$.

Portanto, os dados obtidos demonstram que o tratamento térmico exerce forte influência nas propriedades reológicas do doce de leite, principalmente na estrutura do produto, refletindo no aumento da tensão de escoamento e na viscosidade aparente. Esses efeitos estão diretamente relacionados à evolução das reações físico-químicas discutidas nos tópicos anteriores, como a RM, a queda de pH, o aumento da acidez e a solubilização de cálcio coloidal. Assim, a reologia destaca-se como uma importante ferramenta complementar na caracterização do doce de leite, não apenas

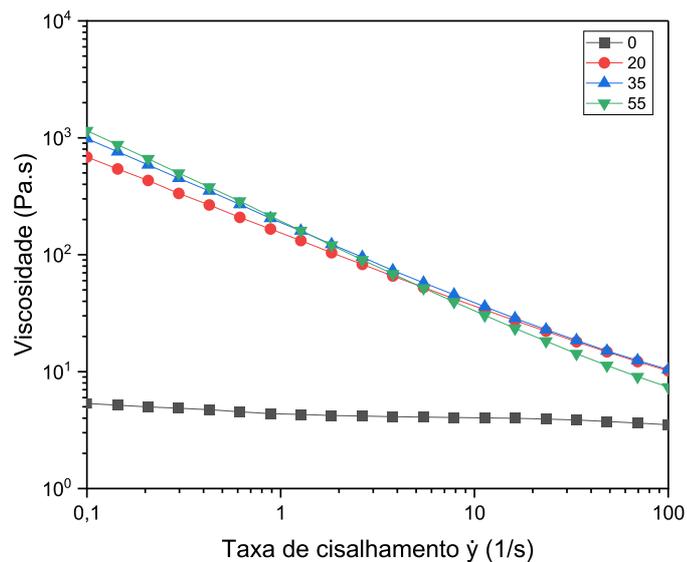
como um indicativo de textura, mas também como reflexo da história térmica e química do produto.

Figura 12 – Tensão de cisalhamento do doce de leite (Pa) com base na taxa de cisalhamento variando de 100 s^{-1} a $0,1 \text{ s}^{-1}$, a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 13 - Viscosidade aparente do doce de leite (Pa.s) baseada na taxa de cisalhamento descendente de 100 s^{-1} a $0,1 \text{ s}^{-1}$, a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Tabela 11 - Parâmetros do modelo *Herschel-Bulkley* (taxa de cisalhamento descendente) registrados para os doces de leite.

Parâmetros do modelo <i>Herschel-Bulkley</i>	Tratamento térmico/ min a 121,1°C			
	0 (Controle)	20	35	55
τ_0 - (Pa)	0,00 ± 0,00	43,62 ± 5,08	86,42 ± 0,36	108,76 ± 9,19
K - (Pa.s ⁿ)	5,09 ± 0,15	106,15 ± 15,81	96,23 ± 0,62	87,17 ± 0,62
n	0,92 ± 0,00	0,48 ± 0,03	0,49 ± 0,00	0,44 ± 0,36
R ²	1,000	1,000	0,999	0,998
η_a - (Pa.s)	3,51 ± 0,09	10,17 ± 0,12	10,40 ± 0,00	7,75 ± 0,00

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

τ tensão de cisalhamento aplicada (Pa); τ_0 tensão de escoamento inicial (Pa); K índice de consistência (Pa.sⁿ); n índice de comportamento do fluxo; $\dot{\gamma}$ taxa de deformação ou taxa de cisalhamento (s⁻¹)

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o tratamento térmico exerce influência significativa sobre as características físico-químicas, cromatográficas e reológicas do DL, com impacto direto na formação de compostos da RM, como o HMF, na modificação dos parâmetros de acidez e pH, na liberação de cálcio iônico, no escurecimento e na estrutura do produto final. A aplicação controlada de diferentes tempos de tratamento térmico em autoclave, com cálculo dos respectivos valores de F_0 , permitiu compreender o comportamento da matriz DL em condições progressivamente mais intensas, inclusive em um cenário extremo de 55 minutos a 121,1 °C.

A quantificação de HMF livre ao longo dos tratamentos evidenciou um comportamento inicial, exponencial e estacionário, representando a evolução da RM em resposta ao aquecimento. A introdução do conceito de HMF desenvolvido, baseado na aplicação de um reaquecimento padronizado a 90 °C por até 3 horas, revelou que, mesmo após o processamento, a matriz DL ainda apresenta potencial significativo de formação adicional de HMF. Este achado justifica o uso do termo “HMF desenvolvido” em vez de “HMF total”, frequentemente empregado na literatura, pois os dados indicam que valores tradicionalmente considerados como finais, como os obtidos com 1 hora de aquecimento, subestimam o verdadeiro potencial da matriz de gerar HMF sob condições estendidas.

As análises ao longo do *shelf life* demonstraram que a formação de HMF continua após o processamento e pela condição de estocagem. Observou-se um aumento significativo de HMF nos primeiros 15 dias, seguido de uma queda nos valores em D30, sugerindo que parte do HMF formado é consumido em reações subsequentes, principalmente na geração de pigmentos como melanoidinas, o que foi corroborado pelos dados de cor.

De fato, os parâmetros de cor mostraram que o escurecimento do DL aumenta com o tempo de aquecimento, como evidenciado pela redução dos valores de L e pelo aumento da absorbância a 420 nm, especialmente nos produtos mais aquecidos. No entanto, durante o *shelf life*, esse escurecimento se estabilizou, sugerindo que a maior parte da formação de melanoidinas ocorre ainda durante o tratamento térmico e que, após certo ponto, o sistema entra em equilíbrio, com pouca formação adicional desses pigmentos.

As análises físico-químicas de pH, Δ pH, acidez e cálcio iônico reforçaram o impacto do tratamento térmico sobre a estrutura coloidal da matriz. Observou-se que o aumento da intensidade térmica promoveu maior liberação de cálcio para a fase solúvel, o que pode ser associado à desestruturação das micelas de caseína em pH ácido, o que impacta diretamente na estabilidade proteica e na textura do produto.

Do ponto de vista reológico, os doces de leite tratados apresentaram comportamento pseudoplástico, ajustando-se adequadamente ao modelo de *Herschel-Bulkley*. Observou-se que o tratamento térmico elevou significativamente a tensão de escoamento e o índice de consistência dos produtos, enquanto reduziu o índice de comportamento de fluxo, confirmando maior resistência inicial ao escoamento e maior estruturação da matriz. Entretanto, a viscosidade aparente a 100 s^{-1} diminuiu no tempo mais extremo de aquecimento, em 55 minutos, sugerindo possível degradação ou reorganização estrutural em função do calor prolongado. Essa relação entre a estrutura reológica, cor, pH, cálcio e viscosidade evidencia o caráter multifatorial das transformações que ocorrem na matriz DL durante o processamento térmico.

Portanto, este trabalho contribui para o entendimento das alterações químicas e estruturais que ocorrem na produção de DL submetido a diferentes intensidades de tratamento térmico. Os dados obtidos aprofundam o conhecimento sobre a formação e evolução do HMF, por ser um tema mal definido na literatura para a matriz DL, a intensidade do escurecimento, os efeitos na estabilidade coloidal e as implicações reológicas desses fenômenos.

REFERÊNCIAS

- 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: an official publication of the United Nations University, International Network of Food Data Systems**, v. 95, n. 103665, 2021.
- BERTRAND, E.; BOUSTANY, E. P.; FAULDS, C.; BERDAGUÉ, J. The Maillard reaction in food: an introduction. **Reference Module in Food Science**, 2018. p. 1–10.
- BORGES, E.; MARCEL, B.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. Possibilidades e limitações no uso da temperatura em cromatografia líquida de fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 945–953, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n.º 354, de 4 de setembro de 1997. Regulamento técnico de identidade e qualidade de doce de leite. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n. 172, p. 37–38, 8 set. 1997. Seção I.
- BRASIL. **Determinação do Resíduo Mineral Fixo em Leite e Derivados Lácteos**. RS, 2014.
- BYLUND, G. Chapter 9 LONG-LIFE MILK. In: **Dairy Processing Handbook**. Tetra Pak International S.A., 2015.
- CARNEIRO, L. C. M.; PINTO, C. B. dos A.; GOMES, E. R.; PAULA, I. L. de; POMBO, A. F. W.; STEPHANI, R.; CARVALHO, A. F.; PERRONE, Í. T. The chemistry and technology of dulce de leche: a review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. e155101119408, 2021.
- CHÁVEZ-SERVIN, 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, p. 133–140, 2005.
- CIE COLORIMETRY COMMITTEE. Technical notes: working program on colour differences. **Journal of the Optical Society of America**, v. 64, p. 896–897, 1974.
- COLLINS, C. H. I. Michael Tswett e o “nascimento” da Cromatografia. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 1, p. 07–20, 2009.
- DA SILVA, P. H. F. **Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. 2003. 163 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Fennema’s Food Chemistry**. 4. ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2008.

DE ANDRADE, J. K.; KOMATSU, E.; PERREAULT, H.; TORRES, Y. R.; DA ROSA, M. R.; FELSNER, M. L. In house validation from direct determination of 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) in Brazilian corn and cane syrups samples by HPLC-UV. **Food Chemistry**, v. 190, p. 481–486, 2016.

DE OLIVEIRA, A. H. et al. Influence of spray drying conditions on the properties of whole goat milk. **Drying Technology**, p. 1–12, 2020.

FERRER, E. et al. Effects of thermal processing and storage on available lysine and furfural compounds contents of infant formulas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1817–1822, 2000.

FRANCISQUINI, J. D. 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. et al. 5-Hydroxymethylfurfural formation and color change in lactose-hydrolyzed dulce de leche. **Journal of Dairy Research**, v. 86, p. 477–482, 2019.

GADONSKI, A. P. et al. Avaliação do efeito cromático em resinas compostas nanoparticuladas submetidas a solução café. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 47, n. 3, p. 137–142, 2018.

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.

GOMES, R. A. R. et al. O setor de produtos lácteos. In: ZACARCHENCO, P. B.; VAN DENDER, A. G.; REGO, R. A. **Brasil DairyTrends 2020**. Ital, 2017. p. 29. Disponível em: <http://brasildairyrends.com.br/30/#zoom=z>. Acesso em: 10 fev. 2022.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

HODGE, J. E. **Chemistry of browning reactions in model systems**. J. Agric. Food Chem. 1953, 1, 928-43.

HORWITZ, W. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 20. ed. 2016.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO/TS 11869:2012 | IDF/RM 150:2012** – Fermented milks — Determination of titratable acidity — Potentiometric method. Geneva: ISO, 2012.

KAVOUSI, P. et al. Formation and reduction of 5-hydroxymethylfurfural at frying temperature in model system as a function of amino acid and sugar composition. **Food Chemistry**, n. 182, p. 164–170, 2015.

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

- LEWIS, M. J. The measurement and significance of ionic calcium in milk – A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 1, 2011.
- 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, 2021.
- MADHUMATHY, S. Water activity and its impacts on food stability. **International Journal of Food and Nutritional Sciences**, v. 10, n. 12, p. 832–851, 2021.
- MEKMENE, O.; LE GRAET, Y.; GAUCHERON, F. Theoretical model for calculating ionic equilibria in milk as a function of pH: Comparison to experiment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4440–4447, 2010.
- MONARO, E. L. F. Inibição da formação de produtos da reação de Maillard por extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em sistemas modelo alimento. 2012. 102 f. **Dissertação (Mestrado em Nutrição em Saúde Pública)** – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- MORALES, F. J.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: colour formation. **International Dairy Journal**, v. 8, 1998.
- MORALES, F. J. Hydroxymethylfurfural (HMF) and related compounds. In: **Process Induced Food Toxicants**: occurrence, formation, mitigation, and health risks. p. 135–174, 2009.
- MORALES, F. J.; ROMERO, C.; JIMÉNEZ-PÉREZ, S. Characterization of industrial processed milk by analysis of heat-induced changes. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 35, n. 2, p. 193–200, 2000.
- MULLAN, W. M. A. **Calculator for determining the lethality and chemical changes in UHT-heated products using the trapezoid and Simpson’s rules**. Disponível em: <https://www.dairyscience.info/uht-t/>. Acesso em: 17 set. 2024.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Composto de banco de dados **PubChem**, CID=237332. 2005. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/237332>. Acesso em: 5 mai. 2025.
- NEWTON, I. **Carta para Robert Hooke** baseada numa metáfora atribuída a Bernardo de Chartres. 1676.
- 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.

PENCI, M.; MARIN, M. Dulce de leche: technology, quality, and consumer aspects of the traditional milk caramel of South America. In: **Traditional Foods**, p. 123–136, 2016.

PERRONE, Í. T. et al. **Doce de leite – Química e Tecnologia**. Juiz de Fora: Cap Lab, Realização, 2019. 151 p.

PINTO, A. P. E. F.; WOLFSCHOON-POMBO, A. F. 5-Hidroximetilfurfural no doce de leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 39, p. 09–11, 1984.

PINTO, C. B. A. et al. Doce de leite production: an overview of the different industrial production technologies. **Dairy**, v. 6, 10, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/dairy6020010>.

PISTOLESI, D.; MASCHERPA, V. **F0 – A technical note: what it means, how to calculate it, how to use it for adjustment, control and validation of moist-heat sterilization processes**. Disponível em: <https://www.fedegari.com>.

RANALLI, N.; ANDRÉS, S. C.; CALIFANO, A. N. Physicochemical and rheological characterization of dulce de leche. **Journal of Texture Studies**, v. 43, n. 2, p. 115–123, 2011.

ROVEDO, C. O.; VIOLLAZ, P. E.; SUAREZ, C. The effect of pH and temperature on the rheological behavior of dulce de leche, a typical dairy Argentine product. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 5, p. 1497–1502, 1991.

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

SILVA, P. H. F.; SÁ, J. F. O.; PERRONE, Í. T. Composição físico-química, microbiológica, microscópica e perfil sensorial dos leites condensados produzidos no Mercosul. In: RENHE, I. R. T.; PERRONE, Í. T.; SILVA, P. H. F. (orgs.). **Leite condensado: identidade, qualidade e tecnologia**. Juiz de Fora: Templo, 2011. p. 170–195.

STAROWICZ, M.; ZIELIŃSKI, H. How Maillard reaction influences sensorial properties (color, flavor and texture) of food products? **Food Reviews International**, v. 35, n. 8, p. 707–725, 2019.

STEPHANI, R. **Doce de leite – mercado-ciência-tecnologia: o Brasil poderia ser o maior exportador mundial de doce de leite?** Juiz de Fora: Innovite Consultoria Eireli, 2023.

STEPHANI, R. et al. Dulce de leche – chemistry and processing technology. In: **Milk Production, Processing and Marketing**. London: IntechOpen, 2019. p. 1–18.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Nota sobre o método semi-micro Kjeldahl. **Revista do ILCT**, v. 35, n. 209, p. 39–40, 1980.