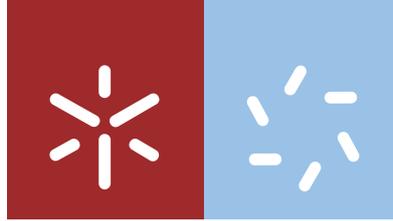




Universidade do Minho
Escola de Ciências

Teresa da Conceição Martins Nogueira

**Otimização da determinação e previsão
da extensão das reações de Maillard em
suplementos proteicos**



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Teresa da Conceição Martins Nogueira

**Otimização da determinação e previsão
da extensão das reações de Maillard em
suplementos proteicos**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho efetuado sob a orientação da
Engenheira Elisabete Cristina Neiva Araújo
e da
**Professora Doutora Sílvia Manuela Monteiro
Alves Pereira Lima**

outubro 2019

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença [abaixo](#) indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição

CC BY

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Agradecimentos

“O querer e o trabalho transformam um sonho em realidade”. Contudo, sem a ajuda imprescindível dos muitos que me acompanharam neste último ano, este sonho não teria chegado ao fim.

Começo por agradecer à minha orientadora, professora doutora Sílvia Lima, pela sua compreensão e disponibilidade para me receber e ouvir ao longo de todo o ano de tese. Agradeço ainda à minha supervisora na Prozis, Elisabete Araújo.

Agradeço ainda ao Professor António Vicente e em particular ao Pedro Silva, da Escola de Engenharia Biológica, pela excelente forma como me receberam no LIP e pelos equipamentos cedidos.

Aos meus colegas de laboratório Marta e o Luís por todo o apoio, paciência, transmissão de confiança e partilha de conhecimentos que se revelaram fundamentais para continuar este percurso.

Agradeço ainda aos responsáveis e colaboradores da Prozis pela excelente forma como me acolheram e apoiaram e pelos conhecimentos que me transmitem diariamente.

Aos meus pais e irmãos que estiveram sempre presentes, pelo apoio incondicional, pelos ensinamentos de vida e por sempre me incentivarem a continuar e nunca desistir.

Por último, mas não menos importante, um obrigada especial a todos os meus amigos que sempre estiveram lá nos bons e maus momentos.

Declaração de Integridade

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Resumo

Otimização da determinação e previsão da extensão das reações de Maillard em suplementos proteicos

O soro de leite é um subproduto da coagulação do leite, sendo atualmente muito procurado por parte das indústrias de suplementação alimentar por ser altamente rico em proteínas e lactose que fortificam os alimentos de modo a aumentar o seu valor nutricional. O soro de leite no estado líquido não é muito utilizado, no entanto, a sua produção excede as 140 milhões de toneladas, sofrendo posteriormente processos de desidratação e separação por membrana para produção de soro de leite em pó, soro de leite concentrado (WPC com teor proteico entre 35 e 80%) e soro de leite isolado (WPI com teor proteico superior a 90%).

Estes produtos são sensíveis quando sujeitos a diferentes temperaturas e a condições adversas de humidade, iniciando um conjunto de processos e reações que levam à formação de compostos corados e à sua degradação. Como o soro de leite contém um elevado teor de proteínas e de aminoácidos como a lisina, que reagem com açúcares redutores como a lactose, pode ocorrer a formação de produtos da reação de Maillard, a principal via de degradação do soro de leite. Esta reação é responsável pelo desenvolvimento de cor (*browning*) quando os produtos são sujeitos a um longo período de armazenamento.

Neste trabalho, foram analisadas amostras de soro de leite concentrado e isolado com diferentes períodos de armazenamento. Foi seguido o aumento da humidade e da atividade da água, cuja presença é responsável por um aumento da degradação do soro de leite. A extensão da degradação foi medida recorrendo a testes de alteração de cor. A quantificação da reação de Maillard foi conseguida seguindo a formação de um dos produtos da reação, o 5-hidroximetilfurfural, usando métodos espectrofotométricos, e seguindo a diminuição do teor de lisina e de lactose por cromatografia iónica.

Palavras-chave: *Browning*, Reação de Maillard, Soro de leite, WPC, WPI

Abstract

Optimization of quantification and prediction of the extension of Maillard reaction in protein supplements

Whey powder is a milk coagulation by-product, which is currently pursued by food supplementation industries due to its high protein and lactose concentration that increases food's nutritional value. Liquid whey is not widely used though, its production exceeds 140 million tonnes. This product is subsequently dehydrated and submitted to membrane separation processes in order to produce whey powder, concentrated whey (WPC with protein content between 35 and 80%) and isolated whey (WPI with protein content greater than 90%).

These products are sensitive to different temperatures and adverse humidity conditions, that initiate a set of processes and reactions that lead to the formation of coloured compounds and subsequent degradation. Whey powder is made up of a high content of proteins and amino acids, such as lysine, which reacts with reducing sugars like lactose. This process leads to the formation of Maillard reaction products, the main pathway of whey degradation. Maillard reaction is responsible for browning when products are subjected to a long storage period.

In this work, concentrated and isolated whey samples with different storage periods were analysed. The increase of moisture and water activity were followed, which are parameters that aggravate whey degradation. The extent of the degradation was measured using color change tests. The quantification of the Maillard reaction was achieved by analysing one of the reaction products, 5-hydroxymethylfurfural, using spectrophotometric methods, and following the decrease in lysine and lactose content by ion chromatography.

Key words: Browning, Maillard Reaction, Whey, WPC, WPI

Índice

DECLARAÇÃO	I
AGRADECIMENTOS	III
DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE.....	IV
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABELAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	1
2. INTRODUÇÃO.....	2
2.1. SORO DE LEITE	2
2.1.1. <i>Composição do soro de leite</i>	5
2.1.2. <i>Degradação do soro de leite</i>	6
2.2. REAÇÕES DE MAILLARD	7
2.2.1. <i>Reação de Maillard no soro de leite</i>	9
2.3. MÉTODOS ANALÍTICOS	13
2.3.1. <i>Método de Dumas para determinação de proteína</i>	13
2.3.2. <i>Método colorimétrico para avaliação das propriedades organolépticas</i>	14
2.3.3. <i>Cromatografia iônica</i>	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. MATERIAL DE TRABALHO	18
3.2. DETERMINAÇÃO DE HUMIDADE	20
3.3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA	20
3.4. DETERMINAÇÃO DA COR.....	21
3.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ÁGUA, A_w	21
3.6. DETERMINAÇÃO DE HMF POR ESPETROFOTOMETRIA.....	22
3.7. DETERMINAÇÃO DE LACTOSE POR CROMATOGRÁFIA IÔNICA	22
3.8. DETERMINAÇÃO DE LISINA POR CROMATOGRÁFIA IÔNICA	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. DETERMINAÇÃO DE HUMIDADE	26
4.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA	29

4.3.	DEGRADAÇÃO DO SORO DE LEITE PELA ALTERAÇÃO DA COR.....	31
4.4.	ESTUDO DA ATIVIDADE DE ÁGUA AO LONGO DO TEMPO	36
4.5.	DETERMINAÇÃO DE HMF	43
4.6.	ANÁLISE DE AMOSTRAS POR CROMATOGRAFIA IÓNICA	44
4.6.1.	<i>Determinação de lactose.....</i>	<i>44</i>
4.6.2.	<i>Determinação de lisina</i>	<i>49</i>
5.	CONCLUSÃO	54
6.	BIBLIOGRAFIA	56

Índice de Figuras

Figura 1 – Representação esquemática do processo de produção do soro de leite.....	3
Figura 2 – Fase inicial da reação de Maillard, da condensação entre o açúcar e o grupo amino à formação do produto de Amadori.....	8
Figura 3 - Estrutura base das melanoidinas.....	9
Figura 4 - Esquema inicial da reação de Maillard entre a lactose e a lisina.....	9
Figura 5 - Quebra do produto de Amadori no estado avançado da reação de Maillard, sob condições ácidas, neutras e básicas.....	11
Figura 6 - Estrutura química do 5-hidroximetilfurfural (HMF)	12
Figura 7 – Aspeto de uma amostra de WPC (à esquerda) e de uma amostra de WPI (à direita). 18	
Figura 8 - Gráfico da variação da humidade em amostras de WPC dos fornecedores A, B, C e D em função do tempo de armazenamento.	27
Figura 9 - Gráfico de variação de humidade em amostras de WPI do fornecedor A em função do tempo de armazenamento.	29
Figura 10 - Gráfico da variação do b^* , do “ <i>chroma</i> ”, do YI (índice de amarelo) e do Br (índice de <i>browning</i>) em amostras de WPC armazenadas em sacos de abertura zip dos fornecedores A, B, C e D em função do tempo de armazenamento das amostras.	32
Figura 11 - Gráfico da variação total de cor, ΔE , das amostras de WPC de saco de abertura zip do fornecedor A com diferentes tempos de armazenamento.	33
Figura 12 - Gráfico da variação do b^* , do “ <i>chroma</i> ”, do YI (índice de amarelo) e do Br (índice de <i>browning</i>) em amostras de WPI armazenadas em sacos de abertura zip do fornecedor A em função do tempo de armazenamento das amostras.....	34
Figura 13 - Gráfico da variação total de cor, ΔE , das amostras de WPI de saco de abertura zip do fornecedor A nos diferentes tempos de armazenamento.	35
Figura 14 – Pantom de cor das amostras de WPC (imagem de cima) e das amostras de WPI (em baixo) em função do tempo de armazenamento.	36
Figura 15 - Gráfico da atividade da água de amostras de WPC de sacos de abertura de zip dos fornecedores A, B, C e D, em função do tempo de armazenamento.	37
Figura 16 - Gráfico da atividade da água de amostras de WPC do fornecedor A armazenadas em sacos selados e em sacos de abertura zip.....	39

Figura 17 - Gráfico da atividade da água de amostras de WPI do fornecedor A em função do tempo de armazenamento.....	41
Figura 18 - Diagrama da atividade da água, com descrição das taxas de reação. ¹¹	41
Figura 19 - Gráfico do índice de <i>browning</i> do WPC e WPI em função da atividade da água.	42
Figura 20 - Cromatograma das soluções padrão dos cinco açúcares principais.	45
Figura 21 – Curva de calibração da lactose, obtida pelo equipamento cromatográfico	46
Figura 22 – Exemplo de cromatograma de deteção de açúcares de uma amostra de WPI.....	47
Figura 23 – Exemplo de cromatograma de deteção de açúcares de uma amostra de WPC.	48
Figura 24 – Cromatograma inicial das soluções padrão dos 20 aminoácidos essenciais.	50
Figura 25 – Cromatograma final das soluções padrão dos 20 aminoácidos essenciais.....	50
Figura 26 - Curva de calibração da lisina, obtida pelo equipamento cromatográfico.....	51
Figura 27 – Exemplo de cromatograma da deteção de aminoácidos em amostras de WPI.	52
Figura 28 – Exemplo de cromatograma de deteção de aminoácidos em amostras de WPC.	53

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Composição do soro de leite concentrado WPC e isolado WPI	4
Tabela 2 - Constituintes do leite e do soro de leite bovino	5
Tabela 3 – Principais aminoácidos presentes no soro de leite (WPC)	5
Tabela 4 - Composição e proporções dos constituintes do soro de leite ácido e doce	6
Tabela 5 – Designação das amostras de WPC em embalagens zip de diferentes fornecedores com diferentes tempos de armazenamento	19
Tabela 6 . Designação das amostras de WPI em embalagens zip do fornecedor A com diferentes tempos de armazenamento	19
Tabela 7 - Designação das amostras de WPC em embalagens seladas do fornecedor A com diferentes tempos de armazenamento	20
Tabela 8 - Valores de humidade obtidos na análise de WPC (%H ₂ O) e valores referentes à humidade inicial (%H ₂ O _i), assim como a variação do teor de humidade (Δ %H ₂ O) e respetivos desvios padrão (σ)	27
Tabela 9 – Valores de humidade obtidos na análise de WPI (%H ₂ O) e valores referentes à humidade inicial (%H ₂ O _i), assim como a variação do teor de humidade (Δ %H ₂ O) e respetivos desvios padrão (σ)	28
Tabela 10 - Teor de proteína obtido (%P) em amostras de WPC com diferentes tempos de armazenamento e comparação com teor de proteína inicial (%P _i)	30
Tabela 11 - Teor de proteína obtido (%P) em amostras de WPI com diferentes tempos de armazenamento e comparação com teor de proteína inicial (%P _i)	30
Tabela 12 - Valores de atividade de água (a _w) de amostras de WPC dos fornecedores A, B, C e D em sacos de abertura zip e respetivos coeficientes de variação (CV%)	37
Tabela 13 - Valores de atividade de água de amostras de WPC, do fornecedor A, em sacos selados e respetivos coeficientes de variação (CV%).	38
Tabela 14 - Valores de atividade de água de amostras de WPI do fornecedor A, em sacos de abertura zip e respetivos coeficientes de variação (CV%)	40
Tabela 15 – Concentração média de HMF obtido para amostras de WPC armazenadas em sacos de abertura fácil do fornecedor A, para diferentes tempos de armazenamento	43

Tabela 16 – Valores médios da área do sinal obtidos para as diferentes concentrações de solução padrão de lactose	46
Tabela 17 – Valores médios do teor de lactose obtidos experimentalmente (%Lac) em amostras de WPI ao longo do tempo de armazenamento e comparação com os valores iniciais (%Laci)	47
Tabela 18 – Valores médios de área utilizados para a construção da nova curva de calibração de lactose	48
Tabela 19 - Valores médios do teor de lactose obtidos experimentalmente (%Lac) em amostras de WPC ao longo do tempo de armazenamento e comparação com os valores iniciais (%Laci).....	49
Tabela 20 – Valores médios da área do sinal obtidos para as diferentes concentrações de solução padrão de lisina	51
Tabela 21 – Valores médios do teor de lisina obtidos experimentalmente (m_{AA}) em amostras de WPI ao longo do tempo de armazenamento	52
Tabela 22 - Valores do teor de lisina obtidos experimentalmente (m_{AA}) em amostras de WPC ao longo do tempo de armazenamento	53

Lista de Abreviaturas

- IC** - Cromatografia iónica (do inglês *Ionic Chromatography*)
- WPC** - Concentrado proteico de soro de leite (do inglês *Whey Protein Concentrate*)
- WPI** - Proteína isolada do soro de leite (do inglês *Whey Protein Isolate*)
- BOD** - Necessidade bioquímica de oxigénio (do inglês *Biochemical Oxygen Demand*)
- COD** - Necessidade química de oxigénio (do inglês *Chemical Oxygen Demand*)
- EDTA** - Ácido etilenodiamino *tetra*-acético
- Glc** - Glucose
- Gal** - Galactose
- HMF** - 5-hidroximetilfurfural
- ICP** - Plasma indutivamente acoplado (do inglês *Inductively Coupled Plasma*)
- Lac** - Lactose
- RGB** - Modelo de cor vermelho-verde e azul (do inglês *Red, Green and Blue*)

1. Contextualização

A ideia da criação de uma empresa de suplementação desportiva surgiu quando, aos 23 anos, o empresário Miguel Milhão, em sequência de lesões frequentes enquanto atleta federado de natação, se deparou com a evidência de que estes produtos eram de elevado custo e de difícil acesso no mercado nacional. Juntamente com Jorge Silva, atual administrador da empresa e, na altura, proprietário de uma empresa de software, a McWin, conseguiram pôr esta ideia em prática.

Assim, em 2006, foi fundada a empresa Prozis, com sede em Esposende que, atualmente, devido à sua necessidade de expansão possui uma unidade fabril na Póvoa de Lanhoso e um centro tecnológico de I&D na Maia.

Apesar de ter sido destinada para a área do retalho de produtos de nutrição desportiva, rapidamente foi reconhecida como uma empresa de tecnologia, logística e serviços. Tornou-se deste modo, no líder europeu em nutrição desportiva e alimentação funcional, desenvolvendo os seus próprios produtos que potenciam o bem-estar e a performance física, assegurando a elevada qualidade, beleza e autenticidade dos mesmos.

A qualidade dos produtos é garantida pelo departamento de controlo de qualidade, no qual foi desenvolvido este trabalho, cujo objetivo foi o estudo da degradação do soro de leite, principal constituinte dos produtos *Whey* desenvolvidos pela empresa.

2. Introdução

O soro de leite é um subproduto da produção de queijo e de caseína, com um elevado valor nutricional e energético.¹

Durante muitos anos, o soro de leite não foi valorizado, sendo utilizado em ração para animais e descartado para cursos de água e terra. A sua eliminação deliberada para o meio ambiente causa graves danos, uma vez que este é considerado um produto altamente poluente, com um BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) entre 30000 - 50000 mg/L e um COD (*Chemical Oxygen Demand*) entre 60000 - 80000 mg/L. Este subproduto provoca eutrofização do meio aquático, uma vez que a elevada concentração de nutrientes presentes no soro, favorece a proliferação de microrganismos, que por sua vez, consomem elevadas quantidades de oxigénio, causando um desequilíbrio entre o oxigénio presente no meio e a procura deste pelos seres vivos, alterando a fauna e flora locais.²

Por esse motivo, o Conselho da União Europeia catalogou, a 24 de setembro de 1996, o soro de leite como sendo um resíduo contaminante, proibindo o seu escoamento para o ecossistema. Esta decisão levou muitas empresas a desenvolver processos de conversão do soro lácteo em produtos alimentares reconhecidos como tendo um elevado valor nutricional e funcional.³

Deste modo, com o reaproveitamento do soro de leite é possível diminuir o seu impacto a nível ambiental e facultar às indústrias uma matéria prima de elevado valor nutricional, tendo sido desenvolvidos novos métodos para separação, concentração e purificação dos seus constituintes. Podem ser obtidos produtos tão variados como fórmulas infantis, gelados, produtos de higiene, assim como suplementos proteicos para regeneração muscular em desportistas.⁴

2.1. Soro de leite

O soro de leite é uma substância aquosa produzida após coagulação da caseína no leite (ácida ou enzimática) durante a produção de queijo, cuja composição varia de acordo com a origem do leite e os processos envolvidos na sua produção (**Figura 1**).⁵

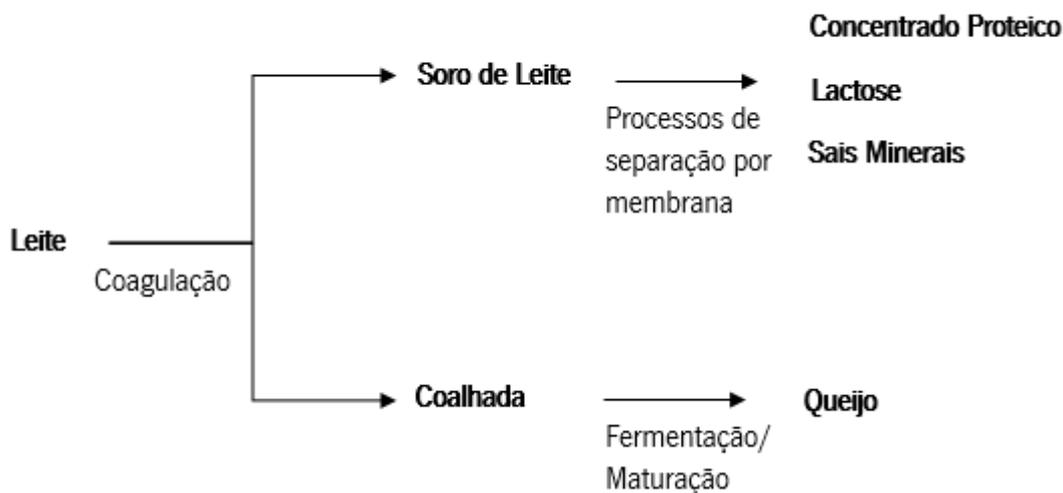


Figura 1 – Representação esquemática do processo de produção do soro de leite.⁵

Após produção do soro de leite, este é sujeito a diferentes processos como a remoção da água, aumento da proporção de proteína e alteração da sua composição mineral, havendo assim um maior aproveitamento deste subproduto.

O primeiro processo é denominado de secagem por pulverização e consiste na remoção de água do soro de leite, sujeitando-o a elevadas temperaturas por um curto período de tempo, obtendo o soro de leite em pó. Anualmente, por 140 milhões de toneladas de soro de leite produzidos, 20% é seco correspondendo a 1,8 milhões de toneladas de pó.⁶

De seguida, o soro de leite em pó, pode ser sujeito a processos de separação por membrana, que permitem a separação, concentração e fracionamento das proteínas do soro e da lactose. Osmose reversa, nanofiltração, ultrafiltração e microfiltração são algumas das técnicas disponíveis para tal.^{4,7,8}

A ultrafiltração é o processo mais utilizado para aumentar a concentração de proteína nos produtos de soro de leite, produzindo concentrados proteicos de soro de leite, também denominados de WPC's – *Whey Protein Concentrate*. Este método consiste na filtração do soro de leite através de uma membrana porosa, permitindo a passagem de componentes de baixo peso molecular, como a lactose e sais minerais, e retendo componentes de maior peso molecular, como

as proteínas. Assim, o produto retido na membrana de ultrafiltração vai ser mais rico em proteínas que o soro de leite original e o produto que atravessou a membrana é mais rico em lactose e sais.

Os concentrados proteicos são produzidos a partir de uma elevada variedade de soros de leite e a sua concentração proteica varia entre 35% e 90%, sendo estes últimos os mais procurados pela indústria alimentar, uma vez que são caracterizados pelas suas propriedades funcionais desejáveis de gelatinização, emulsificação e retenção de água.³

Podem ser distinguidos diferentes tipos de concentrados proteicos de soro de leite, este projeto dedicou-se à análise dos tipos: concentrado (WPC) e isolado (WPI – *Whey Protein Isolate*), estes diferem principalmente na sua composição, uma vez que o WPI tem uma concentração de proteína de 90 % e, proporcionalmente, menor concentração de lactose e minerais, que o WPC, que tem cerca de 80% de proteína (**Tabela 1**).¹

Tabela 1 – Composição do soro de leite concentrado (WPC) e isolado (WPI) ¹

Componentes	WPC (%)	WPI (%)
Humidade	4,14 - 6,01	2,4 - 5,57
Proteína	72,0 - 76,6	88,6 - 92,7
Lactose	2,13 - 5,75	0,42 - 0,46
Cinza	2,52 - 6,04	1,37 - 2,15
Sódio	0,15 - 1,71	0,36 - 0,42
Potássio	0,07 - 0,46	0,10 - 0,16
Cálcio	0,23 - 1,05	0,20 - 0,24
Magnésio	0,02 - 0,40	0,02 - 0,03
Fósforo	0,20 - 1,30	0,05

O processamento do soro de leite para produção do soro de leite em pó permite que a manutenção da sua qualidade seja prolongada, o teor de sólidos do produto seco seja constante e as variações sazonais sejam minimizadas. Sendo possível encontrar produtos alternativos que sejam atrativos para os consumidores, a partir de tecnologia alternativa de baixo custo mais atrativa para os produtores.

2.1.1. Composição do soro de leite

Do ponto de vista nutricional o soro de leite caracteriza-se por ser uma excelente fonte de lactose, proteínas, péptidos e aminoácidos funcionais, assim como certos lipídios, vitaminas e minerais, que permitem a produção de alimentos com elevado valor nutricional, comparativamente a outros produtos do mercado.⁹

Apresenta um menor teor de caseínas e lipídios, comparativamente ao leite, e um elevado teor de proteína uma vez que as proteínas do soro de leite não coagulam aquando da produção do queijo, permanecendo em solução. As proteínas do soro compreendem 50% de β -lactalbumina, 25% de α -lactalbumina e 25% proteínas como imunoglobulinas, lactoferrinas, entre outras (Tabela 2 e 3).³

Tabela 2 - Constituintes do leite e do soro de leite bovino ⁹

Componentes	Teor % (p/v)	
	Leite	Soro de leite
Caseína	2,8	< 0,1
Proteína do soro	0,7	0,7
Lípidos	3,7	0,1
Cinza	0,7	0,5
Lactose	4,9	4,9
Sólidos totais	12,8	6,3

Tabela 3 – Principais aminoácidos presentes no soro de leite (WPC)

Aminoácido	m/100 g de proteína (g)	Aminoácido	m/100 g de proteína (g)
Ácido Glutâmico	13,9	Alanina	3,8
Ácido Aspártico	10,2	Fenilalanina	2,6
Leucina	7,8	Tirosina	2,3
Lisina	6,5	Cistina	2,2
Treonina	5,3	Metionina	1,9
Isoleucina	4,7	Triptofano	1,8
Prolina	4,5	Arginina	1,8
Valina	4,4	Glicina	1,4
Serina	3,8	Histidina	1,4

O soro lácteo pode ser classificado em soro de leite doce ou ácido e as suas principais diferenças residem na concentração de minerais presente, na acidez e na composição das frações proteicas do soro (Tabela 4).³

Tabela 4 - Composição e proporções dos constituintes do soro de leite ácido e doce ¹⁰

Componentes	Soro de leite ácido (g/L)	Soro de leite doce (g/L)
Total de sólidos	63,0-70,0	63,0-70,0
Lactose	44,0-46,0	46,0-52,0
Proteína	6,0-8,0	6,0-10,0
Cálcio	1,2-1,6	0,4-0,6
Fosfato	2,0-4,5	1,0-3,0
Lactato	6,4	2,0
Cloreto	1,1	1,1

O soro de leite ácido, apresenta um pH inferior a 5 e resulta de processos que recorrem à fermentação, à adição de ácidos orgânicos ou adição de minerais para coagulação da caseína. Este soro é formado na produção de queijos *Cottage* e *Ricotta*, por exemplo.

O soro de leite doce é o mais comum e resulta da produção de queijos como o *Cheddar* e o *Mozzarella*. Neste a coagulação da caseína ocorre pela ação da quimosina, com baixos níveis de acidez, possuindo um pH entre 5,8 e 6,6.

2.1.2. Degradação do soro de leite

A produção do soro de leite em pó envolve uma série de processos contínuos como o tratamento térmico, a evaporação e a secagem por pulverização. A estes processos estão associadas variáveis que afetam a eficiência do processo e a qualidade do produto, uma vez que causam inúmeras interações físicas e químicas nos constituintes do leite.

Os processos físicos envolvendo a gordura e a lactose, juntamente com reações químicas, diminuem o tempo de vida útil do soro de leite em pó assim como de outros produtos derivados do leite. Longos períodos de armazenamento levam à perda do seu valor nutricional, por perda de

lisina e das qualidades sensoriais, bem como das propriedades funcionais e físicas que são importantes para o uso do soro de leite como ingrediente em produtos alimentares.

A qualidade do soro de leite em pó é influenciada por diversos fatores durante o seu processamento e armazenamento, entre os quais, os parâmetros e técnicas adotadas durante a produção, as técnicas e condições de secagem do soro de leite e as condições de armazenamento.

Existem três processos principais de deterioração do soro de leite que determinam o seu tempo de vida útil, sendo elas a cristalização da lactose, a oxidação lipídica e as reações de Maillard (reação não enzimática de escurecimento).¹¹

A reação de Maillard é o nome genérico de uma classe importante de reações deteriorativas em produtos derivados de leite. Esta inicia-se com a condensação da lactose com um grupo amino livre das cadeias laterais da lisina presente nas proteínas do leite.

2.2. Reações de Maillard

O soro de leite representa uma elevada porção do comércio de produtos lácteos, uma vez que é utilizado diretamente pelos consumidores e como ingrediente numa elevada variedade de produtos alimentares produzidos. Estes têm um baixo teor de humidade e gordura e, quando armazenado em condições secas e arrefecidas, têm um tempo de vida que excede os dois anos. No entanto, este produto possui uma concentração relativamente elevada de lactose (50%) e de proteínas (8%) com lisina na sua constituição, que na presença de humidade rapidamente participam na reação de Maillard, conhecida como o principal mecanismo de deterioração ativo durante o armazenamento deste tipo de produtos. Resulta na diminuição da qualidade proteica e na alteração indesejada das propriedades organoléticas.

Esta reação não enzimática é afetada por fatores químicos como a concentração das espécies iniciais, o pH, teor de água e presença de substâncias humidificadoras ou bissulfito, e por fatores físicos como a temperatura e tempo de processamento e armazenamento. Para além de levar à diminuição do valor nutricional do soro de leite, leva também ao desenvolvimento de sabores atípicos, cor indesejada, diminuição da solubilidade, mudança de textura, destruição de vitaminas e aumento da acidez.¹²

As reações de Maillard são reações que ocorrem de uma forma espontânea e natural, envolvendo uma rede complexa de reações não enzimáticas reversíveis em determinadas condições de temperatura e atividade da água. Podem ser divididas em três fases: reações de Maillard iniciais, intermédias e finais. Esta divisão permite sistematizar as reações.

Na fase inicial um grupo amino de um aminoácido, péptido ou proteína reage, por condensação, com uma variedade de compostos que contenham um grupo carbonilo, tipicamente com açúcares redutores (glucose, frutose ou lactose) ou seus derivados. Esta reação forma uma base de Schiff, uma glicosilamina (imina) instável, que sofre rearranjo formando uma aminodesoxicetose, um produto de Amadori (**Figura 2**).¹³

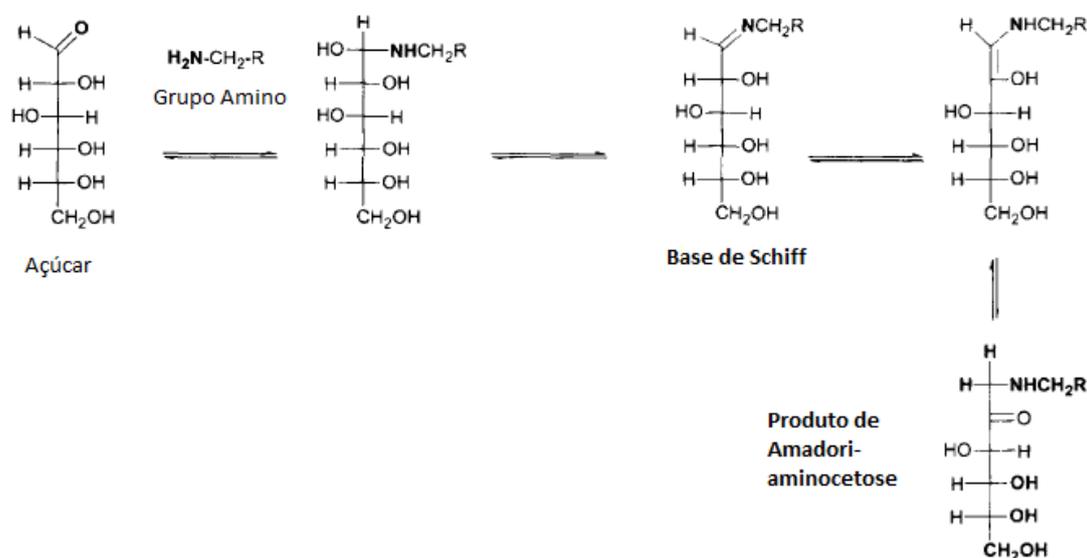


Figura 2 – Fase inicial da reação de Maillard, da condensação entre o açúcar e o grupo amino à formação do produto de Amadori.¹⁴

As reações de Maillard intermédias consistem na quebra do produto de Amadori com formação de diversos produtos que seguem diferentes processos dependendo do pH do meio.

Por fim, as reações de Maillard finais levam ao desenvolvimento de melanoidinas (**Figura 3**), compostos de elevado peso molecular, que são responsáveis pelo aparecimento da cor acastanhada nos produtos.

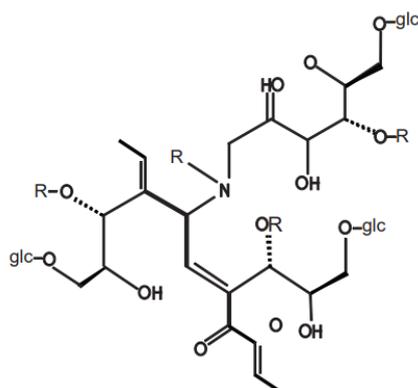


Figura 3 - Estrutura base das melanoidinas (R=H; glc=glucose).¹⁵

2.2.1. Reação de Maillard no soro de leite

No soro de leite, a reação de Maillard, ocorre entre o grupo amino da cadeia lateral dos resíduos de lisina e o grupo carbonilo redutor da lactose. Na forma aberta, o aldeído deste açúcar, forma uma base de Schiff com a lisina que sofre rearranjo via Amadori, formando um produto de Amadori ligado à proteína, 1-desoxi-1-amino-lactulosilina. Este composto é estável, desde que as condições de temperatura não sofram variações drásticas e o tempo de reação não seja prolongado. Nesta fase há perda de valor nutritivo do soro de leite, devido ao bloqueio dos resíduos de lisina que deixam de estar disponíveis para a digestão (Figura 4).¹²

Com a formação do produto de Amadori as reações começam a ser mais complexas, uma vez que a sua degradação gera uma grande variedade de subprodutos de baixo peso molecular, alguns dos quais responsáveis pelo desenvolvimento de mau sabor.

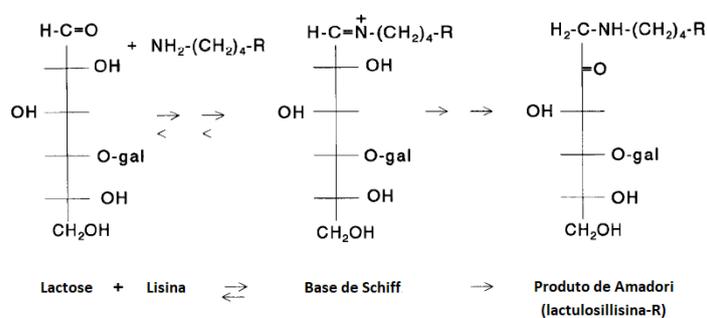


Figura 4 - Esquema inicial da reação de Maillard entre a lactose e a lisina. (gal= galactose, R= cadeia proteica).¹⁶

Na fase intermédia, o produto de Amadori é sujeito a quebra por três vias principais originando a 3-desoxiosona, por meio da 1,2-enolização a pH ácido, a 1-desoxiosona por 2,3-enolização a pH neutro ou alcalino, e a 4-desoxiosona, sendo esta última mais importante em dissacarídeos em condições ligeiramente alcalinas. Todas as vias levam à formação de desoxiosonas, que são intermediários muito reativos, facto que dificulta a sua quantificação. A enolização, ciclização e eliminação de água representam as principais etapas de reação para transformação de desoxiosonas.¹⁷

A via da 3-desoxiosona (**Figura 5, via A**) leva à formação de hidroximetilfurfural (HMF) e pirralina, que são produtos formados em aquecimento, mas em pequenas quantidades.¹⁶

A formação da 1-desoxiosona (**Figura 5, via B**) é a via mais importante a pH neutro. A ciclização e enolização da 1-desoxiosona leva à formação de β -piranona e 3-furanona, que são compostos instáveis, enquanto que a fragmentação resulta em redutonas e α -dicarbonilos.¹⁶

A terceira via de degradação do produto de Amadori, a via da 4-desoxiosona (**Figura 5, via C**) é importante para dissacarídeos, sob condições alcalinas. Os dois produtos que são formados, a 4-desoxiaminoreductona e 5,6-dihidro-3-hidroxi-piridona são degradados após um aquecimento prolongado.¹⁶

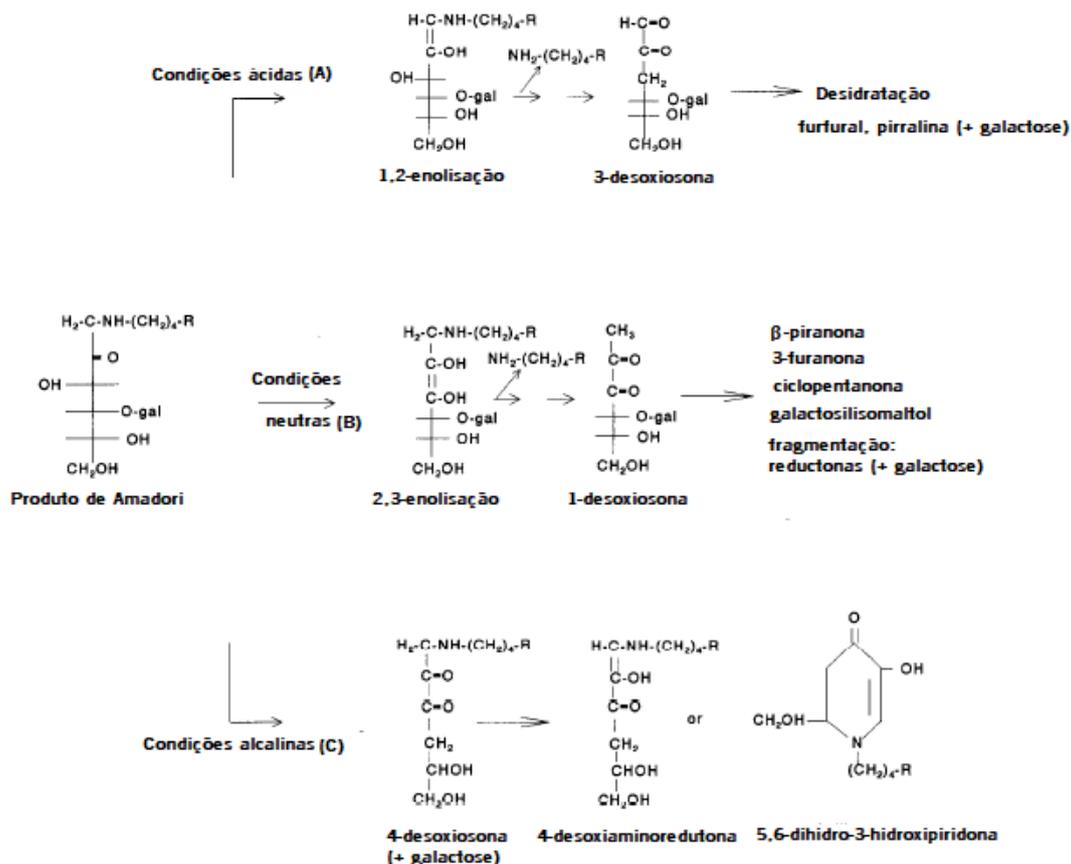


Figura 5 - Quebra do produto de Amadori no estado avançado da reação de Maillard, sob condições ácidas, neutras e básicas (gal=galactose, R=cadeia proteica).¹⁶

A fase final da reação de Maillard ainda não está bem caracterizada do ponto de vista químico. No entanto, sabe-se que são formados pigmentos acastanhados, que provêm da formação de melanoidinas. Estes compostos têm um elevado peso molecular e contêm azoto na sua constituição. No entanto, os pigmentos castanhos são também formados sem a presença de azoto, pela degradação do açúcar. Os resíduos de lisina devem estar envolvidos na formação das melanoidinas, uma vez que a perda de lisina aumenta durante a fase final.¹⁶

Do ponto de vista analítico, são muitos os intermediários da reação de Maillard que possuem um papel fundamental na segurança alimentar e na perda nutricional, alguns dos quais estão associados à formação do produto de Amadori.

Existem três métodos diretos que permitem quantificar o produto de Amadori. Pela determinação de furosina, um aminoácido artificial que se forma por hidrólise ácida do produto de

Amadori, no entanto, apenas 30-40% do produto de Amadori é convertido em furosina. Do restante, 50% é reconvertido em lisina e 10-20% em piridoxina (outro aminoácido artificial). Outra estratégia de quantificação baseia-se na oxidação do produto de Amadori com ácido periódico seguida de hidrólise ácida da proteína, obtendo-se carboximetilisina (CML).¹⁸

Pode ainda ser induzida a formação de hidroximetilfurfural, HMF, por aquecimento à ebulição do produto de Amadori, em ácido oxálico. Apesar de apenas 10% deste ser transformado em HMF, é frequentemente utilizado como indicador de degradação por ação da temperatura (Figura 6).¹⁸

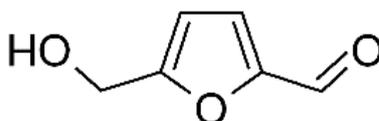


Figura 6 - Estrutura química do 5-hidroximetilfurfural (HMF).¹⁹

5-(hidroximetil)furano-2-carbaldeído, também conhecido como 5-hidroximetil-2-furfuraldeído ou HMF, é um composto bem conhecido na tecnologia alimentar, porque este é um produto da reação de transformação de hexoses. A sua importância está relacionada com o seu efeito no escurecimento de vários fluidos alimentares como mel e leite e com o desenvolvimento de aromas e sabores diferentes. A sua presença em alimentos processados é um indicador de alterações resultantes da temperatura, assim como do tempo e condições de armazenamento.²⁰

Do ponto de vista químico, o HMF é um furanoaldeído com fórmula molecular $C_6H_6O_3$, peso molecular de 126,111 Da e com aparência sólida e cristalina, apresentando características sensoriais peculiares (cheiro a “flores de camomila” e sabor semelhante a caramelo ou manteiga), o seu ponto de fusão é $31,5^{\circ}C$, sendo solúvel em água e em solventes orgânicos comuns.¹⁸

Esta molécula é considerada tóxica, tendo ainda sido reportado que os produtos resultantes da reação de Maillard e seus intermediários podem causar danos genotóxicos e mutagênicos. Ao nível do consumo humano, tem sido reportado que só deve ser ingerido entre 30 a 150 mg de HMF, diariamente. No entanto, existe ainda uma falta de evidências que comprovem tal facto.²¹

A presença de HMF é amplamente reconhecida como parâmetro para determinação da validade do soro de leite, uma vez que este, tipicamente, se encontra ausente, havendo um aumento da sua concentração durante o processo de armazenamento. Existem diferentes estratégias para a sua deteção e quantificação desde a colorimetria, cromatografia gasosa e líquida ou espectrofotometria, sendo que esta última se revelou uma técnica simples e sensível o suficiente para ser utilizada rotineiramente numa indústria.²²

2.3. Métodos Analíticos

Atendendo aos processos degradativos anteriormente citados torna-se claro que a utilização do soro de leite e sua aplicação só pode ser feita após se verificar se o produto mantém a sua integridade, o que pode ser conseguido utilizando vários métodos analíticos.

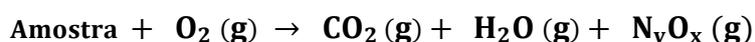
2.3.1. Método de Dumas para determinação de proteína

Tal como já foi dito, os concentrados de soro de leite, WPC's, são produtos altamente ricos em proteína, sendo um dos motivos pelo qual são amplamente utilizados em suplementação alimentar. Uma vez que a lisina participa na reação de Maillard, torna-se interessante perceber se o teor proteico também variava ao longo do tempo de armazenamento.

O método para determinação de proteína mais utilizado pela indústria é o método de Dumas, este determina o nitrogénio presente em compostos orgânicos, sendo possível calcular o teor de proteína a partir deste.²³

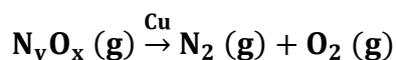
Este método de determinação possui três etapas:

A **combustão**, na qual a amostra, previamente homogeneizada e pesada sofre combustão a elevadas temperaturas, entre 800 e 1000 °C, num forno e na presença de oxigénio puro. Esta combustão produz substâncias como dióxido de carbono, água e vários óxidos de nitrogénio (N_yO_x).



A **redução e separação** - neste passo os produtos da combustão passam por colunas com cobre a elevadas temperaturas para remoção do oxigénio e conversão de óxidos de nitrogénio em

nitrogénio molecular. A amostra passa ainda por colunas que removem a água e dióxido de carbono residuais.



A última etapa é a **detecção**, na qual o nitrogénio da amostra é detetado por um detetor de condutividade térmica e o sinal é convertido e quantificado em nitrogénio total (N). Uma vez que o nitrogénio assim detetado pode não ser todo proveniente de proteínas, este valor é multiplicado por um fator para obter o teor proteico. Determinações anteriores mostraram que a média de nitrogénio (N) presente em proteínas do leite é de aproximadamente 15,7%, o que leva ao uso do fator 6,38 (1/0,157) para o cálculo do teor de proteína ($P=N \times 6,38$).^{21,22}

2.3.2. Método colorimétrico para avaliação das propriedades organoléticas

A aparência é um dos principais fatores utilizados pelos consumidores para avaliar a qualidade do produto. Para tal, é utilizado como fator de avaliação a cor, que pode ser descrita no sistema de cor definido pela Comissão Internacional de Iluminação por diferentes coordenadas.

Neste sistema são utilizadas as coordenadas L^* , a^* e b^* obtidas diretamente pelo colorímetro. A coordenada a^* toma valores positivos para cores vermelhas e valores negativos para cores verdes, a coordenada b^* toma valores positivos para cores amarelas e valores negativos para cores azuis. Quanto à coordenada L^* , esta corresponde a uma medida aproximada da luminosidade e pode ser considerada equivalente numa escala de cinza, entre o preto e o branco, ($L^*= 0$ corresponde ao preto e $L^*= 100$ corresponde ao branco).²⁴

Existem diversos parâmetros calculados com base nestas coordenadas que permitem avaliar a diferença de coloração. O “*Chroma*”, (C^*), é considerado um atributo quantitativo de coloração e determina o grau de diferença entre a tonalidade da amostra e a tonalidade cinzenta, para a mesma luminosidade. Quanto maior este parâmetro, maior vai ser a intensidade de tonalidade das amostras, percebida pelo olho humano (**Equação 1**).

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Equação 1})$$

Um outro parâmetro é a tonalidade angular, “*hue angle*” (h^*), este é um atributo qualitativo da cor que permite avaliar se a amostra é de tonalidade verde, vermelha, azul ou amarela. É

definido pela diferença entre a cor a analisar e a cor cinzenta, para a mesma luminosidade. Quando o ângulo é de 0° ou 360° a matriz é de cor vermelha, quando o ângulo é de 90°, 180° e 270°, a matriz de análise é de cor amarela, verde e azul, respectivamente (Equação 2).²⁴

$$h_* = \tan^{-1} \frac{b_*}{a_*} \text{ (Equação 2)}$$

Para avaliar mudanças na cor, recorre-se à diferença total de cor, ΔE , este parâmetro determina a intensidade da cor das amostras, por comparação da amostra com uma amostra padrão. Para valores entre 0 e 1 um observador não consegue notar diferença entre amostras, quando ΔE está compreendido entre 1 e 2 apenas um observador com experiência consegue perceber diferenças. Quando os valores se encontram entre o 2 e 3,5 também observadores inexperientes notam diferenças; para valores entre o 3,5 e o 5 existe uma diferença clara na coloração e, para valores superiores a 5, o observador vê duas cores diferentes (Equação 3).²⁵

$$\Delta E_* = \sqrt{\Delta a_*^2 + \Delta b_*^2 + \Delta L_*^2} \text{ (Equação 3)}$$

As coordenadas CIELAB permitem ainda caracterizar o índice de amarelo, “*yellowness*” (YI) e o índice de “*browning*” (BI). O índice de amarelo está associado à degradação do produto devido à luz, exposição química e processamento, quantificando estes tipos de degradação num valor único (Equação 4). O índice de “*browning*” é um indicador de uma alteração química ou alteração de cor por oxidação durante o tempo de armazenamento (Equação 5 e 6).^{24,25}

$$YI = \frac{142,86 b_*}{L_*} \text{ (Equação 4)}$$

$$x = \frac{(a_* + 1,75L_*)}{(5,645L_* + a_* - 3,012b_*)} \text{ (Equação 5)}$$

$$BI = \frac{[100(x - 0,31)]}{0,17} \text{ (Equação 6)}$$

2.3.3. Cromatografia iónica

Os métodos cromatográficos têm sido vastamente utilizados em escalas preparativas e analíticas. Eles permitem separar e determinar componentes polares e não polares, substâncias orgânicas de não orgânicas, compostos ácidos, neutros ou alcalinos, polímeros e monómeros. É necessário utilizar o tipo de cromatografia adequado à amostra examinada e seus componentes.

A cromatografia iónica, é uma cromatografia líquida de elevada performance utilizada para separar e quantificar formas aniónicas e catiónicas, assim como outras substâncias, após serem convertidas em formas iónicas. Este método utiliza colunas analíticas, semi-micro e capilares de elevada performance, preenchidas com partículas homogéneas de pequeno diâmetro e, muito frequentemente, com deteção condutivimétrica, para catiões, aniões e ácidos ou bases orgânicos fracos, e deteção eletroquímica, para estruturas orgânicas como é o caso dos açúcares e aminoácidos.²⁶

Esta técnica analítica pode ainda ser acoplada a outro tipo de técnicas analíticas, tais como absorção atómica ou ICP onde se pode diferenciar o elemento pelo seu estado oxidativo.

É um método mais eficiente, rápido e sensível que o método clássico de cromatografia de troca iónica, oferecendo também uma elevada repetibilidade nos resultados obtidos.

Aquando da análise de uma amostra, os iões do analito junto com os iões do eluente, passam através da coluna analítica, na qual a troca iónica tem lugar. A afinidade dos iões do analito à fase estacionária é diversa, pelo que alguns ficam ligados com mais força à coluna que outros. À medida que a força iónica do eluente aumenta, aumenta também a capacidade do eluente de trocar com os analitos ligados à coluna. Os analitos ligados com mais força à fase estacionária necessitam de uma maior força iónica para se soltarem pelo que têm um maior tempo de retenção. A separação dos analitos da coluna também pode ser conseguida alterando o pH do eluente e, conseqüentemente, a carga da partícula a separar.²⁷

A deteção dos analitos à saída da coluna pode ser realizada de várias formas, nomeadamente, utilizando um detetor condutimétrico que regista o aumento da condutividade da solução devido à presença dos iões separados.

As vantagens mais importantes da cromatografia iónica são: a determinação simultânea de diversos iões num curto período de tempo; o pequeno volume de analito utilizado (<100µL); a possibilidade de usar diferentes detetores; a preparação de amostras relativamente simples; a elevada sensibilidade da separação; os baixos custos e a segurança.²⁸

Assim, em resposta ao desafio proposto pela Prozis, o trabalho aqui apresentado teve como principal objetivo o estudo da degradação dos produtos de soro de leite, WPC e WPI, quando sujeitos a longos tempos de armazenamento. Para tal foi seguida a principal via de degradação

destes produtos, a reação de Maillard, recorrendo a diferentes técnicas analíticas tais como a cromatografia iónica.

3. Materiais e Métodos

3.1. Material de trabalho

Para a realização deste trabalho foi utilizado como material de estudo dois tipos de soro de leite, o WPC e o WPI (**Figura 7**). Este material foi adquirido pela Prozis a diferentes fornecedores. Assim para o WPC foram utilizadas amostras de quatro fornecedores diferentes (**A, B, C e D**) e para o WPI foram utilizadas amostras apenas do fornecedor **A**. As amostras analisadas correspondem a lotes diferentes, tendo sido produzidas em diferentes meses do ano.



Figura 7 – Aspeto de uma amostra de WPC (à esquerda) e de uma amostra de WPI (à direita).

O material de análise chegou à empresa em sacos selados para manter a integridade do soro de leite, sendo as amostras analisadas posteriormente colocadas em embalagens de abertura fácil (zip) que serão denominados ao longo da tese como WPC-z e WPI-z, e em embalagens seladas, que corresponderá a WPC-s. Estas embalagens foram armazenadas numa sala de ambiente controlado, com temperatura de 21°C e 69,3 % de humidade relativa, até à data de análise. Para cada amostra foi criado um código de referência de acordo com o que consta nas Tabelas 5, 6 e 7.

Tabela 5 – Designação das amostras de WPC em embalagens zip de diferentes fornecedores com diferentes tempos de armazenamento

Soro de leite	Embalagem	Fornecedor	tA*	Designação
WPC	Zip	A	7	WPC-zA7
WPC	Zip	A	11	WPC-zA11
WPC	Zip	A	14	WPC-zA14
WPC	Zip	A	15	WPC-zA15
WPC	Zip	A	17	WPC-zA17
WPC	Zip	A	18	WPC-zA18
WPC	Zip	A	19	WPC-zA19
WPC	Zip	A	21	WPC-zA21
WPC	Zip	A	24	WPC-zA24
WPC	Zip	A	26	WPC-zA26
WPC	Zip	A	27	WPC-zA27
WPC	Zip	A	29	WPC-zA29
WPC	Zip	A	31	WPC-zA31
WPC	Zip	A	34	WPC-zA34
WPC	Zip	A	40	WPC-zA40
WPC	Zip	A	43	WPC-zA43
WPC	Zip	B	9	WPC-zB9
WPC	Zip	C	16	WPC-zC16
WPC	Zip	C	23	WPC-zC23
WPC	Zip	D	43	WPC-zD43

*tA corresponde ao tempo de armazenamento das amostras, em meses

Tabela 6 . Designação das amostras de WPI em embalagens zip do fornecedor A com diferentes tempos de armazenamento

Soro de leite	Embalagem	Fornecedor	tA*	Designação
WPI	Zip	A	13	WPI-zA13
WPI	Zip	A	15	WPI-zA15
WPI	Zip	A	16	WPI-zA16
WPI	Zip	A	17	WPI-zA17
WPI	Zip	A	18	WPI-zA18
WPI	Zip	A	19	WPI-zA19
WPI	Zip	A	21	WPI-zA21
WPI	Zip	A	23	WPI-zA23
WPI	Zip	A	24	WPI-zA24
WPI	Zip	A	25	WPI-zA25
WPI	Zip	A	26	WPI-zA26
WPI	Zip	A	27	WPI-zA27
WPI	Zip	A	30	WPI-zA30
WPI	Zip	A	31	WPI-zA31

*tA corresponde ao tempo de armazenamento das amostras, em meses

Tabela 7 - Designação das amostras de WPC em embalagens seladas do fornecedor A com diferentes tempos de armazenamento

Soro de leite	Embalagem	Fornecedor	tA*	Designação
WPC	Selada	A	7	WPC-SA7
WPC	Selada	A	16	WPC-SA16
WPC	Selada	A	17	WPC-SA17
WPC	Selada	A	20	WPC-SA20
WPC	Selada	A	25	WPC-SA25
WPC	Selada	A	28	WPC-SA28
WPC	Selada	A	29	WPC-SA29
WPC	Selada	A	31	WPC-SA31
WPC	Selada	A	34	WPC-SA34
WPC	Selada	A	40	WPC-SA40
WPC	Selada	A	43	WPC-SA43

*tA corresponde ao tempo de armazenamento das amostras, em meses

3.2. Determinação de humidade

Para análise da humidade foi seguido o método 935.29 da AOAC- Métodos Oficiais de Análise - *Official Methods of Analysis*.^{29,30} Começou-se por pesar $3,00 \pm 0,01$ g de amostra, para placas de Petri de peso conhecido. As placas foram colocadas numa estufa Venticell a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 2 h. Após esse tempo, foram retiradas e colocadas num exsiccador durante 30 minutos a arrefecer. De seguida, foram pesadas e colocadas por mais 1 h na estufa, sendo este processo repetido até que a variação de peso, em medições sucessivas, fosse inferior a 0,002 g. A diferença entre o peso inicial e o peso final permite obter o valor de humidade na amostra. Cada amostra foi analisada em duplicado, sendo que os resultados apresentados correspondem à média entre esses valores.

3.3. Determinação do teor de proteína

Para determinação do teor de proteína foi utilizado o método de Dumas, seguindo a norma ISO 14891:2002.³⁰ Começou por se fazer uma reta de calibração, usando como padrão de calibração, o ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA), em quantidades entre 10 e 400 mg. A massa de cada padrão foi pesada num papel de filtro e em seguida foi colocada num analisador elementar LECO. A reta de calibração foi obtida usando o programa do equipamento.

Para as amostras, foi pesado $0,285 \pm 0,005$ g de cada amostra para uma folha de alumínio. De seguida, foram colocadas no analisador elementar LECO. Este ensaio permite determinar o teor de nitrogénio que, como descrito anteriormente, multiplicado por um fator de 6,38, permite obter o teor proteico de cada amostra.

3.4. Determinação da cor

A determinação da cor das amostras de soro de leite foi realizada em triplicado recorrendo-se a um colorímetro CHROMA METER CR-400/410 MINOLTA da AQUATEKNICA, S.A. no Laboratório para Indústria e Processos da Universidade do Minho. Os resultados foram obtidos, inicialmente, no sistema da Comissão Internacional de Iluminação $L^*a^*b^*$ sendo, de seguida, transformados em códigos RGB codificados de 8 bits recorrendo à ferramenta matemática, Matlab, utilizando a função `lab2rgb` (por exemplo: `lab2rgb([86,6 -0,17 21], 'OutputType', 'uint8')`). Por último, os códigos RGB obtidos foram convertidos em códigos de cor, com recurso ao site “*RGB to Hex color conversion*”.³¹

3.5. Determinação da atividade da água, a_w

A medição da atividade da água, a_w foi realizada a 23 °C num medidor de atividade de água DewPoint Water Activity Meter 4TE, da AQUALAB, no Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho. Foi pesado aproximadamente 1,000 g de amostra para uma cápsula, que foi colocada num medidor de atividade de água. Fechou-se, em seguida, a tampa da câmara e esperou-se pelo equilíbrio do vapor. Durante este período um raio infravermelho focado num espelho determina o ponto de orvalho da amostra, que é traduzido em atividade de água. Este ensaio foi realizado em triplicado em cada amostra.

3.6. Determinação de HMF por espectrofotometria

Para quantificar o HMF formado começou por se pesar 1,000 g de amostra para um tubo de falcon de 15 mL, ao qual se adicionou 10 mL de água destilada. A solução foi colocada num banho a 63 °C durante 30 minutos.

De seguida, foram centrifugados 5 mL da suspensão anterior, numa centrífuga MPW-260R a 6000 rpm, durante 20 minutos. Transferiu-se 4,5 mL do sobrenadante para um tubo novo e centrifugou-se novamente, nas condições anteriores.

A 4 mL de sobrenadante obtido, adicionou-se 500 µL de Carrez I (solução aquosa de $K_4Fe(CN)_6$, 15% (p/v)) e 500 µL de Carrez II (solução aquosa de acetato de zinco, 30% (p/v)). A suspensão obtida foi centrifugada nas mesmas condições.

Para se proceder à análise por espectrofotometria foi necessário preparar a amostra e um branco de referência. De modo a preparar a amostra, foi colocado num balão volumétrico de 25 mL, 1 mL do sobrenadante anterior e fez-se o volume com água destilada. Para o branco o volume foi feito com uma solução bissulfito de sódio 2% (o bissulfito de sódio degrada o HMF eliminando a sua absorção). A absorvância das soluções foi lida num espectrofotómetro photoLab 7600 UV-VIS ao comprimento de onda de 284 nm, comprimento de onda no qual o HMF apresenta um pico de absorção máximo e a 336 nm, comprimento de onda ao qual o HMF não absorve. A concentração de HMF foi determinada pela diferença de absorvância entre os dois comprimentos de onda, usando a **Equação 7**.²²

$$[HMF] \left(\frac{mg}{kg} \right) = \frac{(Abs_{284} - Abs_{336}) \times 149,7 \times 5 \times \text{factor de diluição}}{\text{massa amostra (g)}} \quad (\text{Equação 7})$$

Este ensaio foi repetido duas vezes para cada amostra analisada, sendo que os resultados apresentados correspondem à média dos resultados obtidos.

3.7. Determinação de lactose por cromatografia iónica

Para determinação de lactose no soro de leite, foi utilizado um cromatógrafo iónico sistema Dionex™ ICS-6000 Capillary HPIC™ da Thermo Scientific™. Usou-se uma coluna CarboPAC SA10 à temperatura de 45 °C. Como eluente usou-se uma solução aquosa de hidróxido de potássio 100 mM com um fluxo de 0,250 µL/min. Foi utilizado um detetor de deteção integrada por pulso

amperométrico, com um eletrodo de trabalho de ouro, descartável e com um eletrodo de referência de Ag/AgCl. O volume de injeção das amostras e dos padrões foi de 10 µL e a corrida teve uma duração de 25 minutos. Associado ao equipamento utilizou-se o programa *Chromeleon* para identificação e quantificação dos picos dos cromatogramas dos açúcares.

A determinação da lactose nas amostras de WPC e WPI foi realizada em simultâneo com as restantes análises efetuadas no laboratório da Prozis. Para servir do interesse geral do laboratório foi construída uma reta de calibração genérica, com vários açúcares.

De modo a ser possível identificar os picos nos cromatogramas da reta de calibração, foram corridos individualmente os cinco padrões de açúcar, a sacarose, a glucose, a frutose, a lactose e a maltose. Foram preparadas soluções de concentração 400 mg/L de cada um dos açúcares. Estas soluções foram colocadas em *vials* e injetadas no cromatógrafo (10 µL).

Para a reta preparou-se uma solução aquosa de concentração 400 mg/L, com uma mistura dos cinco açúcares, tendo sido pesado 0,008 g de cada um deles para um balão volumétrico de 100 mL, cujo volume foi perfeito com água ultrapura. A partir desta, por diluição, foram feitas 7 soluções padrão de concentrações 200, 100, 75, 50, 25, 10 e 5 mg/L. Estas soluções foram colocadas em *vials* e injetadas no cromatógrafo (10 µL).

Com recurso ao *Chromeleon*, e com base no tempo de retenção de cada açúcar, foi identificado cada sinal obtido nos espectros dos padrões de calibração. Ainda no programa foram construídas as curvas de calibração para cada açúcar, selecionando os pontos correspondentes à área do sinal do açúcar e eliminando 1-2 pontos de forma a que o coeficiente de correlação fosse superior a 0,995. Este processo foi repetido para cada açúcar, tendo cada um deles uma curva de calibração de função exponencial.

As amostras foram analisadas em duplicado e tiveram uma preparação diferente das soluções padrão. Começou-se por pesar 1,000 g de cada amostra. Em seguida foram colocadas em balões volumétricos de 100 mL aos quais se adicionou 10 mL de água ultrapura, 200 µL de Carrez I e 200 µL de Carrez II, agitando entre cada adição. De seguida, o perpez-se o volume com água ultrapura. Das suspensões obtidas, foram transferidos cerca de 10 mL para tubos de falcon e centrifugou-se a 6000 rpm, durante 20 minutos.

Para garantir a inexistência de partículas em suspensão o sobrenadante foi filtrado com um filtro de 20 µm antes de ser injetado no cromatógrafo.

3.8. Determinação de lisina por cromatografia iônica

Para determinação da lisina utilizou-se um cromatógrafo iônico da Thermo Scientific™, um sistema Dionex™ ICS-6000 Capillary HPLC™. A pré-coluna e coluna foram aminoPAC PA10, funcionando a uma temperatura de 30 °C, o volume de injeção foi de 10 µL, o fluxo foi de 0,250 µL/min, o tempo de corrida foi de 40 minutos e a temperatura do compartimento 25 °C. O detetor usado tinha detecção integrada por pulso amperométrico, com eletrodo de trabalho de ouro (eletrodo descartável) e com eletrodo de referência de Ag/AgCl. O eluente foi uma mistura de água ultrapura, hidróxido de sódio 0,25 M e de acetato de sódio 1 M, sendo a composição da mistura controlada pelo método do equipamento. A separação dos aminoácidos na coluna ocorreu por diferença de gradiente, iniciando a corrida com 16% de hidróxido de sódio e 0% de acetato de sódio, passando este para 40% aos 25 minutos de corrida ocorrendo assim separação dos aminoácidos carregados.

Tal como no caso dos açúcares também para os aminoácidos foi construída uma reta de calibração genérica começando por preparar uma solução mãe de concentração total 0,002 mol/L, com uma mistura dos vinte aminoácidos (a prolina, o ácido glutâmico, a cisteína, a arginina, o ácido aspártico, a fenilalanina, a valina, a tirosina, o triptofano, a glicina, a serina, a treonina, a asparagina, a isoleucina, a alanina, a lisina, a metionina, a histidina, a glutamina e a leucina), cada um com uma concentração de 0,0001 mol/L. A partir desta solução aquosa, foram feitas nove soluções padrão de concentrações 2;1,5; 1,0; 0,75; 0,50; 0,30; 0,10; 0,075 e 0,020 nmol/µL. Estas soluções foram filtradas antes de serem injetadas no cromatógrafo.

Para identificar os picos nos cromatogramas da reta de calibração, foram corridos individualmente os vinte aminoácidos. Foram preparadas soluções de concentração de 2 nmol/µL de cada um dos aminoácidos. Estas soluções foram colocadas em *vials* e injetadas no cromatógrafo.

Recorrendo ao *Chromleon*, e com base no tempo de retenção de cada aminoácido, foi identificado cada sinal obtido no cromatograma dos padrões de calibração. Ainda no programa foram construídas as curvas de calibração para cada aminoácido, selecionando os pontos

correspondentes à área do sinal respectivo e eliminando 1-2 pontos de forma a que o coeficiente de correlação fosse superior a 0,995. Este processo foi repetido para cada aminoácido, tendo cada um deles uma curva de calibração de função exponencial.

A preparação da amostra difere da preparação das soluções padrão. Começou-se por pesar 0,500 g de WPC ou WPI, em duplicado, que foi transferida para um tubo de Falcon de 15 mL, ao qual se adicionou 5 mL de água ultrapura. De seguida, o falcon foi colocado no vortex durante 10 segundos a 40 Hz. Posteriormente, foi adicionado 2,5 mL de ácido sulfossalicílico 5%, ficando a solução a repousar durante 30 minutos a 5 °C. Por fim, a solução foi centrifugada durante 15 minutos a 6000 rpm. Recolheu-se 5 mL do sobrenadante e diluiu-se 10 vezes com água ultrapura antes de injetar no cromatógrafo.

4. Resultados e Discussão

Atendendo aos objetivos propostos para a realização da tese, foram analisadas amostras de soro de leite em pó, WPC e WPI provenientes de diferentes fornecedores, com um tempo de armazenamento entre os 7 e os 43 meses. Estas amostras foram fornecidas pela Prozis e mantidas nas mesmas condições de armazenamento, à temperatura de 21°C e humidade relativa de 69,3%.

4.1. Determinação de humidade

Os produtos em pó, que são armazenados em ambientes húmidos, podem adsorver, espontaneamente, água à superfície. Em casos extremos, isto pode levar à aglomeração do pó, reduzindo ou impedindo o fluxo das partículas de água, ocorrendo uma diminuição da qualidade e desempenho do produto final e, conseqüentemente, da satisfação e confiança do cliente.³²

Para avaliar o comportamento das amostras armazenadas, foi determinada a humidade de amostras de WPC e WPI, com diferentes tempos de armazenamento. Para esta análise foram utilizadas amostras de WPC armazenadas em sacos de abertura zip, do fornecedor **A** com tempos de armazenamento de 7 a 31 meses, do fornecedor **B** com 11 meses, do fornecedor **C** com 16 meses e do fornecedor **D** com 40 meses de armazenamento (**Tabela 8**). Foram também analisadas amostras de WPI em sacos de zip do fornecedor **A** com tempos de armazenamento de 15 a 31 meses.

Pela análise do gráfico da **Figura 8**, verifica-se um aumento da humidade com o aumento do tempo de armazenamento. As amostras analisadas não apresentam uma variação significativa até ao mês 9 de armazenamento, apesar de já apresentam valores de humidade superiores ao valor de referência inicial, após produção (**Tabela 8**). A partir deste mês, ocorre um aumento significativo até ao mês 21, não apresentando depois um aumento significativo até ao mês 40. Provavelmente as amostras já absorveram o máximo de água possível.

O único resultado que não segue o comportamento esperado é o WPC-za19, pois apresenta um teor de humidade inferior ao do mês anterior. Este pode ter resultado de um acondicionamento da amostra melhor, encontrando-se o saco de abertura zip mais fechado.

Tabela 8 - Valores de humidade obtidos na análise de WPC (%H₂O) e valores referentes à humidade inicial (%H₂O_i), assim como a variação do teor de humidade (Δ %H₂O) e respetivos desvios padrão (σ)

Amostra	tA*	%H ₂ O	%H ₂ O _i	Δ %H ₂ O	σ
WPC-za7	7	4,84	4,40	0,44	0,013
WPC-zb9	9	5,73	5,30	0,43	0,010
WPC-za14	14	5,39	4,70	0,69	0,001
WPC-za15	15	6,18	4,80	1,38	0,051
WPC-zc16	16	6,87	5,28	1,59	0,000
WPC-za17	17	6,41	4,50	1,91	0,004
WPC-za18	18	7,18	4,40	2,78	0,016
WPC-za19	19	6,76	4,70	2,06	0,063
WPC-za21	21	8,42	4,70	3,72	0,006
WPC-za24	24	8,75	4,90	3,85	0,001
WPC-za29	29	7,95	4,50	3,45	0,013
WPC-za31	31	8,43	4,70	3,73	0,010
WPC-zd40	40	8,40	4,70	3,70	0,001

*tA corresponde ao tempo de armazenamento das amostras, desde que foram produzidas, em meses

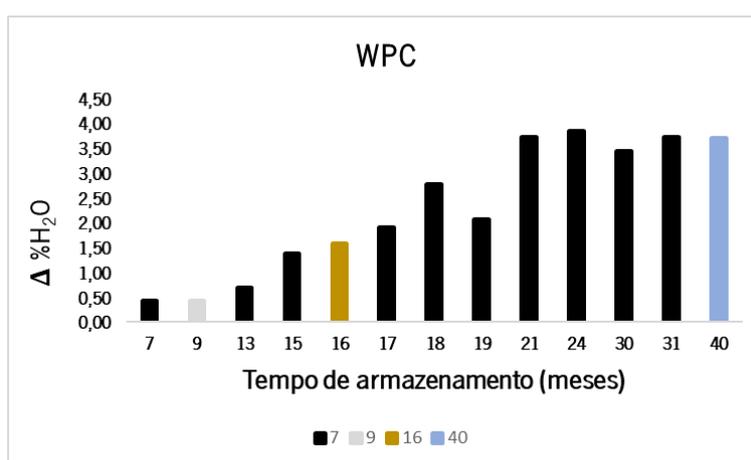


Figura 8 - Gráfico da variação da humidade em amostras de WPC dos fornecedores A (preto), B (cinzento claro), C (amarelo torrado) e D (azul) em função do tempo de armazenamento.

A saturação com água das amostras a partir do mês 21, pode implicar uma alteração das suas propriedades físicas e químicas e sugere uma degradação mais significativa, que está de acordo com o tempo estipulado para prazo de validade deste tipo de produtos (18 meses). Uma forma de verificar a veracidade destes resultados seria analisar novas amostras com o mesmo tempo de armazenamento, mas no presente trabalho não foi possível estender o estudo por mais tempo.

Na análise dos resultados obtidos para as amostras de WPI (**Tabela 9**) observa-se que com o aumento do tempo de armazenamento aumenta o teor de humidade, apesar de neste caso o comportamento das amostras não apresentar uma evolução tão regular como as de WPC. Adicionalmente, as amostras de WPI com menos tempo de armazenamento apresentam mais humidade que as amostras de WPC com tempo de armazenamento correspondente.

Isto poderá ocorrer porque o WPI tem um maior teor proteico que o WPC, o que torna as amostras mais higroscópicas, havendo uma maior propensão para a absorção de partículas de água da atmosfera e, assim, um ganho mais rápido de humidade. Estas diferenças podem ter origem quer durante o processo de produção e embalagem, quer por mau acondicionamento da amostra aquando da passagem da embalagem do fornecedor para os sacos de abertura zip.

Tabela 9 – Valores de humidade obtidos na análise de WPI (%H₂O) e valores referentes à humidade inicial (%H₂O_i), assim como a variação do teor de humidade (Δ %H₂O) e respetivos desvios padrão (σ)

Amostra	tA*	%H ₂ O	%H ₂ O _i	Δ %H ₂ O	σ
WPI-za7	15	7,34	5	2,34	0,018
WPI-za17	17	6,48	4,9	1,58	0,007
WPI-za18	18	7,54	5	2,54	0,004
WPI-za19	19	8,39	5,2	3,19	0,002
WPI-za21	21	7,13	4,8	2,33	0,013
WPI-za24	24	9,39	4,9	4,49	0,014
WPI-za25	25	8,60	4,9	3,70	0,010
WPI-za27	27	8,85	4,8	4,05	0,020
WPI-za31	31	8,43	4,7	3,73	0,011

*tA corresponde ao tempo de armazenamento das amostras, desde que foram produzidas, em meses

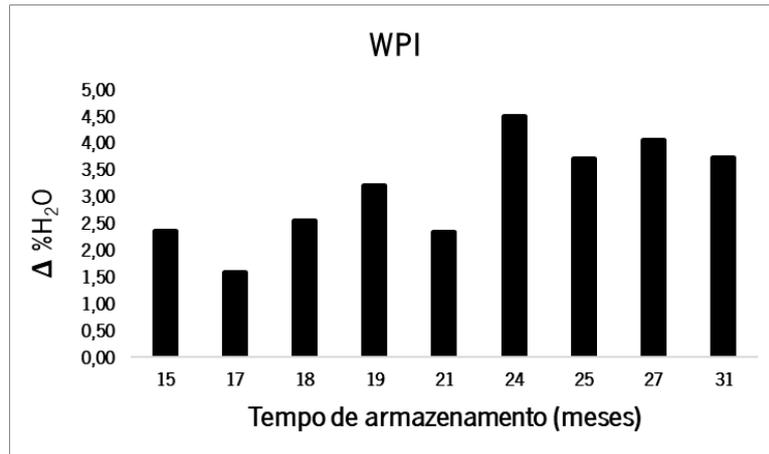


Figura 9 - Gráfico de variação de umidade em amostras de WPI do fornecedor A em função do tempo de armazenamento.

4.2. Determinação do teor de proteína

Para esta determinação foram utilizadas amostras de WPC armazenadas em sacos de zip do fornecedor A com 7 a 40 meses; do fornecedor B com 9 meses; do fornecedor C com 16 meses e com 43 meses do fornecedor D. Foram também analisadas amostras de WPI do fornecedor A com 15 a 31 meses de armazenamento.

Foi construída uma reta de calibração com 22 pontos, no analisador elementar de acordo com o descrito no capítulo material e métodos. Foi utilizado como padrão o EDTA e a massa variou entre 0,01 g e 0,50 g. O equipamento construiu a reta indicada na **Equação 9**, através do programa FP628 Series.

$$m_{\text{EDTA}} \times \%N_{\text{EDTA}} \times 10 = (0,9958 \times \text{área do sinal}) + 0,0004749 \text{ (Equação 9)}$$

Foram, de seguida, lidas em duplicado as amostras de WPC, tendo sido obtidos os valores médios apresentados na **Tabela 10**. Os valores obtidos pelo equipamento são calculados para 100 g de amostra tal como foi pesada (*as is*). Para conseguir comparar estes valores com os valores do fornecedor, que são apresentados em base seca (*dry basis*), foram convertidos para resultados em base seca, considerando os resultados de percentagem de umidade obtidos no ensaio anterior, para cada amostra.

Tabela 10 - Teor de proteína obtido (%P) em amostras de WPC com diferentes tempos de armazenamento e comparação com teor de proteína inicial (%Pi)

Amostra	tA*	%P	%H ₂ O	%P (db**)	%Pi (db**)	Δ%P
WPC-zA7	7	78,5	4,84	82,5	82,0	0,5
WPC-zB9	9	78,3	5,74	83,1	83,5	-0,4
WPC-zA13	13	77,3	5,39	81,7	82,6	-0,9
WPC-zC16	16	78,4	6,87	84,2	83,4	0,8
WPC-zA18	18	77,1	7,22	83,1	81,9	1,2
WPC-zA30	30	74,5	7,95	81,0	81,0	0
WPC-zA40	40	75,6	8,40	82,5	81,7	0,8
WPC-zD42	42	77,1	6,39	82,4	80,3	2,2

*tA corresponde ao tempo de armazenamento das amostras, desde que foram produzidas, em meses

**db corresponde à amostra em base seca, *dry basis*

As amostras foram analisadas com o método de Dumas, usado pela Prozis, no entanto, os valores iniciais foram obtidos pelo método de Kjeldhal, utilizado pelo fornecedor. Isto não permite comparar diretamente os valores obtidos e afirmar que o teor proteico se mantém, uma vez que o método de Dumas é um método direto mais eficiente que o método de Kjeldhal, que funciona por titulação havendo mais erros associados.³³ Assim, apenas se verificou que não há uma variação significativa do teor de proteína ao longo do tempo de armazenamento ($\Delta\%P < 5$).

Para as amostras de WPI (**Tabela 11**) o método para obtenção do valor inicial também foi o de Kjeldhal. Tendo-se verificado que também não havia uma variação significativa dos valores obtidos relativamente ao valor inicial ($\Delta\%P < 5$)

Tabela 11 - Teor de proteína obtido (%P) em amostras de WPI com diferentes tempos de armazenamento e comparação com teor de proteína inicial (%Pi)

Amostra	tA*	%P	%Pi	Δ%P
WPI-zA15	15	86,7	89,1	-0,1
WPI-zA17	17	86,1	89,5	0,5
WPI-zA21	21	85,2	88,6	-1,2
WPI-zA24	24	85,1	87,4	2,0
WPI-zA27	27	83,9	87,6	-0,3
WPI-zA31	31	84,9	88,2	0,3

*tA corresponde ao tempo de armazenamento das amostras, desde que foram produzidas, em meses

Para além do facto de terem sido utilizados dois métodos diferentes na determinação do conteúdo proteico também temos que ter em consideração que ambos os métodos determinam o conteúdo total de nitrogénio. Uma vez que ao longo da reação de Maillard são formados compostos nitrogenados por degradação de proteínas e que estes compostos são igualmente detetados pelos métodos de quantificação utilizados, conclui-se que estes métodos de quantificação não serão a melhor estratégia para avaliar a extensão da degradação proteica provocada pela reação de Maillard pelo que em trabalhos futuros deverá ser utilizado outro método de quantificação (ex: método de Bradford).

4.3. Degradação do soro de leite pela alteração da cor

A cor é um fator de qualidade importante para as indústrias alimentares, uma vez que esta é facilmente associada à frescura, amadurecimento e segurança dos alimentos. É também um importante critério para monitorização da produção e do tempo de vida de produtos provenientes do leite, como a ração para animais, leite em pó e soro de leite. Os consumidores utilizam primariamente a visão para avaliar a cor do produto. No entanto, a percepção desta difere de pessoa para pessoa e depende da luminosidade, entre outros fatores.

A nível industrial, é associada a visão humana a sistemas instrumentais de medição da cor. Estes equipamentos simulam a forma como o olho humano vê a cor de um objeto sob condições específicas de iluminação fornecendo um valor quantitativo. O valor espectral refletido é transformado ou filtrado para obter valores de cor reprodutíveis em concordância com os valores padrão desenvolvidos pela Comissão Internacional de Éclairage. O sistema numérico mais popular é o $L^*a^*b^*$.³⁴

Para a análise da alteração de cor foram utilizadas amostras de WPC armazenadas em sacos de abertura zip, do fornecedor A com 7 a 43 meses, do fornecedor B com 9 meses, do fornecedor C com 16 e 23 meses e do fornecedor D com 43 meses de armazenamento. As análises foram realizadas em triplicado.

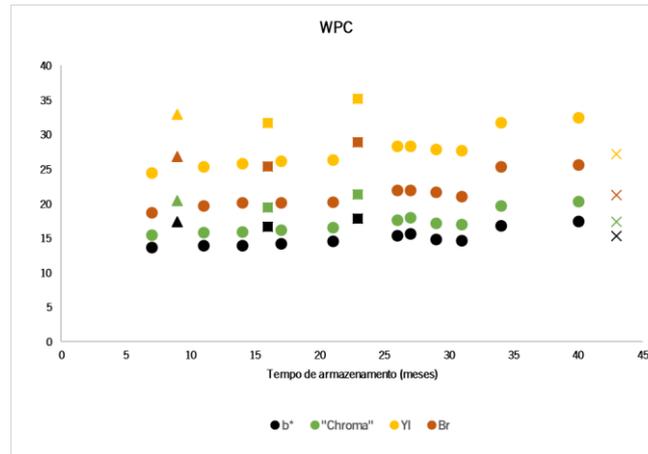


Figura 10 - Gráfico da variação do b^* , do "chroma", do YI (índice de amarelo) e do Br (índice de *browning*) em amostras de WPC armazenadas em sacos de abertura zip dos fornecedores A (bolas), B (triângulo), C (quadrado) e D (cruzes) em função do tempo de armazenamento das amostras.

Os resultados apresentados no gráfico da **Figura 10** correspondem à média dos valores obtidos. Pode-se verificar uma homogeneidade na variação dos diferentes índices, corroborando os valores obtidos para cada uma das amostras.

As amostras do fornecedor A não sofrem uma variação significativa na cor até aos 17 meses de armazenamento. A partir desta data, a intensidade da cor aumenta ligeiramente, tendo as amostras um aspeto mais amarelado. A partir dos 31 meses observa-se um novo aumento da cor das amostras.

Relativamente às amostras correspondentes aos fornecedores B, C e D, observa-se sempre uma intensidade de cor superior o que deve indicar que as amostras já eram mais amarelas de início. Isto pode dever-se à utilização de diferentes processos de produção do WPC, indicando a sua importância para a qualidade e para o tempo de vida útil dos produtos comercializados.

Um dos parâmetros mais relevantes é o índice de *browning* que indica o nível de escurecimento das amostras de soro de leite. Esta alteração na cor ocorre principalmente por formação de compostos na fase final da reação de Maillard, as melanoidinas. Deste modo, e como previsto, com o aumento do tempo de armazenamento observou-se um aumento do índice de *browning*, constituindo este facto um indicador de que a reação de Maillard deverá estar a ocorrer (**Figura 10**).

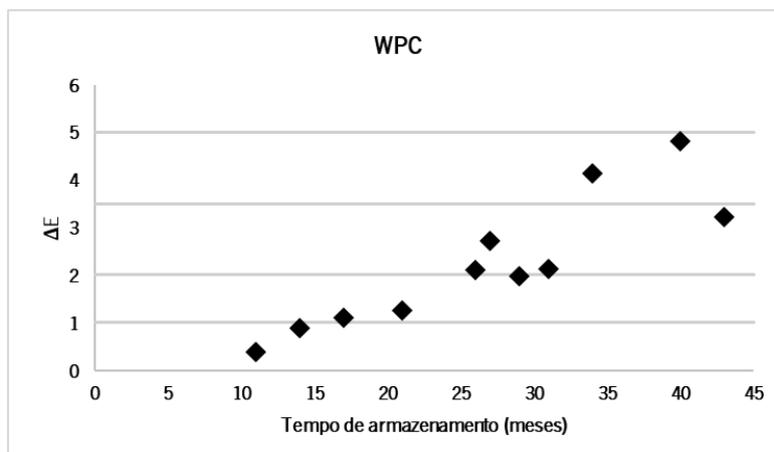


Figura 11 - Gráfico da variação total de cor, ΔE , das amostras de WPC de saco de abertura zip do fornecedor A com diferentes tempos de armazenamento.

Foi ainda determinada a diferença de cor entre amostras de WPC. A amostra de menor tempo de armazenamento, 7 meses, foi considerada a cor padrão, e a diferença de cor calculada em relação às restantes amostras (**Figura 11**). Apenas foram utilizadas as amostras do fornecedor A, uma vez que a diferença de cor entre fornecedores para o mesmo tempo de armazenamento foi significativa (**Figura 10**), não podendo ser aplicado o mesmo padrão.

Com esta análise foi possível detetar com maior facilidade a variação de cor das amostras ao longo do tempo de armazenamento. Verificou-se que até aos 14 meses de armazenamento o observador não consegue detetar diferença na cor das amostras, uma vez que a diferença entre as cores foi inferior a 1. Para amostras entre os 17 e os 21 meses de armazenamento apenas observadores com experiência conseguem detetar a diferença, pois os seus valores de ΔE encontram-se entre 1 e 2. Entre os 26 e os 31 meses os observadores inexperientes conseguem distinguir as amostras da amostra com 7 meses de armazenamento pela cor, encontrando-se os valores de ΔE entre 2 e 3,5. A partir dos 34 meses existe uma clara diferença na coloração das amostras em relação à coloração da amostra de referência, pois o seu valor de ΔE está entre 3,5 e 5.

Estes resultados estão de acordo com o esperado e correspondem a uma maior presença de produtos corados como os resultantes da reação de Maillard, a partir dos 21 meses.

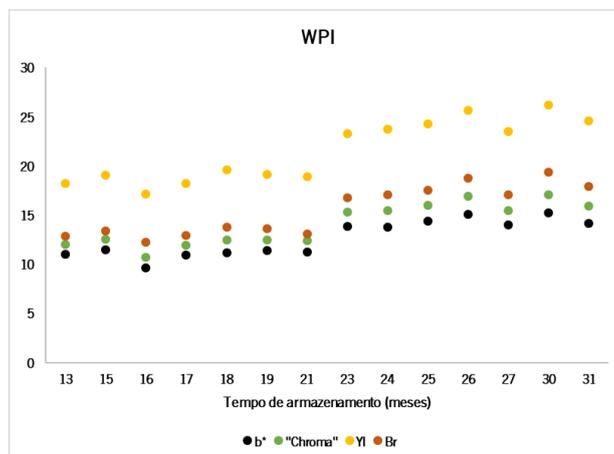


Figura 12 - Gráfico da variação do b^* , do "chroma", do YI (índice de amarelo) e do Br (índice de *browning*) em amostras de WPI armazenadas em sacos de abertura zip do fornecedor A em função do tempo de armazenamento das amostras.

Foi também analisada, em triplicado, a variação total de cor das amostras de WPI do fornecedor A, em sacos de abertura zip, com tempo de armazenamento de 13 a 31 meses, correspondendo os resultados apresentados no gráfico da **Figura 12** à média dos valores obtidos para cada amostra.

Pela análise do gráfico, pode-se verificar um comportamento semelhante ao do WPC, no qual a intensidade da cor amarela aumentou com o aumento do tempo de armazenamento. Pode-se diferenciar duas fases na qual esta alteração é mais evidente, dos 13 até aos 21 meses de armazenamento e dos 23 até aos 31 meses, o que corrobora os dados anteriores nos quais as maiores alterações nas amostras ocorrem entre os 17 e os 21 meses.

Observa-se ainda que as amostras de WPC têm uma tonalidade mais amarela que o WPI. Para amostras com o mesmo tempo de armazenamento é possível verificar que o WPC tem valores de YI e de b^* superiores aos do WPI. O que pode dever-se ao facto de o WPI sofrer diferentes processos de separação por membrana para aumentar a concentração proteica que eventualmente eliminem ou inibam a formação de produtos corados.

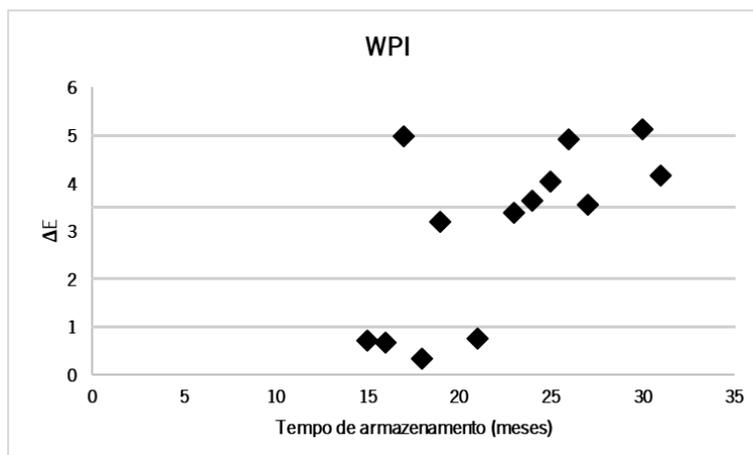


Figura 13 - Gráfico da variação total de cor, ΔE , das amostras de WPI de saco de abertura zip do fornecedor A nos diferentes tempos de armazenamento.

À semelhança do que foi feito para as amostras de WPC foi também determinada a diferença de cor entre amostras de WPI, usando a amostra com menor tempo de armazenamento, 13 meses, como cor padrão (**Figura 13**).

Neste caso o comportamento observado não foi tão regular, sendo detetadas algumas amostras com tempo de armazenamento baixo e bastante diferença de cor (amostras com 17 e 19 meses de armazenamento), ao contrário do esperado pela análise da **Figura 12**. Analisando os valores de L^* , a^* e b^* que nos permitem calcular o ΔE destas amostras verifica-se que a diferença observada se deve a uma maior diferença do valor de L^* (Luminosidade) entre estas amostras e a amostra padrão (13 meses). Muito provavelmente já deveria haver uma diferença de luminosidade inicial associada ao processo de produção.

Para as amostras com mais de 24 meses, o valor de ΔE encontra-se entre o 3,5 e o 5, havendo uma clara diferença entre a cor das amostras, sendo facilmente distinguidas como pode ser comprovado observando a **Figura 14**.

Estes resultados sugerem que, à semelhança do observado para os resultados com amostras de WPC, há medida que o tempo de armazenamento aumenta, há um aumento da formação de compostos corados, que podem resultar da reação de Maillard, mas que as amostras de WPI são mais estáveis, uma vez que o desenvolvimento de cor é mais tardio.

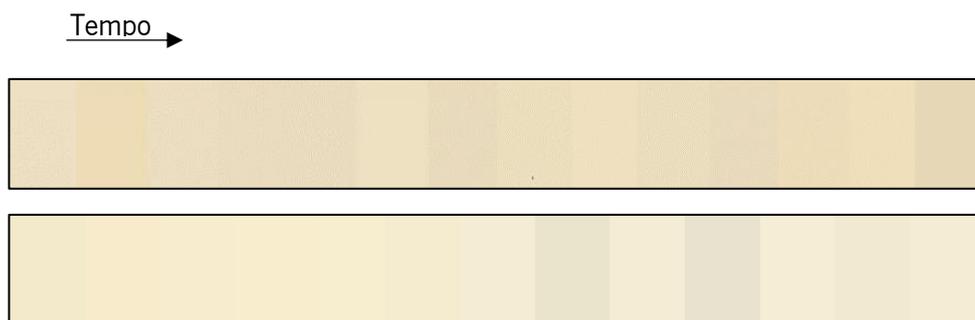


Figura 14 – Pantone de cor das amostras de WPC (imagem de cima) e das amostras de WPI (imagem de baixo) em função do tempo de armazenamento.

Observando o pantone criado (**Figura 14**) pode-se corroborar os dados obtidos anteriormente, uma vez que se observa que as amostras de WPC têm uma tonalidade mais escura em relação ao WPI. Apesar de existirem *outliers*, como indicado pelos valores de YI e Br, nota-se um escurecimento da tonalidade ao longo do tempo de armazenamento que corresponde a um aumento da quantidade das melanoidinas.

4.4. Estudo da atividade de água ao longo do tempo

Os produtos alimentares em pó, são compostos suscetíveis de sofrer alterações físicas e/ou químicas, durante o processo de produção e de armazenamento. Estas ocorrem ao longo do tempo e estão dependentes de diversos fatores como a temperatura e a humidade relativa.

Numa fase inicial, estes produtos encontram-se num estado vítreo amorfo, com uma reduzida quantidade de água na sua constituição. No entanto, quando este teor aumenta, as moléculas de água presentes alteram a estrutura física do produto, adquirindo uma forma “plástica”. Esta alteração é suficiente para que ocorra uma diminuição da qualidade do produto, com mudanças organolépticas facilmente detetáveis pelos clientes.

Para quantificar este efeito, foi determinada a atividade da água para amostras de WPC de saco com abertura zip de do fornecedor A com 7 a 40 meses de armazenamento; do fornecedor B com 9 meses; do fornecedor C com 16 e 23 meses e do fornecedor D com 43 meses de armazenamento, **Tabela 12**. Os ensaios foram realizados em triplicado correspondendo os resultados apresentados à média dos resultados obtidos.

Tabela 12 - Valores de atividade de água (a_w) de amostras de WPC dos fornecedores A, B, C e D em sacos de abertura zip e respectivos coeficientes de variação (CV%)

Amostra	tA*	a_w	CV (%)**
WPC-za7	7	0,229	3,602
WPC-zB9	9	0,321	1,479
WPC-za11	11	0,261	2,687
WPC-za14	14	0,264	0,738
WPC-zC16	16	0,303	0,033
WPC-za17	17	0,277	0,376
WPC-za21	21	0,442	0,113
WPC-zC23	23	0,375	0,228
WPC-za26	26	0,422	0,760
WPC-za27	27	0,539	0,093
WPC-za29	29	0,551	0,428
WPC-za34	34	0,525	0,211
WPC-za40	40	0,470	0,404
WPC-zD43	43	0,467	1,179

*tA corresponde ao tempo de armazenamento das amostras, desde que foram produzidas, em meses

**CV corresponde ao coeficiente de variação

De acordo com o gráfico da **Figura 15**, ocorre um aumento da atividade de água com o aumento do tempo de armazenamento das amostras. Estes dados vão de encontro aos resultados obtidos anteriormente para a humidade relativa, uma vez que o aumento da atividade da água está relacionado com o aumento da humidade.³⁵

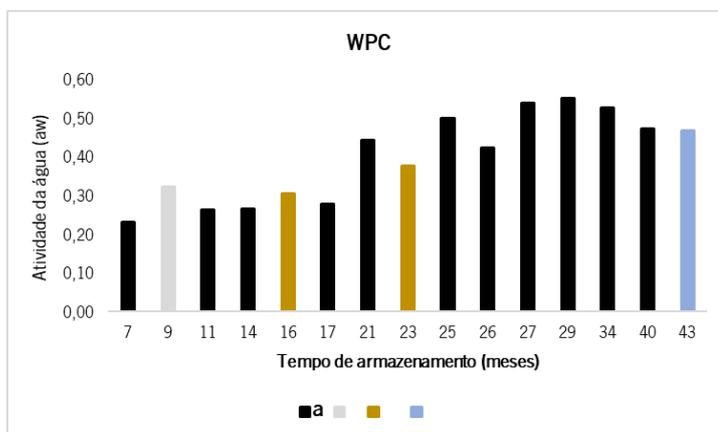


Figura 15 - Gráfico da atividade da água de amostras de WPC de sacos de abertura de zip dos fornecedores A, B, C e D, em função do tempo de armazenamento.

Pode ainda verificar-se que para o fornecedor A, a atividade da água não varia significativamente até ao mês 17, seguindo-se um aumento abrupto entre este mês e o mês 21, a partir do qual a atividade da água se mantém elevada.

Quando se compara fornecedores, pode-se verificar que há algumas diferenças apesar de seguirem a mesma tendência. A amostra WPC-zB9, apresenta uma maior atividade da água que uma amostra de WPC-zA7, apesar de apresentar um valor de humidade semelhante (**Figura 8**). Isto pode indicar que a amostra tinha uma maior atividade de água desde a sua produção, uma vez que o seu processo de desidratação e concentração pode ter ocorrido em diferentes condições.

Verifica-se que as alterações mais significativas ocorrem entre os meses 17 e 21, o que vem corroborar o tempo de vida útil do WPC de 18 meses, e confirmar dados anteriores.

De seguida, foram analisadas as amostras de WPC fornecedor A em sacos selados com 7 a 43 meses de armazenamento, utilizando a mesma abordagem que para a análise das amostras de WPC em sacos zip (**Tabela 13**). Com esta análise foi possível aferir em que medida o acondicionamento das amostras por parte dos clientes (geralmente em sacos com abertura zip) determina o tempo de vida útil do produto.

Tabela 13 - Valores de atividade de água de amostras de WPC, do fornecedor A, em sacos selados e respetivos coeficientes de variação (CV%).

Amostra	tA*	a _w	CV (%)
WPC-sA7	7	0,282	0,646
WPC-sA16	16	0,254	0,952
WPC-sA17	17	0,311	0,252
WPC-sA20	20	0,171	4,275
WPC-sA25	25	0,399	0,928
WPC-sA28	28	0,244	1,630
WPC-sA29	29	0,407	0,307
WPC-sA31	31	0,277	2,804
WPC-sA34	34	0,229	0,977
WPC-sA40	40	0,220	2,712
WPC-sA43	43	0,272	2,011

*tA corresponde ao tempo de armazenamento das amostras, desde que foram produzidas, em meses

**CV corresponde ao coeficiente de variação.

O gráfico da **Figura 16** compara os resultados das amostras WPC-sA com os WPC-zA e permite verificar que a atividade da água para as amostras de WPC em sacos selados com maior tempo de armazenamento é inferior à atividade da água em amostras de saco de zip equivalentes.

Isto é determinante a longo prazo, uma vez que para longos períodos de armazenamento a atividade de água em sacos selados se mantém próxima de 0,20, mantendo melhor a integridade dos produtos, assim como as suas propriedades físicas e nutricionais. O mesmo não se verifica em amostras zip uma vez que a atividade da água aumenta com o tempo, atingindo valores críticos a partir dos 25 meses de armazenamento.

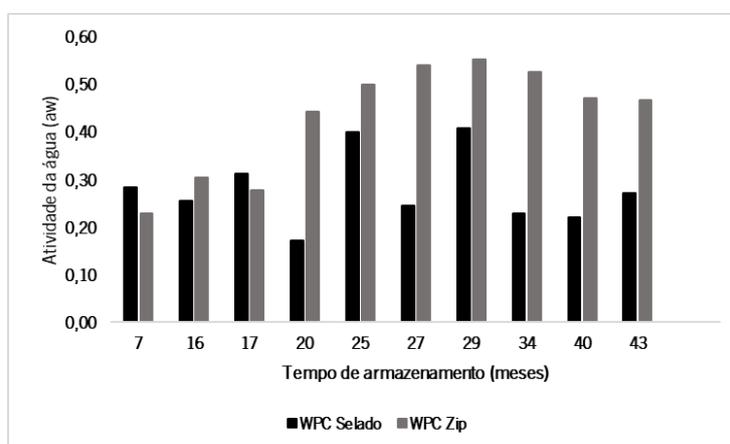


Figura 16 - Gráfico da atividade da água de amostras de WPC do fornecedor A armazenadas em sacos selados e em sacos de abertura zip.

Foram ainda analisadas amostras de WPI do fornecedor A, com tempos de armazenamento de 13 a 31 meses (**Tabela 14**) seguindo o mesmo esquema de análise.

Tabela 14 - Valores de atividade de água de amostras de WPI do fornecedor A, em sacos de abertura zip e respetivos coeficientes de variação (CV%)

Amostra	tA*	a _w	CV (%)
WPI-za13	13	0,219	4,088
WPI-za15	15	0,309	2,036
WPI-za16	16	0,332	0,933
WPI-za17	17	0,257	0,507
WPI-za19	19	0,382	0,246
WPI-za21	21	0,323	0,249
WPI-za23	23	0,375	0,025
WPI-za24	24	0,477	0,317
WPI-za25	25	0,415	0,120
WPI-za26	26	0,44	0,992
WPI-za27	27	0,427	0,264
WPI-za29	29	0,421	0,245
WPI-za31	31	0,396	0,477

*tA corresponde ao tempo de armazenamento das amostras, desde que foram produzidas, em meses

**CV corresponde ao coeficiente de variação.

Pelo gráfico da **Figura 17**, pode-se observar um aumento gradual da atividade da água com o aumento do tempo de armazenamento.

O facto de, para o mesmo fornecedor, o comportamento não ser 100% regular deve estar relacionado com o acondicionamento das amostras. Apesar de as amostras terem sido armazenadas todas nas mesmas condições de humidade e temperatura, podem ter estado sujeitas a condições diferentes durante o processo de embalagem podendo absorver mais ou menos água.

Curiosamente pode observar-se a existência de amostras (WPI-za15 e WPI-za13), entre as quais se observa um aumento da atividade da água apesar de possuir um teor de humidade inferior (**Figura 9**). Isto pode ser resultado dos processos de produção do WPI.

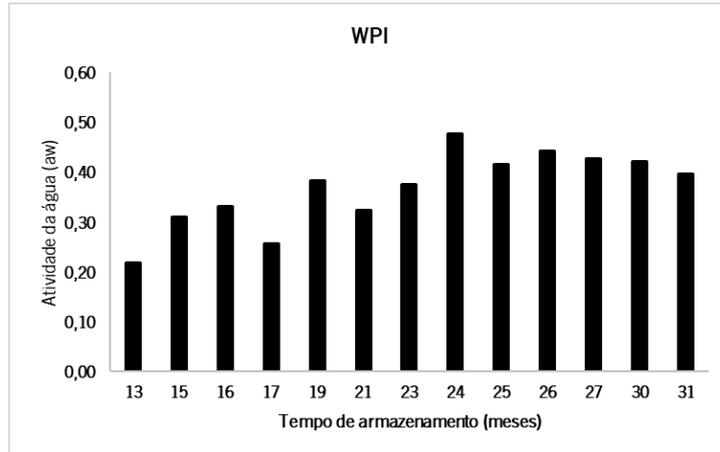


Figura 17 - Gráfico da atividade da água de amostras de WPI do fornecedor A em função do tempo de armazenamento.

Para além da alteração física do produto, a atividade da água também funciona como indicador do estado de degradação do produto, uma vez que a reação de *browning* tem início a uma atividade de 0,38 e uma taxa máxima entre atividades de 0,5 e 0,75 (Figura 18).³⁶

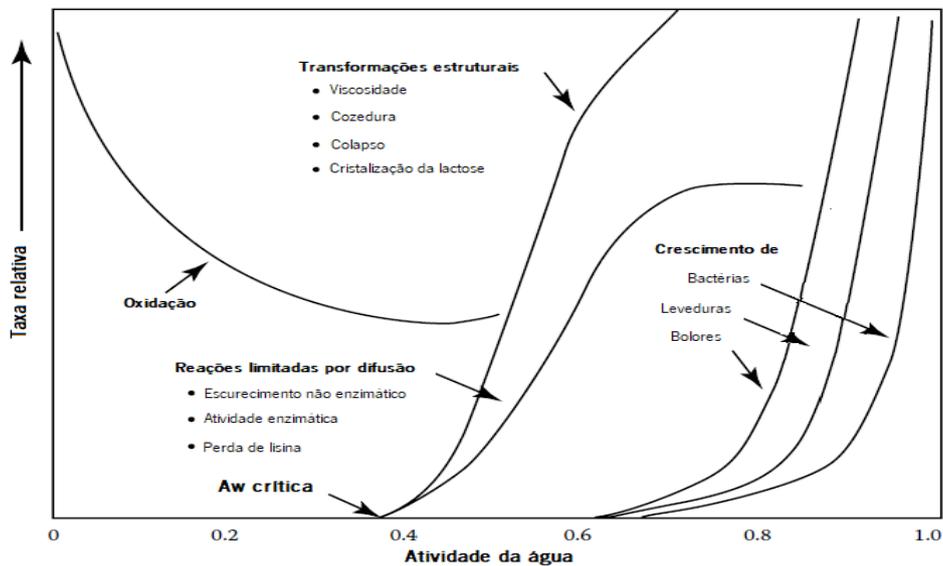


Figura 18 - Diagrama da atividade da água, com descrição das taxas de reação.¹¹

No entanto, a reação de Maillard tem início quando a atividade da água é baixa, desde 0,38 até aos 0,8. Assim, pela análise do gráfico das Figuras 15 e 17, verifica-se que as amostras

com armazenamento superior a 17 meses podem ter já começado a sofrer degradação por reação de Maillard, com diminuição do teor de lisina. Para o WPI este tempo pode ser alargado para os 21 meses, uma vez que a sua atividade de água antes dessa data, é inferior ao valor crítico.

A partir do mês 26, observou-se que tanto o WPC como o WPI, atingem uma atividade de água máxima de, aproximadamente, 0,50. Embora não tenha sido atingida a a_w onde a taxa de *browning* é máxima, o produto pode já estar degradado. A par desta reação, têm lugar outras reações enzimáticas que aumentam a taxa de degradação do produto.

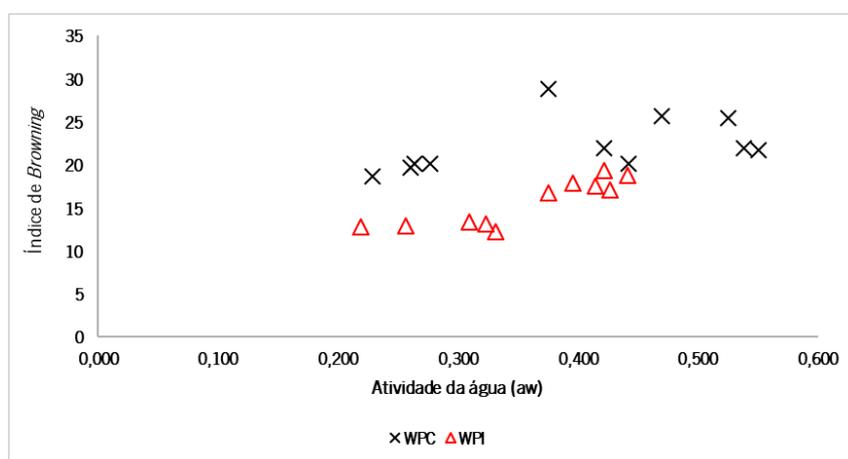


Figura 19 - Gráfico do índice de *browning* do WPC e WPI em função da atividade da água.

Pela análise do gráfico da **Figura 19**, observa-se que existe um comportamento semelhante no WPC e no WPI. No entanto verifica-se a presença de amostras que não seguem o comportamento previsto. Isto pode dever-se ao facto do valor calculado para o índice de “browning” ser baseado na cor da amostra. Uma vez que alterações nos processos de desidratação e de separação por membrana condicionam a cor final da amostra, estas podem facilmente adquirir uma cor mais amarelada ou mais esbranquiçada. Neste sentido, estes comportamentos diferentes, podem não significar um estado avançado de degradação da amostra, mas sim diferenças na produção.

4.5. Determinação de HMF

Para a determinação de HMF a nível laboratorial seguiu-se, inicialmente, um método de extração por Soxhlet. Utilizou-se 15 g de amostra, 150 mL de uma mistura de acetato de etilo com clorofórmio (1:1, v/v) como solvente de extração e refluxou-se durante 4 h. De seguida, evaporou-se o solvente num evaporador rotativo. Ao extrato adicionou-se 0,5 mL de solução de Carrez I e 0,5 mL de solução de Carrez II. Por fim, diluiu-se o extrato para 50 mL com água destilada e filtrou-se.²²

No entanto, observou-se que a amostra saía do cartucho durante a extração, devido à porosidade do cartucho ou ao volume de solvente de extração. Decidiu-se então seguir um segundo método de extração, que recorre à utilização de água destilada a 60 °C. Este método provou ser mais rápido, com uso de menos recursos e mais eficaz. Os resultados obtidos apresentam-se na **Tabela 15**.

Uma vez que não houve tempo para fazer um estudo exaustivo de todas as amostras, foram analisadas as amostras de WPC que apresentavam diferenças mais significativas entre si nos testes anteriores, sendo elas a WPC-za7, WPC-za14, WPC-za24 e WPC-za43.

A quantificação do HMF presente nas amostras foi realizada espectrofotometricamente, lendo as absorvências a 284 e 336 nm e calculando a [HMF] usando a **Equação 7**.

Tabela 15 – Concentração média de HMF obtido para amostras de WPC armazenadas em sacos de abertura fácil do fornecedor A, para diferentes tempos de armazenamento

Amostra	tA*	λ_{284} (nm)	λ_{336} (nm)	[HMF] (mg/100 mg de WPC)
WPC-za7	7	0,006	0,001	0,147
WPC-za14	14	0,128	0,111	0,253
WPC-za24	24	0,632	0,451	2,700
WPC-za43	43	0,796	0,533	3,935

*tA corresponde ao tempo de armazenamento das amostras, desde que foram produzidas, em meses

As moléculas de HMF surgem quando a reação de Maillard está num estado avançado, no qual o composto de Amadori, a pH inferior a 7, quebra originando diferentes produtos, um dos

quais o 5-hidroxiacetilfurfural. Esta via chama-se via de enolização, no entanto, não é a principal via de degradação em produtos derivados de leite, como o soro de leite.

Assim, o facto de haver uma maior concentração de HMF, significa que a reação já está num estado avançado e que já ocorreu a degradação de aminoácidos essenciais como a lisina e de açúcares como a lactose.

Pelos resultados obtidos foi possível verificar tal facto, uma vez que houve um aumento da concentração de HMF para amostras com um maior tempo de armazenamento. É de salientar que aos 7 meses de armazenamento já é possível detetar a presença deste composto, sinal de que a reação já está a ocorrer e que o produto já está degradado.

Foram ainda feitas análises para as amostras de WPI equivalentes às WPC usadas (WPI-za15, WPI-za24, WPI-za27 e WPI-za31, no entanto, não foi detetada a presença de HMF tendo sido o seu valor igual ao valor de branco, pelo que se pode concluir que este produto é mais resistente à degradação pela reação de Maillard.

4.6. Análise de amostras por cromatografia iónica

Uma outra forma de avaliar a extensão da reação de Maillard é verificar se ocorre uma diminuição da concentração da lactose e/ou da lisina, substratos iniciais da reação.³⁷ Isto pode ser conseguido recorrendo a cromatografia iónica de alta eficiência. Neste estudo, o equipamento disponível no laboratório (recentemente adquirido) estava equipado com colunas que permitiam quer a deteção de açúcares quer a deteção de aminoácidos. As misturas eluentes e as condições de corrida utilizadas foram as previamente estabelecidas e programadas no equipamento, para as colunas usadas.

4.6.1. Determinação de lactose

A ideia inicial era fazer a deteção simultânea de açúcares e aminoácidos em cada amostra injetada, isto porque o aparelho permite que as amostras sejam analisadas em duas colunas ao mesmo tempo. No entanto o que se verificou, quando se testaram os padrões da curva de calibração, foi que não se conseguia uma linha de base estável, nem uma separação evidente dos

diferentes componentes da mistura injetada, principalmente na detecção de açúcares. Para resolução deste problema foi necessário proceder à alteração das condições.

A primeira alteração introduzida foi deixar de analisar aminoácidos e açúcares em simultâneo, porque poderia estar a ocorrer perda de amostra ou de sinal no processo de separação. Esta alteração apesar de não ter permitido resolver o problema permitiu isolá-lo.

Em seguida, foi alterado o eluente, usado na separação de açúcares. Inicialmente usou-se uma solução de KOH 5 mM sem ajuste de concentração pelo equipamento e depois passou-se a usar uma solução de 100 mM programando o equipamento para ajustar o volume necessário. Nestas condições conseguiu-se melhorar a linha de base e separar os açúcares da solução padrão.

As curvas de calibração para os diferentes açúcares foram obtidas usando soluções que continham os 5 açúcares principais encontrados no leite, com concentração a variar entre 5 mg/L e os 200 mg/L (**Figura 20**). A identificação dos sinais obtidos foi conseguida analisando cada um dos açúcares individualmente, usando soluções com uma concentração de 200 mg/L.

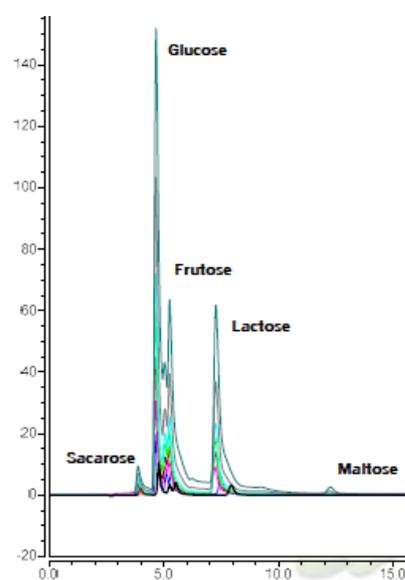


Figura 20 - Cromatograma das soluções padrão dos cinco açúcares principais.

Com os dados obtidos para a lactose (**Tabela 16**) o equipamento construiu a curva de calibração da **Figura 21**.

Tabela 16 – Valores médios da área do sinal obtidos para as diferentes concentrações de solução padrão de lactose

Concentração (mg/L)	Área do sinal	Tempo de retenção (min)
5	0,3730	4,325
10	0,6914	4,325
25	1,5054	4,342
50	2,7070	4,334
75	3,7335	4,334
100	4,7063	4,334
200	8,3410	4,334
400	14,8601	4,325

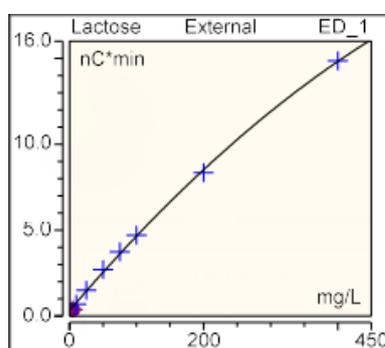


Figura 21 – Curva de calibração da lactose, obtida pelo equipamento cromatográfico (Área do sinal = 0,046 * [Lactose] + 0,314; $r^2=0,9993$)

Foram de seguida analisadas amostras de WPI com tempo de armazenamento entre os 15 e os 31 meses de acordo com um método previamente estabelecido para análise de soro de leite no equipamento usado. Para tal foram pesadas 5 g de amostra à qual foram adicionados 50 mL de uma solução etanol-água (50/50) e a suspensão colocada num banho a 80 °C, durante uma hora. Após este processo, estas suspensões eram centrifugadas a 6000 rpm durante 10 minutos, sendo o sobrenadante diluído 10x e injetados no cromatógrafo em alíquotas de 1000 µL. No entanto, as amostras assim preparadas davam origem a sinais saturados e com caudas de arraste. Decidiu-se então alterar as condições de preparação da amostra e o volume injetado.

Foi utilizado um novo procedimento de extração de lactose usando apenas água para a extração e reduzindo o volume de injeção para 10 µL, de acordo com o procedimento descrito em

Materiais e Métodos. Obtiveram-se cromatogramas com picos mais definidos e com uma boa linha de base, **Figura 22**.

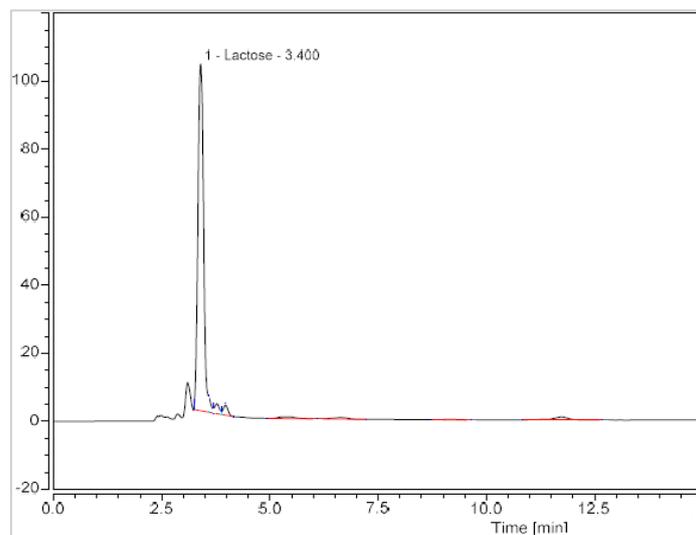


Figura 22 – Exemplo de cromatograma de detecção de açúcares de uma amostra de WPI.

Os resultados obtidos para as diferentes amostras de WPI analisadas encontram-se sumariados na **Tabela 17**.

Tabela 17 – Valores médios do teor de lactose obtidos experimentalmente (%Lac) em amostras de WPI ao longo do tempo de armazenamento e comparação com os valores iniciais (%Laci)

Amostra	tA*	Área do sinal	%Lac	%Laci	CV (%)
WPI-zA15	15	13,89	0,366	< 3	0,559
WPI-zA17	17	7,57	0,174	< 3	1,39
WPI-zA18	18	11,43	0,285	< 3	1,32
WPI-zA19	19	10,64	0,261	< 3	0,480
WPI-zA23	23	13,33	0,346	< 3	0,472
WPI-zA27	27	13,42	0,350	< 3	0,333
WPI-zA31	31	15,21	0,414	< 3	0,290

*tA corresponde ao tempo de armazenamento das amostras, desde que foram produzidas, em meses

**CV corresponde ao coeficiente de variação

Pela análise da tabela pode-se verificar que não ocorreu uma degradação significativa da lactose no WPI, pelo que será de esperar que a taxa de reação de Maillard seja reduzida, uma vez que as amostras são mantidas em boas condições de armazenamento. Este resultado está de

acordo com o resultado previamente obtido na determinação do HMF. O WPI consegue manter a integridade durante um elevado período de tempo de armazenamento analisado.

Uma vez que as amostras de WPC apresentaram uma área do sinal superior às utilizadas na curva de calibração da **Figura 21**, houve necessidade de construir uma nova curva de calibração para concentrações superiores de lactose (**Tabela 18** - Área do sinal = $0,0006 [\text{Lactose}]^2 - 0,2976 [\text{Lactose}] + 67,6057$; $R^2 = 1$).

Tabela 18 – Valores médios de área utilizados para a construção da nova curva de calibração de lactose

[Lac] (mg/L)	Área do sinal	Tempo de retenção (min)
350	24,214	3,567
450	25,320	3,542
500	26,489	3,525
600	28,427	3,500

De seguida foram analisadas amostras de WPC do fornecedor A com tempo de armazenamento entre os 15 e os 27 meses utilizando o método de determinação de lactose especificado na secção dos Materiais e Métodos. Foram obtidos cromatogramas como o da **Figura 23** e os resultados estão apresentados na **Tabela 19**.

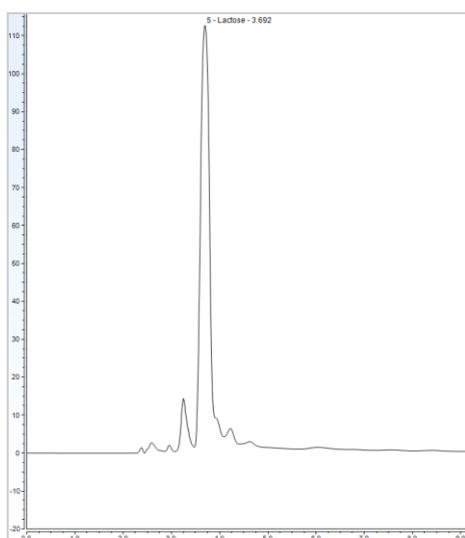


Figura 23 – Exemplo de cromatograma de deteção de açúcares de uma amostra de WPC.

Tabela 19 - Valores médios do teor de lactose obtidos experimentalmente (%Lac) em amostras de WPC ao longo do tempo de armazenamento e comparação com os valores iniciais (%Laci)

Amostra	tA*	Área do sinal	%Lac	%Laci	CV (%)
WPC-za15	15	26,31	3,23	-	0,927
WPIc-za17	17	24,99	3,37	3,9	0,000
WPC-za18	18	24,95	3,37	3,6	0,571
WPC-za27	27	24,06	3,46	5,7	0,000

*tA corresponde ao tempo de armazenamento das amostras, desde que foram produzidas, em meses

**CV corresponde ao coeficiente de variação

Pela análise da **Tabela 19**, pode-se verificar que ocorreu uma diminuição do teor de lactose relativamente ao referenciado pelo fornecedor. Este resultado poderá indicar que ocorreu degradação da lactose por reação de Maillard.

Pode ainda constatar-se que tal como esperado, dado os diferentes processos de produção, o teor de lactose no WPI é inferior ao obtido para o WPC. Assim é expectável que o WPC tenha uma maior taxa de degradação, corroborando os dados já obtidos na determinação de HMF.

4.6.2. Determinação de lisina

A perda de lisina, o aminoácido mais sensível para a degradação de Maillard, aumenta com o aumento da temperatura e do teor de humidade, pelo que o armazenamento em sacos herméticos e em condições de baixa temperatura é necessário para reduzir a taxa de reação ao máximo.

Estes aminoácidos têm sido reportados como razoavelmente estáveis durante 12 meses em produtos mantidos a uma temperatura de 37 °C e em ambiente seco. No caso de amostras mantidas a temperaturas climatizadas, os fatores distribuição e armazenamento deverão ser os mais significativos para a perda da integridade dos aminoácidos.

Iniciou-se a análise cromatográfica dos aminoácidos pela curva de calibração, utilizando uma solução contendo 20 aminoácidos. Para tornar possível a identificação de cada um dos sinais do cromatograma foram injetadas também soluções de cada aminoácido individualmente, como na determinação da lactose.

Nos resultados iniciais (**Figura 20**) não se observou uma boa linha de base, tendo-se posteriormente verificado que tinha ocorrido uma quebra no eletrodo de ouro e dano da *gasket*, na unidade de deteção. O eletrodo de ouro é responsável pela oxidação dos aminoácidos e permite a sua deteção à saída da coluna. A *gasket* é responsável por aumentar o contacto entre a coluna e o eletrodo, para que não ocorra perda de amostra. Este problema foi facilmente resolvido com a sua substituição.

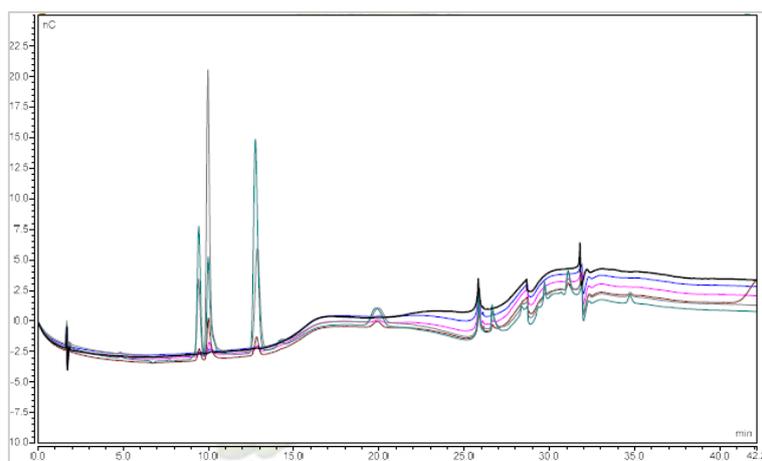


Figura 24 – Cromatograma inicial das soluções padrão dos 20 aminoácidos.

Após substituição do material foi possível repetir a análise das soluções padrão de aminoácidos, tendo sido obtidos cromatogramas como o da **Figura 24**.

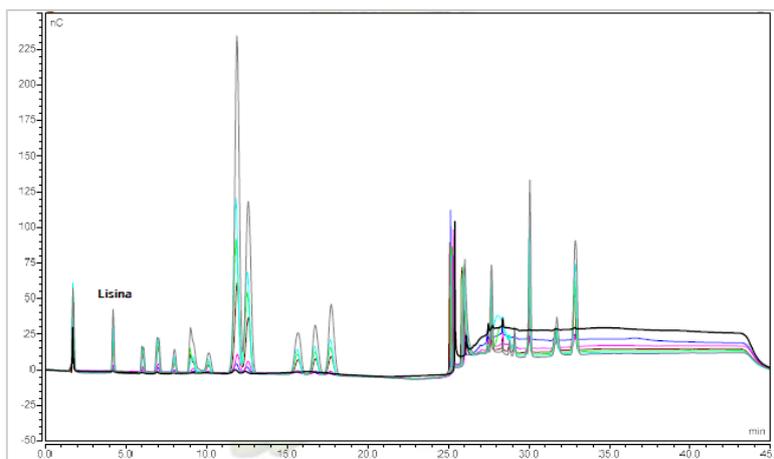


Figura 25 – Cromatograma final das soluções padrão dos 20 aminoácidos.

Com os dados obtidos para a determinação da lisina (**Tabela 20**) foi construída a curva de calibração (**Figura 26**).

Tabela 20 – Valores médios da área do sinal obtidos para as diferentes concentrações de solução padrão de lisina

[Lisina] (nmol/ μ L)	Área do sinal	Tempo de retenção (min)
0,020	0,096	4,190
0,075	0,337	4,210
0,10	0,421	4,220
0,30	1,373	4,200
0,50	2,072	4,220
0,75	3,076	4,210
1,0	3,759	4,220
1,5	4,946	4,230
2,0	5,734	4,210

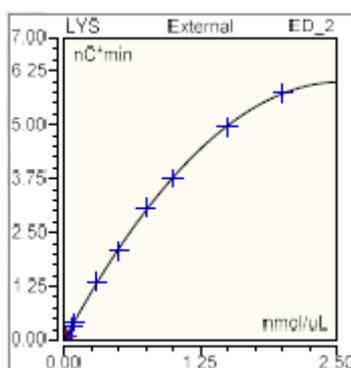


Figura 26 - Curva de calibração da lisina, obtida pelo equipamento cromatográfico (Área do sinal = $(- 0,9248) * [Lactose]^2 + 4,7110 * [Lactose] - 0,0058$; $r^2=0,9996$)

Foram, posteriormente, analisadas amostras de WPI, tendo sido obtidos cromatogramas como os da **Figura 27**. Na **Tabela 21** estão sumariados os resultados obtidos para todas as amostras de WPI analisadas.

Tabela 21 – Valores médios do teor de lisina obtidos experimentalmente (m_m) em amostras de WPI ao longo do tempo de armazenamento

Amostra	tA*	Área do sinal	[Lisina] (nmol/ μ L)	m_m (g/100 g)	CV (%)
WPI-za15	15	0,301	1,33	2,85	2,01
WPI-za17	17	0,139	0,629	1,38	2,03
WPI-za18	18	0,211	0,972	2,13	3,14
WPI-za19	19	0,229	1,03	2,25	2,58
WPI-za23	23	0,324	1,42	3,12	1,95
WPI-za27	27	0,446	1,91	4,19	2,60

*tA corresponde ao tempo de armazenamento das amostras, desde que foram produzidas, em meses

**CV corresponde ao coeficiente de variação

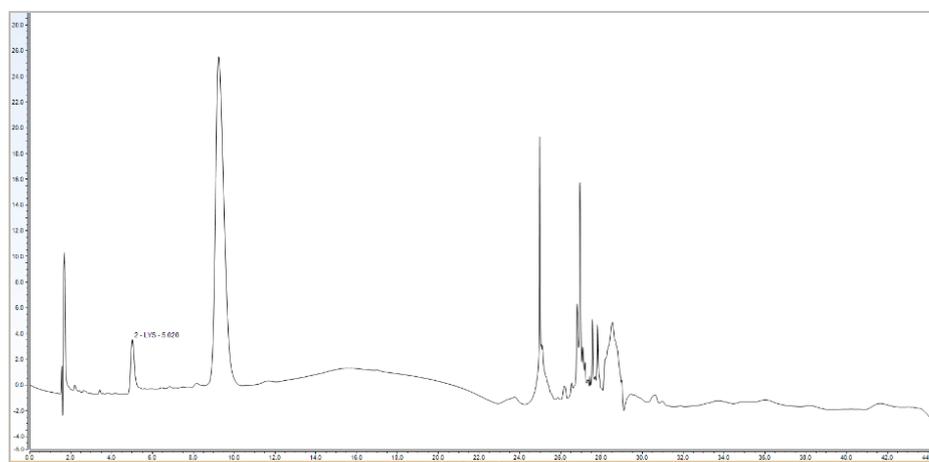


Figura 27 – Exemplo de cromatograma da detecção de aminoácidos em amostras de WPI.

A análise dos resultados obtidos nas amostras de WPI não nos permite tirar conclusões relativamente à alteração da quantidade de lisina presente.

Foram analisadas amostras de WPC, com tempos de armazenamento entre 15 e 43 meses de forma semelhante (Tabela 22 e Figura 28).

Tabela 22 - Valores do teor de lisina obtidos experimentalmente (m_{Lis}) em amostras de WPC ao longo do tempo de armazenamento

Amostra	tA*	Área do sinal	[Lisina] (nmol/ μ L)	m_{Lis} (g)	CV (%)
WPC-za15	15	1,32	4,60	10,4	4,49
WPC-za16	16	0,770	3,07	6,73	1,41
WPC-za17	17	1,54	5,05	11,1	1,59
WPC-za18	18	1,49	4,95	10,9	3,75
WPC-za19	19	2,39	5,70	12,6	2,01
WPC-za40	40	0,894	3,46	7,59	4,83
WPC-za43	43	1,58	5,12	11,2	2,01

*tA corresponde ao tempo de armazenamento das amostras, desde que foram produzidas, em meses

**CV corresponde ao coeficiente de variação

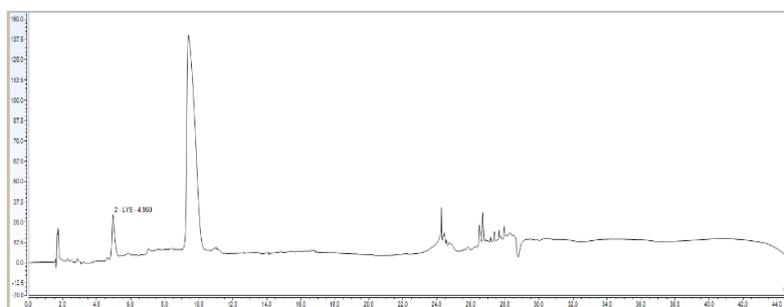


Figura 28 – Exemplo de cromatograma de detecção de aminoácidos em amostras de WPC.

Também neste caso os resultados obtidos não foram conclusivos, isto é, não se observou diminuição da concentração de lisina. Comparativamente, verificou-se que a quantidade de lisina nas amostras de WPC era superior à das amostras de WPI. Este resultado não era esperado uma vez que o teor de proteína das amostras de WPI é superior.

Estes testes terão de ser repetidos para afinar melhor as condições de detecção do aparelho.

5. Conclusão

Este trabalho foi realizado com o intuito de estudar a reação de Maillard e a sua extensão nos produtos de soro de leite concentrados e isolados, WPC e WPI, respetivamente. Para tal, as amostras foram armazenadas num espaço de ambiente controlado com temperatura (21°C) e humidade relativa (69,3%) até à data da análise.

Um dos principais fatores de degradação dos produtos em pó é a absorção de água, que altera as propriedades físicas das amostras e dá início a reações químicas como é o caso da reação de Maillard. Pela determinação da humidade pode-se verificar um aumento desta quanto maior o tempo de armazenamento, havendo um aumento abrupto entre os meses 19 e 21, corroborando o prazo de validade destes produtos que é de 18 meses. Verificou-se ainda que para amostras com o mesmo tempo de armazenamento, o WPI tem um maior teor de humidade que o WPC, que se pode dever ao facto do WPI possuir um maior teor proteico, o que torna a produto mais higroscópico.

Foi também determinado o teor proteico uma vez que, a reação de Maillard é responsável pela degradação destes compostos. No entanto, o método utilizado não se revelou eficiente uma vez que determina o teor total de nitrogénio na amostra. Como a reação mantém o nitrogénio no produto apenas formando novos compostos, é esperado que o teor de proteína assim determinado não mude. O ideal seria realizar esta determinação usando um método como o método de Bradford.

Para o consumidor uma das primeiras formas de determinar as condições de um produto é pela sua cor. O que se verificou é que para um mesmo fornecedor o comportamento é o esperado, o aumento da cor com o aumento do tempo de armazenamento, uma vez que são formados produtos com cor durante a reação de *browning*. No entanto, quando se comparava com outros fornecedores a intensidade de cor era superior o que indica que as amostras podem ter uma intensidade de amarelo superior desde a sua produção, estando a cor associada aos métodos de produção do soro de leite. Observou-se ainda que a tonalidade do WPC é mais amarela que a do WPI, o que estará associado aos métodos de separação por membrana usados na sua produção, e que ocorre uma variação mais acentuada da cor aos 21 meses de armazenamento.

Foi ainda feita a análise à atividade da água dos produtos de WPC e WPI, na qual com o aumento do tempo de armazenamento ocorreu um aumento da atividade da água corroborando os dados obtidos anteriormente. Concluiu-se também que quando os produtos são armazenados em sacos selados a integridade destes é mantida, sem grande perda das características e, conseqüentemente, do valor nutricional.

De modo a aferir a extensão da reação de Maillard foi quantificada a formação de HMF, um dos produtos finais da reação. Verificou-se que, para amostras de WPC, existe um aumento da concentração com o tempo de armazenamento, comprovando que as amostras já se encontravam em degradação por este processo. No entanto nas amostras de WPI não se observou degradação, uma vez que o HMF não foi detetável. Concluiu-se que o WPC se degrada mais rapidamente que o WPI.

Uma das conseqüências da reação de Maillard é a diminuição do valor nutricional das amostras, com degradação da lactose e da lisina. Foi verificado que para amostras de WPI o valor de lactose não varia significativamente entre os meses 15 e 31, corroborando os dados obtidos na determinação de HMF. Os restantes resultados da análise por cromatografia iónica não foram conclusivos, pelo que se deverá continuar a afinar as condições de deteção do equipamento e de preparação de amostras.

De uma forma geral os resultados obtidos permitiram confirmar que a degradação dos produtos de soro de leite aumenta com o tempo de armazenamento. Esta degradação é mais significativa para o WPC, observando-se uma alteração significativa nos valores obtidos, aos 17 meses, enquanto que para o WPI, esta diferença significativa ocorre entre os meses 17 e 21. Verificou-se também que produtos armazenados em sacos selados mantêm a qualidade da amostra por um maior período de tempo.

Nesse sentido, este estudo deverá ser repetido utilizando amostras guardadas em sacos selados e um maior número de amostras com o mesmo tempo de armazenamento.

6. Bibliografia

- (1) Morr, C. V.; Ha, E. Y. W. Whey Protein Concentrates and Isolates : Processing and Functional Properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1993**, *33*, 431–476.
- (2) Macwan, S. R.; Dabhi, B. K.; Parmar, S. C.; Aparnathi, K. D. Whey and Its Utilization. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2016**, *5*, 134–155.
- (3) Zadow, J. G. Whey and Whey Powders: Production and Uses. *Encycl. Food Sci. Nutr.* **2003**, *2*, 6147–6152.
- (4) Atra, R.; Vatai, G.; Bekassy-Molnar, E.; Balint, A. Investigation of Ultra- And Nanofiltration for Utilization of Whey Protein and Lactose. *J. Food Eng.* **2005**, *67*, 325–332.
- (5) Saxena, A.; Tripathi, B. P.; Kumar, M.; Shahi, V. K. Membrane-Based Techniques for the Separation and Purification of Proteins: An Overview. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, *145*, 1–22.
- (6) Chegini, G.; Taheri, M. Whey Powder: Process Technology and Physical Properties: A Review. *Middle East J. Sci. Res.* **2013**, *13*, 1377–1387.
- (7) Yorgun, M. S.; Balcioglu, A. I.; Saygin, O. Performance Comparison of Ultrafiltration, Nanofiltration and Reverse Osmosis on Whey Treatment. *Desalination* **2008**, *229*, 204–216.
- (8) Yee, K. W. K.; Wiley, D. E.; Bao, J. Whey Protein Concentrate Production by Continuous Ultrafiltration: Operability under Constant Operating Conditions. *J. Memb. Sci.* **2007**, *290*, 125–137.
- (9) Smithers, G. W. Whey and Whey Proteins-From “Gutter-to-Gold.” *Int. Dairy J.* **2008**, *18*, 695–704.
- (10) Kosseva, M. R.; Panesar, P. S.; Kaur, G.; Kennedy, J. F. Use of Immobilised Biocatalysts in the Processing of Cheese Whey. *Int. J. Biol. Macromol.* **2009**, *45*, 437–447.
- (11) Tehrani, E. A.; Sonneveld, K. Packaging and the Shelf Life of Milk Powders. In *Food Packaging and Shelf Life*; Taylor and Francis Group: Freising, Germany, 2010; pp 127–141.
- (12) Sithole, R.; McDaniel, M. R.; Goddik, L. M. Rate of Maillard Browning in Sweet Whey Powder. *J. Dairy Sci.* **2005**, *88*, 1636–1645.
- (13) Newton, A. E.; Fairbanks, A. J.; Golding, M.; Andrewes, P.; Gerrard, J. A. The Role of the Maillard Reaction in the Formation of Flavour Compounds in Dairy Products - Not Only a Deleterious Reaction but Also a Rich Source of Flavour Compounds. *Food Funct.* **2012**, *3*, 1231–1241.
- (14) Fayle, S. E.; Gerrard, J. A. *The Maillard Reaction*; RSC Publishing: Cambridge, UK, 2002.
- (15) Cämmerer, B.; Jalyschko, W.; Kroh, L. W. Intact Carbohydrate Structures as Part of the Melanoidin Skeleton. In *International Congress Series*; 2002; Vol. 1245, pp 269–273.
- (16) Boekel, V. M. A. J. S. Effect of Heating on Maillard Reactions in Milk. *Food Chem.* **1998**, *62*, 403–414.
- (17) Singla, R. K.; Dubey, A. K.; Ameen, S. M.; Montalto, S.; Parisi, S. *Analytical Methods for the Assessment of Maillard Reactions in Foods*; Springer: Switzerland, 2018.
- (18) Francisquini, J. D.; Martins, E.; Silva, P. H. F.; Schuck, P.; Perrone, Í. T.; Carvalho, A. F. Reação De Maillard: Uma Revisão. *Rev. do Inst. Laticínios Cândido Tostes* **2017**, *72*, 48–57.
- (19) Shalumova, T.; Tanski, J. M. 5-(Hydroxymethyl)Furan-2-Carbaldehyde. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online* **2010**, *66*, o2266–o2266.
- (20) Iglesia, F.; Lázaro, F.; Puchades, R.; Maquieira, A. Automatic Determination of 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) by a Flow Injection Method. *Food Chem.* **1997**, *60*, 245–250.
- (21) Parisi, S.; Luo, W. *Chemistry of Maillard Reactions in Processed Foods*; Springer: Switzerland, 2018.

- (22) Marquez, M. F.; Gomez, J. M.; Hernandez, E. G.; Garcia-villanova, B. New Spectrophotometric Method for Measuring Hydroxymethylfurfural in Powdered Milk. *J. Dairy Res.* **1992**, *59*, 225–228.
- (23) Dumas nitrogen and total nitrogen content - VELP Scientifica | Insights https://www.velp.com/en/service_support/dumas_nitrogen (acedido em 16 de maio de 2019).
- (24) Pathare, P. B.; Opara, U. L.; Al-Said, F. A.-J. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food Bioprocess Technol.* **2013**, *6*, 36–60.
- (25) Wojciech, M.; Maciej, T. Color Difference Delta E - A Survey. *Mach. Graph. Vis.* **2012**, *20*, 1–28.
- (26) Scientific, T. *ICS-90 Ion Chromatography System Operator 's Manual*, Thermo Scientific: United States, 2018.
- (27) Paull, B.; Enko, P. N. Ion Chromatography. In *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*; Elsevier Inc., 2013; pp 157–191.
- (28) Scientific, T. *Advances in Ion Chromatography*, 2013; Vol. 31.
- (29) Zenebon, O.; Pascuet, N. S.; Tiglia, P. *Métodos Físico-Químicos Para Análise de Alimentos*; Insitituo Adolfo Lutz: São Paulo, Brasil, 2008.
- (30) Nielsen, S. S. *Food Analysis Laboratory Manual*, Springer: United States, 2017.
- (31) Color Hex Color Codes <https://www.color-hex.com/> (acedido em 28 de outubro de 2019).
- (32) Armstrong, B.; Brockbank, K.; Clayton, J. Understand the Effects of Moisture on Powder Behavior. *Chem. Eng. Prog.* **2014**, *110*, 25–30.
- (33) Thompson, M.; Owen, L.; Wilkinson, K.; Wood, R.; Damant, A. A Comparison of the Kjeldahl and Dumas Methods for the Determination of Protein in Foods, Using Data from a Proficiency Testing Scheme. *Analyst* **2002**, *127*, 1666–1668.
- (34) Dufossé, L.; Galaup, P. Color. In *Color of dairy foods*, 2010; pp 585–606.
- (35) Doob, J. H.; Willmann, A.; Sharp, P. F. Influence of Moisture on Browning of Dried Whey and Skim Milk. *Ind. Eng. Chem.* **1942**, *34*, 1460–1468.
- (36) Gonzales, A. S. P.; Naranjo, G. B.; Leiva, G. E.; Malec, L. S. Maillard Reaction Kinetics in Milk Powder: Effect of Water Activity at Mild Temperatures. *Int. Dairy J.* **2010**, *20*, 40–45.
- (37) Ford, J. E.; Hurrell, R. F.; Finot, P. A. Storage of Milk Powders under Adverse Conditions. *Br. J. Nutr.* **1983**, *49*, 343–354.