

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

PROPRIEDADES DE MELANOIDINAS OBTIDAS
POR REAÇÃO ENTRE GLUCOSE E GLICINA

Sergio Roberto de Andrade Leite
Bacharel em Química

ORIENTADOR:

Prof. Paulo Anna Bobbio

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas para a
obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

-1979-

DEDICADO A

FLORIANO, SEMIRAMIS, SONIA E SYLVIO.

ÍNDICE

	Página
I. Introdução.....	1
II. Revisão bibliográfica.....	2
III. Materiais	22
IV. Métodos	
A) Síntese das melanoidinas	23
B) Dosagem da glucose residual.....	24
C) Análise elementar.....	25
D) Determinação dos pesos moleculares	
1. Filtração em gel de Sephadex	26
2. Ultracentrifugação em gradiente de sacarose.....	27
E) Espectros visível, ultravioleta e infravermelho das melanoidinas.....	27
F) Testes qualitativos da solubilidade.....	28
G) Reações químicas com as melanoidinas	
1. Ensaio prévios.....	28
2. Oxidação com permanganato de potássio.....	28
3. Redução com hidrogênio nascente.....	29
4. Redução com boroidreto de sódio	29
5. Acetilação.....	30
H) Titulação potenciométrica da melanoidina.....	30
I) Dosagem de Na^+	30
J) Reações com íons metálicos	
1. Precipitação com íons metálicos.....	31
2. Reação com Cu^{2+}	

a) Precipitação.....	32
b) Determinação da constante de estabilidade do complexo melanoidina - Cu^{2+}	32
3. Determinação da constante de estabilidade do com plexo melanoidina - Fe^{3+}	33
L) Influência da melanoidina no crescimento do - <i>Staphylococcus aureus</i> S6.....	33
V. Resultados	
A) Síntese das melanoidinas	35
B) Dosagem da glucose residual.....	41
C) Análise elementar.....	42
D) Determinação dos pesos moleculares	
1. Filtração em gel de Sephadex.....	43
2. Ultracentrifugação em gradiente de sacarose.....	52
E) Espectros infravermelho, visível e ultravioleta das melanoidinas.....	53
F) Testes qualitativos da solubilidade.....	62
G) Reações químicas com as melanoidinas	
1. Ensaios prévios.....	63
2. Oxidação com permanganato de potássio.....	64
3. Redução com hidrogênio nascente.....	65
4. Redução com boroidreto de sódio.....	66
5. Acetilação.....	67
H) Titulação potenciométrica da melanoidina.....	70
I) Dosagem de Na^+	72
J) Reações com íons metálicos	
1. Precipitação com íons metálicos.....	73

2. Reação com Cu^{2+}	
a) Precipitação.....	74
b) Determinação da constante de estabilidade do complexo melanoidina - Cu^{2+}	74
3. Determinação da constante de estabilidade do com- plexo melanoidina - Fe^{3+}	77
L) Influência da melanoidina no crescimento do	-
<i>Staphylococcus aureus</i> S6.....	78
VI. Discussão dos resultados.....	83
VII. Conclusões.....	94
VIII. Referências bibliográficas.....	96
Resumo.....	109
Abstract.....	110
Agradecimentos.....	111
Apêndice.....	112

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Um dos primeiros estudos químicos de matérias húmicas do solo foi feito por Berthelot e André (4), em 1894. Estes autores determinaram a composição elementar de amostras de húmus extraídas de dois tipos de solo:

SOLO	C	H	N	O
I	55,32	5,29	4,24	35,15 *
II	58,58	5,12	3,04	35,26

* Inclui um pouco de enxofre.

Em 1902, Dehérain (16) separou um material semelhante do esterco. Este foi tratado com água quente e o extrato colorido obtido, de reação alcalina, foi precipitado com ácido-clorídrico. Foram obtidos produtos que, após a separa-ção das cinzas, apresentaram as seguintes composições elementares:

AMOSTRA	C	H	N	O
I	59,4	5,4	4,7	30,5
II	59,2	5,2	4,3	31,3

O primeiro pesquisador que estudou sistematicamente as melanoidinas sintéticas foi L.C. Maillard, que mostrou a existência de analogia entre elas e os ácidos húmicos

I. INTRODUÇÃO

Melanoidinas são polímeros de cor escura, produtos finais da reação entre compostos carbonílicos e aminados. O primeiro autor a atribuir este nome a tal tipo de composto, mais especificamente, aos pigmentos formados ao se aquecer aminoácidos com açúcares, foi Maillard, em 1912, o qual foi o precursor do estudo sistemático destas substâncias. Antes de Maillard, o nome melanoidina já havia sido usado por Schmiedeburg em 1897, com referência a produtos escuros obtidos pela ação dos ácidos ou do calor sobre proteínas.

A substância escura do húmus do solo e de carvões fósseis recentes, a humina ou ácido húmico, tem natureza similar às melanoidinas, fato esse já verificado por Maillard.

A estrutura das melanoidinas, bem como suas propriedades, são ainda pouco conhecidas. Tais produtos têm grande interesse para a tecnologia de alimentos, pois sua presença ou ausência podem determinar a aceitação ou rejeição de um alimento. Também a possibilidade de efeitos nocivos das melanoidinas sobre a nutrição animal e seu efeito antioxidante em gorduras, indicam a importância do seu estudo. No presente trabalho, procurou-se estudar a melanoidina obtida por reação entre glucose e glicina, sob condições padronizadas.

naturais. O pioneirismo dos seus trabalhos, que vieram à luz em vários números dos periódicos franceses *Comptes Rendues des Séances de L'Académie des Sciences* e *Annales de Chimie et de Physique*, valeu-lhe a associação do seu sobrenome ao conjunto de reações que dão origem às melanoidinas, que passou a ser conhecido como reação de Maillard.

Em sua primeira publicação, em 1912 (32), Maillard descreveu a experiência que fez aquecendo glicina com quatro vezes sua massa de glucose, mais tres a quatro partes de água. A solução foi-se tornando cada vez mais escura e mais tarde liberou CO_2 , que foi reconhecido borbulhando em água de barita. Fez reagir também outros aminoácidos - valina, sarcosina, leucina, tirosina, ácido glutâmico e alanina, este último o mais ativo, segundo Maillard - e outros açúcares - xilose, arabinose, frutose, galactose, manose e sacarose. A lactose e a maltose reagiram mais lentamente e a sacarose só produziu uma reação leve após várias horas, secundária, segundo o autor, a um desdobramento do açúcar. Pelas palavras de Maillard, a reação é violenta a 150°C , muito rápida a 100°C e só se observa após alguns dias a 37°C .

Num trabalho seguinte (33) no mesmo ano, Maillard verificou que os produtos escuros provenientes da combinação de açúcares com aminoácidos continham nitrogênio em sua estrutura, sendo o teor de N da mesma ordem do das matérias húmicas do solo. Segundo Maillard, a formação de melanoidinas se dava em temperaturas bem mais baixas do que as de produção do caramelo e o desprendimento de CO_2 se dava sem que houvesse absorção significativa de oxigênio pelo sistema.

No ano seguinte (1913), Maillard (34) publicou outro artigo, no qual descreveu a formação de melanoidina a partir de açúcares e polipeptídeos: um dipeptídeo, a glicil-glicina, e peptonas comerciais. Houve formação de produtos escuros e desprendimento de CO_2 , como no caso dos aminoácidos.

Em 1916, Maillard (35) descreveu a síntese de melanoidinas e com mais minúcias, testes sobre a influência do oxigênio na reação e medidas do CO_2 desprendido. Determinou a composição elementar de diversas frações insolúveis. Uma delas, por exemplo, foi a seguinte: C 58,85% ; H 4,92% ; N 4,35% e O 31,88%.

No ano seguinte, Maillard (37) publicou um novo trabalho, no qual procurou mostrar com mais cuidado a identidade de suas melanoidinas com as substâncias húmicas naturais, lançando mão principalmente de dados de análise elementar.

Em 1916, Stoltzenberg (57) descreveu a extração de um material escuro, insolúvel em álcool, do melaço de beterraba. Tal substância tinha a seguinte composição elementar : - C 54,92% ; H 5,66% ; N 6,60% ; O 32,82% , o que corresponde à fórmula mínima $\text{C}_{20} \text{H}_{24} \text{O}_9 \text{N}_2$. Sua redução com hidrogênio nascente em meio alcalino (Al + NaOH , amálgama de sódio e Na + álcool) produziu um material floculento, insolúvel em alcali e solúvel em ácido: Já em meio ácido (Zn + HCl) descolorou, produzindo uma solução amarela límpida. Oxidação com clorato de potássio e ácido clorídrico, resultou num material insolúvel e floculento, o qual com água oxigenada em meio acético se solubilizou e clareou. O pigmento descorou uma solução ácida de permanganato de potássio e com água de bromo formou

um produto de adição solúvel.

Ripp (49), em 1926, aqueceu a 160°C 4 partes de D-frutose, 1 parte de glicina e 4 partes de água. A fração in solúvel em água do pigmento obtido, apresentou uma composição elementar correspondente à fórmula mínima $C_{12} H_5 O_6 N$. Não reagiu com fenilidrazina, reduziu o licor de Fehling e sua redução com hidrogênio nascente (zinco em meio alcalino) fez com que perdesse grande parte da cor.

Du Toit e Page (18), em 1932, descreveram a extração de ácido húmico do solo e da turfa, além da preparação de ácidos húmicos artificiais, a partir de sacarose, celulose, glucose e glicina, furfural , hidroquinona e lignina. As composições elementares de alguns dos pigmentos estão na tabela abaixo:

SUBSTÂNCIA	C	H	N
ÁCIDO HÚMICO DO SOLO	56,0	5,1	5,36
ÁCIDO HÚMICO DE TURFA	50,8	5,4	2,37
MELANOIDINA DE GLUCOSE- GLICINA	53,1	5,2	5,46

Enders (19), em 1938, preparou e estudou as propriedades de melanoidinas, as quais comparou com ácidos húmicos. Uma melanoidina considerada por Enders como padrão, apresentou as seguintes características: peso molecular - 1478 ; análise elementar - C 54-60 % ; H 4,9 - 5,2% ; N 3,5 - 5,3% ;

adicionou 7,3% de cloro (tratamento com SOCl_2) e 28,8% de bromo; possuía 9,6% de grupos OH alcoólicos, 6,5% de OH fenólicos, 2,6% de O carbonílico, 6,1% de metoxila de éter e 10,4% de metoxila de éster; sua solubilidade em solução alcalina era de 66% à frio e 92,6% à quente.

Enders e Theis (20), 1938, prepararam a partir de glucose e glicina uma melanoidina, por aquecimento em banho de areia, por 10 horas, sob refluxo, de 100g de glicina e 400g de glucose com 600 ml de água. A solução escura e viscosa resultante, formou uma massa gelatinosa ao esfriar, a qual foi desidratada por tratamento com álcool, triturando em um almofariz. O tratamento foi repetido com acetona e com éter, sendo o produto finalmente secado. Obtiveram um pó escuro, cuja fórmula era $\text{C}_{67} \text{H}_{76} \text{O}_{32} \text{N}_5$ e o peso molecular 1432. O produto continha os seguintes grupos: 5 carboxilas, 8 hidroxilas alcoólicas e 3 fenólicas, 2 carbonilas, 17,07% de MeO e poucas duplas ligações. Oxidação com ácido nítrico concentrado produziu principalmente ácido oxálico e em menor quantidade os ácidos glicólico, succínico, pícrico e di-hidroxibenzenodicarboxílico. Água oxigenada converteu a maior parte do carbono e do nitrogênio em CO_2 e amônia, além de produzir pequenas porções de ácidos fórmico, glicólico, acético, succínico e talvez tartárico.

Weast e McKinney (65), em 1941, isolaram um material escuro de damascos secos escurecidos. Sua composição elementar era semelhante à da melanoidina preparada a partir de ácido aspártico e açúcares:

MELANOIDINA NATURAL

C	H	N
53,05-53,16	4,90-5,03	3,25-3,26

MELANOIDINAS SINTÉTICAS

AMINOÁCIDO	AÇÚCAR	% DE N
Ácido Aspártico	Glucose	3,05-3,06
Ácido Aspártico	Frutose	3,09-3,10
Asparagina	Glucose	5,7 -5,8
Asparagina	Frutose	7,6 -7,7

Enders (21), em 1943, sintetizou uma melanoidina a partir de glicina e metilglioxal, este um provável precursor dos ácidos húmicos do solo. Usando 3 g de glicina e 3 g de metilglioxal em 20 ml de água, a 150°C, obteve ácidos húmicos cuja solubilidade diminuiu e o conteúdo de nitrogênio aumentou com o tempo de reação, conforme a tabela abaixo:

TEMPO DE REAÇÃO (H)	% DE ÁCIDO HÚMICO INSOLÚVEL	C	H	N
0,5	0,12	59,13	5,12	5,25
1	0,92	59,23	5,50	6,35
3	1,23	-	-	-
6	1,99	60,72	5,46	6,81
9	4,19	60,25	5,00	6,30
18	5,07	60,27	5,29	6,51
36	5,73	60,15	4,75	7,10
70	6,12	60,03	5,12	7,18

Tan e cols. (58), em 1950, prepararam pigmentos a

partir de D-xilose e glicina e 2-furaldeído e glicina, de várias maneiras:

1º) Por aquecimento de 0,025 moles de xilose ou furfural com 0,250 moles de glicina, em 200 ml de água, a 95°C, seguido de diálise dos produtos contra água destilada e posterior precipitação da melanoidina com dioxano ou etanol;

2º) Aquecendo 0,20 moles de xilose ou furfural com igual quantidade de glicina mais 200 ml de água, a 95°C por dois dias, filtrando em seguida; no caso da xilose o filtrado foi dialisado, pois continha bastante melanoidina solúvel;

3º) Aquecendo sob refluxo, por 40 horas, 0,05 moles de xilose (ou furfural) e de glicina em 200 ml de água, filtrando no final.

Os autores compararam as propriedades das melanoidinas da xilose e do furfural, a saber: composição elementar, espectros ultravioleta, visível e infravermelho e comportamento frente ao bromo. A semelhança entre os resultados fez com que os autores sugerissem que o furfural fosse um precursor provável da melanoidina obtida a partir da xilose.

Wolfson e cols.(68), em 1953, sintetizaram melanoidinas a partir de glicina e L - arabinose, D- xilose e D-glucose, sendo os açúcares marcados com ^{14}C na posição 1 e a glicina no C1 ou C2. As soluções aquosas 0,125 M em açúcar e 1,25 M em glicina foram aquecidas sob corrente de nitrogênio a 95°C por 90 horas; sendo os produtos purificados por diálise, precipitados com dioxano e secados sob pressão reduzida. A análise elementar, no caso da melanoidina da glucose, foi a se -

guinte: (%) C 56,17; H 5,60 ; N 8,87. Baseados na medida da radioatividade dos produtos e na análise elementar, os autores propuseram as seguintes unidades repetitivas para os políme - ros: $C_6 H_6 O_2 N (CH_2) (CO_2H)_{0,5}$ no caso da glucose ; $C_5 H_4ON (H_2O)_{0,5} (CH_2) (CO_2H)$ no caso das pentoses.

Carson e Olcott (12), em 1954, fizeram reagir ace - taldeído e amônia, entre 3 e 25°C , em solução aquosa, com tam - pão fosfato a pH 6-7.

Obtiveram pigmentos hidrossolúveis , que depois de secos se apresentaram como pós escuros, higroscópicos , amar - gos , solúveis em água , metanol e etanol , insolúveis em éter , acetona e acetato de etila ; não reduziram o licor de Fehling.

Titulação potenciométrica entre pH 6 e pH 11 mos - trou que menos da metade do N é básico, estando o restante provavelmente na forma de $^+C = N^-$. O espectro UV mostrou a existência de um máximo de absorção entre 272-277 nm, super - posto a uma absorção generalizada.

A hidrogenação catalítica catalisada com óxido de platina ou paládio sobre carvão, resultou em mudança de cor ou do espectro UV ; a absorção de hidrogênio foi muito len - ta.

Tratamento com boroidreto de sódio em solução aquo - sa, não diminuiu a cor apreciavelmente.

Na tabela abaixo estão resumidos os resultados de Carson e Olcott das análises elementares dos pigmentos obtidos:

REAGENTES	RAZÃO MOLAR ALDEÍDO / AMINA	C	H	N
AMÔNIA ACETALDEÍDO	2,0	61,0	8,51	9,02
METILAMINA ACETALDEÍDO	2,0	62,4	8,87	8,86
ETILAMINA ACETALDEÍDO	1,0	63,8	9,07	7,66
ETILAMINA ACETALDEÍDO	2,3	64,3	9,08	7,71
ETILAMINA ACETALDEÍDO	4,0	64,3	8,91	7,78
N-BUTILAMINA "	2,0	67,2	9,81	6,65
CICLO-HEXILAMINA "	2,5	68,7	9,18	5,32
ETILAMINA CROTONALDEÍDO	2,0	65,1	8,79	7,02

Em 1957, Binkley (5), isolou do melaço da cana de açúcar melanoidinas que, por hidrogenólise, com hidrogênio a 200 atm e 165-170°C, na presença de níquel de Raney, forneceu D-glucitol (sorbitol) e D-manitol, indicando que as estruturas fundamentais dos reagentes (hexoses) foram retidas no polímero.

Um pigmento isolado por Binkley (6), em 1957, do melaço de cana da Flórida, por meio de diálise, apresentou a seguinte composição elementar: (%) C 47,33 ; H 6,04 ; N 3,16 ; O 36,00, a qual corresponde à fórmula mínima $C_{17-18} H_{26} O_{10} N$. Os resultados de sua oxidação com $NaIO_4$ e $Pb(OAc)_4$, indicaram a existência de estruturas do tipo furanose, com ligações 1+6 e 2+6.

Em 1958, Binkley (7) estabeleceu para a melanoidina do melaço, por adição de bromo, a presença provável de 1,6 a 1,8 grupos insaturados por unidade correspondente à fórmula mínima, diminuindo a cor de 72%. A acetilação com anidrido acético e trifluoreto de boro indicou 6 ou 7 grupos hidroxila por unidade.

Pela formação da oxima da melanoidina, por reação com cloridrato de metoxiamina, Binkley (8), em 1958, verificou um consumo de 0,53 milimoles do reagente por grama de polímero, sugerindo a existência de uma carbonila para cada cinco unidades fundamentais.

Em 1960, Binkley (9) por meio de ultracentrifugação e medidas de viscosidade, estabeleceu um peso molecular de 27000 ± 1000 para sua melanoidina. Concluiu ser a forma do polímero próxima a de um enovelado aleatório. Ainda em 1960, Binkley (10), por medidas de difusão em membrana, encontrou o valor de 14000 para o peso molecular da melanoidina. O autor propôs a seguinte fórmula para a unidade monomérica: $C_{28-29} H_{40-41} O_{18-19} N_2$, a qual é consistente com a presença de 3 hexoses e 2 resíduos de aminoácidos de 5 carbonos, que é representativo dos encontrados no caldo de cana.

Underwood e cols. (61), em 1961, isolaram o corante escuro do xarope de bordo, por meio de resinas de troca iônica e diálise, obtendo a fórmula empírica $C_{18} H_{27} O_{12} N$. O produto foi acidificado com ácido clorídrico até pH 3 e novamente dialisado. A análise elementar das duas frações foi a seguinte:

PIGMENTO	C	H	N	O
Antes da Acidificação	48,5	6,8	3,6	41,1
Depois da Acidificação	47,8	6,0	3,1	43,1

O espectro IV mostrou uma banda forte de hidroxila e uma fraca de CH, além de bandas de carboxilato, que enfraqueceram após a acidificação. O espectro UV apresentou um aumento rápido na absorção com a diminuição do comprimento de onda, mais acentuado de 250 nm para baixo. Reynolds e Fenwick (46), em 1961, apresentaram um espectro que mostrava uma absorção também difusa, com um pico em 290 nm, para um pigmento preparado em pH 3,6 a partir de glucose e glicina; uma outra melanoidina, sintetizada em pH 6,1, apresentou um pequeno pico ou platô em 270 nm. O pigmento sintetizado em pH 6,1 era solúvel em água e aquele em pH 3,6, insolúvel.

Os espectros IV de melanoidinas preparadas a partir de glucose com glicina ou etanolamina, apresentaram bandas fortes características de OH, C = O e $>C=C<$ conjugadas, conforme a interpretação de Reynolds (47) em 1962.

Reinefeld e Mussawi - Barab (44), em 1963, isolaram melanoidinas do melaço de beterraba. Concluíram que a fração de maior peso molecular se tratava de um esfero-colóide de elevado poder corante.

Clark e Tannebaum (13), em 1970, prepararam pigmentos tipo melanoidina, por reação entre caseína e glucose 2: 1

em massa. A mistura foi dissolvida em NaOH 0,1N , secada por aerosol e guardada em frascos abertos a 36 e 55°C , com 75% de umidade relativa. O pigmento ligado à proteína foi separado por lavagem no ponto isoelétrico e tratamento do precipitado resultante com uma enzima proteolítica durante 48 horas. O pigmento obtido ainda reteve uma porção protéica, chamada de peptídeo limite. O pigmento peptídeo limite (PPL) foi purificado por filtração em Bio - Gel a pH 7,0, sendo as frações de peso molecular em torno de 1500 purificadas em coluna de carboximetilcelulose e as de peso molecular entre 5000 e 20000 em Bio - Gel P10.

A análise elementar do PPL forneceu o seguinte resultado: (%) C 43,70 ; H 6,04 ; N 11,27. Descorou uma solução alcalina de KMnO_4 , o que indicou a presença de grupos redutores ou duplas ligações.

O espectro IV mostrou bandas características de proteínas e açúcares. O espectro UV - visível do pigmento se caracterizou por uma relação linear entre os logaritmos da absorbância e do comprimento de onda, que não foi afetada pelo descoramento com NaOCl , NaBH_4 e H_2O_2 , nem por acidificação. Um aumento no tempo de reação resultou em aumento no peso molecular dos PPL.

Os autores concluíram que tais produtos não eram homogêneos, sendo formados por estruturas em que carboidratos altamente degradados estão ligados em vários locais da proteína.

Kato e cols.(28), em 1971 , investigaram as mela-

noidinas preparadas por reação entre D-xilose e glicina ou butilamina, separando frações de diferentes pesos moleculares por filtração em gel. Massas iguais de melanoidina consumiram quantidades praticamente iguais de KMnO_4 , independentemente do peso molecular. A intensidade da cor a 470 nm aumentou com o aumento do peso molecular; já a 300 nm, a absortividade foi aproximadamente constante. O conteúdo de nitrogênio quase não variou com o grau de polimerização, mas a razão C/N aumentou com o aumento do peso molecular.

Selemenev e cols.(52) (1972), fizeram a separação eletroforética de melanoidinas obtidas a partir de açúcar invertido, obtendo 13 frações, 2 com carga negativa e 11 com carga positiva. Espectroscopia no IV e UV mostraram que todas elas possuíam grupos amino, carboxila, carbonila e hidroxila, e algumas delas grupos insaturados.

Motai (40), em 1973, estudando melanoidinas verificou que a intensidade da cor destes pigmentos variava em função do aminoácido empregado na sua síntese e do tempo de reação.

Binkley (11), em 1974, publicou um trabalho em que demonstrou pelo espectro IV a presença de H-O, C-H e C-O, além de uma combinação de bandas características de íons dipolares em aminoácidos ("zwitterion"). A bromação e a hidrogenação da melanoidina mostraram que os cromóforos são, em sua maioria, grupos insaturados. Traçadores radioativos ^{14}C e ^3H indicaram que os aminoácidos sofreram condensação, polimerização e alguma descarboxilação durante a polimerização.

Agarwal e cols.(1) (1974) examinaram o espectro IV de melanoidinas, preparadas por reação de glucose com glicina, β -alanina , ácido T-aminobutírico e asparagina. Os picos em $3500 - 3400 \text{ cm}^{-1}$ foram atribuídos a vibrações do grupo / N-H. Os espectros obtidos com as melanoidinas preparadas com β -alanina e ácido T-aminobutírico apresentaram também uma banda larga , fraca, entre $800 \text{ e } 665 \text{ cm}^{-1}$, devido a vibração fora do plano do N-H de amins primárias e secundárias.

Motai e Inoue (41), em 1974, prepararam melanoidinas aquecendo açúcar com aminoácido, fracionando depois o produto obtido em DEAE - celulose , designando as frações resultantes com as siglas de P1 a P8.

O espectro IV da fração P5 mostrou as seguintes bandas:

BANDA (cm^{-1})	CORRELAÇÃO
3300	OH ou NH
1060	OH
1630	>C=C< CONJUGADAS

A fim de estudar a relação entre a intensidade de cor e o peso molecular, Motai (42) (1974) obteve uma melanoidina a partir de glicina e xilose. A melanoidina foi purificada por filtração em gel de Sephadex G-15 e foram separadas oito frações em uma coluna de DEAE - celulose, por eluição com tampão acetato contendo concentrações crescentes de cloreto de sódio. Motai (42) relacionou os coeficientes de distribuição K_d

destas frações com as absorvâncias de suas soluções a 1%:

$$K_d = a \log E + b$$

onde E é a absorvância. Desde que

$$K_d = a' \log M + b'$$

sendo M a massa molecular, segue que

$$E = KM^\alpha$$

onde $\alpha = \frac{a'}{a}$ e $K = 10^{b' - b/a}$

Motai (42), verificou que com o aumento do tempo de aquecimento, o valor de α tendeu a aumentar e o K a diminuir. Paralelamente, ocorreu um aumento de E e do peso molecular.

Tendo em vista que o aquecimento das frações em presença do ar promoveu sua interconversão na ordem de P_1 a P_8 , Motai (42) concluiu que ocorria polimerização da unidade estrutural no processo de formação da melanoidina, sendo que a intensidade da cor aumentava com o grau de polimerização, de acordo com a equação proposta.

Motai (43) (1975) verificou também que havia uma relação entre a intensidade de cor E e a viscosidade (η) de soluções de melanoidinas:

$$E = K_3 (\eta)^{\alpha_3}$$

Pela equação obtida anteriormente (42):

$$E = K M^\alpha$$

e desde que, pela equação de Staudinger para polímeros:

$$(\eta) = K_2 M^{\alpha_2}$$

Motai (43) concluiu que as melanoidinas são constituídas por uma série homóloga de polímeros.

Milic e cols.(39) , em 1975 , usando cromatografia em coluna de Permutit ES , isolaram um pigmento escuro da cevada torrada. Os referidos autores também prepararam uma melanoidina sintética, pela reação a 93°C por 230 horas em pH 2,3 , entre glucose 0,5 M e ácido L-aspartico 0,25M. Em seu trabalho, Milic e cols.(39) determinaram as seguintes fórmulas empíricas para os seus produtos: $C_{18}H_{27}O_{11}N$ para a melanoidina da cevada e $C_{18}H_{26}O_{11}N$ para a sintética. O espectro UV das duas melanoidinas mostrou uma absorção difusa , que aumentava com a diminuição do comprimento de onda, particularmente abaixo de 250 nm. O espectro IV forneceu uma banda forte de OH e uma fraca de C-H , ausência de carbonila e presença de carboxilato.

Em vista do comportamento em Permutit, os autores concluíram que a melanoidina de cevada tinha natureza iônica com uma carga líquida negativa.

Kajimoto e cols. (27) (1975) investigaram a capacidade de ligação de melanoidina com íons metálicos. A melanoidina foi preparada aquecendo uma mistura de glicina com D-xilose a 100°C por 5 horas, fracionando o produto da reação com Sephadex G-25 ou cromatografia em camada delgada. A reação com os íons Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , e Mg^{2+} foi feita a 50°C . Os precipitados formados foram separados por filtração, sendo medida sua quantidade e seu conteúdo de íon metálico. A quantidade de complexo melanoidina - metal aumentou com o aumento do tempo

de reação entre a melanoidina e o íon metálico e também com o aumento do tempo de reação entre a glicina e a xilose.

A quantidade foi maior para o Fe , seguida pelo Cu, Zn e Mg ; cromatografia em camada delgada do complexo deu uma mancha apenas.

Kato e cols.(29) (1975), no decorrer de estudo sobre a atividade antioxidativa de melanoidinas e derivados, verificaram que tais pigmentos se descoravam completamente ao serem oxidados com permanganato ; redução com NaBH_4 também fez desaparecer quase toda a cor.

Shah e cols.(54), em 1976 , fizeram os espectros IV de ácidos húmicos padrões e de produtos da reação de D-glucose com glicina ou uréia. Todas as substâncias mostraram bandas de absorção nas regiões de 5,8 - 6,0 μm e 2,7 - 2,8 μm . Os ácidos húmicos e a melanoidina obtida a partir de glucose e glicina , tinham ainda bandas em 2,9 - 3,0 μm , 3,3 - 3,4 μm e 7,1-7,2 μm

Velisek e Davidek(62) em 1976 prepararam pigmentos por reação de glioxal com glicina, obtendo melanoidinas com propriedades muito semelhantes às formadas a partir de açúcares e compostos aminados. Tais pigmentos tinham um alto peso molecular, eram solúveis em água e em ácidos minerais e insolúveis em solventes orgânicos apolares.

O conteúdo de nitrogênio das melanoidinas diminuiu com o aumento da temperatura e do tempo de reação. Paralelamente, cresceram as razões C/N e O/N , provavelmente devido a condensações aldólicas.

Barbetti e Chiappini (2) , em 1976 , aqueceram sob

refluxo quantidades equimolares (0,02 moles) de glucose e de glicina em 60 ml de água destilada; as melanoidinas formadas foram separadas por filtração em gel. Seus espectros no UV apresentaram máximos em 255 e 280 nm , que foram correlacionados com carbonilas conjugadas com 2 e 3 duplas ligações, respectivamente. O espectro IV mostrou bandas fortes nas regiões de 3400 cm^{-1} (OH com o H ligado), 2320 cm^{-1} e 2100 cm^{-1} (grupo $\text{C}=\overset{+}{\underset{|}{\text{N}}}-\text{H}$). Uma banda em 1600 cm^{-1} foi sugerido ser devida a $\text{C}=\text{O}$. Outra em 1550 cm^{-1} poderia estar associada a vibrações de anéis heterocíclicos, como pirrões, pirazinas e pirimidinas. Duas bandas, uma em 1500 cm^{-1} e outra em 1380 cm^{-1} , propuzeram que fossem produzidas pelo grupo carboxilato. Uma banda em 1300 cm^{-1} é característica de álcoois (estiramento OH) e outras em $1020 - 1050\text{ cm}^{-1}$ aparecem em álcoois e carboidratos (estiramento C-O).

A oxidação das melanoidinas por permanganato ou por ácido peracético (Barbetti e Chiappini (3) , 1976), produziu os ácidos glicólico, oxálico, malônico, succínico, glutárico e 2,5-furanodicarboxílico. Este último foi considerado como indicativo de que o hidroximetilfurfural seria um precursor desses pigmentos.

Gomyo e Horikoshi (23) , em 1976 , fizeram um estudo sobre a interação de melanoidinas com íons metálicos. A melanoidina empregada neste estudo foi obtida aquecendo uma solução de glicina 2M , D-glucose 2M e NaHCO_3 0,2M , a 95°C , por 36 horas. A solução escura obtida foi precipitada juntando HCl até pH 2,5 , a melanoidina separada por centrifugação

e redissolvida em solução de NaOH pH 11,0 , de onde foi precipitada novamente com HCl. Tal tratamento foi executado doze vezes, após o que o precipitado foi liofilizado e guardado sob vácuo. O produto forneceu a seguinte análise elementar : (%) C 53,0 ; H 5,1 ; O 36,5 ; N 6,3 e se comportou como um eletrólito polivalente anfotérico, com ponto isoelétrico em pH 2,5 , determinado por eletroforese. A melanoidina purificada formou precipitados com os seguintes íons metálicos: Fe^{3+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} e Mn^{2+} . Foram determinadas as constantes de estabilidade dos complexos com o Fe^{3+} e o Cu^{2+} , cujos valores obtidos de seus logaritmos foram respectivamente 44,8 e 32,3. Foi estimado que cada molécula de melanoidina se ligava a 10 - íons Fe^{3+} e a 7 íons Cu^{2+} . Os autores (23) concluíram que a melanoidina é um quelante de certos metais, o que pode explicar sua atividade antioxidativa em relação a gorduras.

Jordan e cols. (26), em 1976 , estudaram a influência da massa molecular de ácidos húmicos na adsorção de íons Cu^{2+} , num meio de pH 2 , tamponado com KCl/HCl. As amostras de ácido húmico foram fracionadas por cromatografia em Sephadex. A adsorção dos íons cúpricos se deu na ordem inversa das massas moleculares, sendo este resultado interpretado como devido à maior acidez das frações de menor massa molecular, aliado à sugestão de que a adsorção se dava por troca iônica com formação de um quelato.

Ferreroni e cols. (22), 1976, estudaram as isotermas de adsorção de íons Cu^{2+} em ácido fúlvico, em meio metanólico, em valores de pH de 2,3 e 4. Os resultados mostraram boa con -

cordância com as isotermas de Freundlich e Langmuir. A isoterma de adsorção obtida em um sistema não tamponado, consistia em uma região ascendente, um máximo e uma descendente, sugerindo a existência de um mecanismo de troca iônica.

Meybeck (38) , em 1977 , preparou melanoidinas pelo aquecimento de quantidades equimolares de di-hidroxiacetona (DHA) e diversos aminoácidos, em 25 ml de água , sob refluxo a 100°C, por 4 horas. No caso de aminoácidos pouco solúveis , usou maior quantidade de água ou alcalinizou o meio. O produto foi purificado por diálise.

A melanoidina obtida a partir de DHA e glicina, forneceu as seguintes bandas no espectro IV (cm^{-1}) : 3400 , 1600, 1380 , 1120 , 920 e 600.

III. MATERIAIS

Banho de água com termostato, preciso até $0,5^{\circ}\text{C}$, da marca B. Braun.

Potenciômetro Metrohm E-512 , com eletrodo combinado.

Eletrodo de cobre, construído no laboratório, ligado a um potenciômetro Orion modelo 701.

Espectrofotômetro visível - ultravioleta Varian - 635-D.

Espectrofotômetro visível - ultravioleta com registrador , Unicam SP 8000.

Espectrofotômetro infravermelho Unicam SP 1000 .

Espectrofotômetro de absorção atômica Unicam SP-90A.

Ultracentrífuga Beckman modelo L5-75, com rotor SW 65 Ti.

Incubadora com banho de ar e agitação da New Brunswick Scientific Co.

Os reagentes usados foram produtos puros das marcas Merck , Carbo Erba , Riedel , Fisher e Sigma.

IV. MÉTODOS

A) Síntese das Melanoidinas.

As melanoidinas foram sintetizadas aquecendo soluções de D-glucose (1,25 e 2,50 M) com glicina (0,66 e 1,32 M) em tampão citrato 0,05M , pH 3,0 e 6,0 nas temperaturas de 70,0 , 80,0 e 90,0°C. Na Tabela abaixo estão identificadas as melanoidinas de acordo com as condições de síntese:

Tabela 1 - Condições de síntese das melanoidinas.

Sigla da melanoidina	Temperatura °C ($\pm$ 0,5)	pH	Concentração de glucose	Concentração de glicina
			M	M
70-1	70,0	6,0	1,25	0,66
70-2	70,0	3,0	1,25	0,66
70-3	70,0	6,0	2,50	1,32
70-4	70,0	3,0	2,50	1,32
80-1	80,0	6,0	1,25	0,66
80-2	80,0	3,0	1,25	0,66
80-3	80,0	6,0	2,50	1,32
80-4	80,0	3,0	2,50	1,32
90-1	90,0	6,0	1,25	0,66
90-2	90,0	3,0	1,25	0,66
90-3	90,0	6,0	2,50	1,32
90-4	90,0	3,0	2,50	1,32

Para cada uma das condições de síntese foi feita - uma experiência paralela, sem glicina. Uma vez por dia, no caso da experiência a $70,0^{\circ}\text{C}$, ou duas vezes por dia, nas outras temperaturas, era feita uma medida da absorbância e do pH , - sendo este corrigido com NaOH 5,0N quando necessário. Para cada temperatura , a experiência foi interrompida quando a absorbância da solução correspondente à melanoidina número 1 atingiu um valor próximo de 200.

As melanoidinas de número 4, por terem precipitado, foram separadas dos outros produtos de reação e reagentes remanescentes , por filtração à vácuo e lavagem com água. As outras foram dialisadas em celofane contra água durante dois dias e as soluções obtidas evaporadas em banho-maria (50°C) à vácuo , em evaporador rotatório. Todas as melanoidinas foram guardadas em dessecador com vácuo, sobre sílica-gel.

B) Dosagem da glucose residual.

1. Separação da glucose residual.

Foram feitas duas cromatografias em camada delgada de cada mistura de reação, em placas de celulose microcristalina de 20 x 20 cm e 0,5 mm de espessura. Os cromatogramas foram desenvolvidos com n-propanol , água e ácido fórmico 4,0: 1,0 : 0,5. O volume de cada amostra aplicado nas placas foi de 0,01 ml. O Rf da glucose neste sistema foi determinado mediante uma cromatografia prévia , revelada com p - anisidina / ácido ftálico / etanol.

Nas placas em que foram cromatografadas as misturas de reação , foi retirada uma faixa de aproximadamente 4cm

de largura, centrada no valor correspondente ao Rf da glucose. Cada amostra de celulose retirada foi colocada em um funil de Hirsch , sobre papel de filtro de malha fina e lavada com - água, filtrando sob vácuo para um balão volumétrico de 10,0 ml , elevando-se o volume no final.

Para cada mistura de reação foram cromatografadas duas amostras para a dosagem da glucose, a fim de ser verificada a precisão do método. A exatidão foi avaliada pela aplicação do método a uma amostra que consistia em uma das misturas de reação acrescida de 100,0mg de glucose por mililitro.

2. Dosagem da glucose (Segundo Hartel e cols.(24) .

A dosagem foi feita juntando-se 0,2ml das soluções obtidas do modo descrito em 1, com 5,0 ml do seguinte reagente:

a) glucose-oxidase	0,025 %
iodeto de potássio	24 mM
vanadato de sódio	1,2 mM
tampão fosfato pH 7,0	120 mM
b) o - dianisidina	25 mM

50,0 ml da solução (a) + 0,5 ml da solução (b)

A mistura foi deixada em repouso por 30 minutos , ao abrigo da luz, sendo em seguida lida a absorbância a 450nm. A curva padrão foi feita em condições análogas.

C) Análise Elementar.

1.Carbono e hidrogênio

As dosagens de C e H foram feitas no Alfred Ber -
nhardt Analytische Laboratorien, República Federal da Alema -
nha.

2. Nitrogênio

O N foi dosado pelo método de Kjeldahl modificado
por Koch e McMeekin (30).

A leitura da absorbância na reação de Nessler foi
feita a 480nm. As dosagens foram executadas em duplicata e os
valores aceitos tiveram um desvio máximo de 0,3% da massa de
melanoidina , segundo um critério semelhante ao citado por
Hendrickson e cols. (25) , em 1970.

D) Determinação dos pesos moleculares.

1. Filtração em gel de Sephadex.

Foi montada uma coluna de cromatografia contendo
4,5 g de Sephadex G-100 fino (40-120 μ m), de 32,0 cm de al -
tura e 1,5 cm de diâmetro. O Sephadex foi embebido em tampão
acetato 0,01 M pH 5,0 (contendo 0,02% de azida de sódio como
preservativo) e o mesmo tampão foi usado como eluente das me -
lanoidinas. Foram cromatografadas amostras de 1,5 mg de mela -
noidina, dissolvidas em 0,2 ml de tampão. Foram recolhidas
frações de 1,0 ml , numa velocidade de eluição de 0,16 ml/min
A saída da melanoidina da coluna foi acompanhada pela medida
da absorbância a 290 nm.

Como padrões foram usadas as seguintes proteínas:
mioglobina , α -guimotripsina , tripsina, pepsina e soroalbumi -
na. O eluente empregado foi tampão TRIS 0,1M pH 8,0 contendo

cloreto de sódio 1M , segundo recomendação de Villela e cols. (63), 1973, com exceção da α -quimotripsina e tripsina, casos em que foi usado o mesmo sistema das melanoidinas.

A absorbância dos eluatos foi medida a 280 nm.

O volume externo da coluna foi medido com azul de dextrana de peso molecular 2×10^6 ; foram usados 4,0 mg do produto dissolvidos em 0,5 ml de tampão acetato e sua eluição foi controlada pela absorbância a 280 nm.

2. Ultracentrifugação em gradiente de sacarose.

Duas amostras da melanoidina 90-1 foram centrifugadas em 5,0 ml de um gradiente de sacarose variando de 5,0 a 20,0%, na presença da enzima láctico - desidrogenase, usada como padrão. A aceleração empregada foi de 200.000 g no meio do tubo e o tempo de centrifugação foi de 15 horas.

A distribuição da melanoidina foi determinada pela absorbância a 450 nm e a da enzima por reação com ácido pirúvico e NADH e leitura da diminuição da absorbância a 340 nm devida ao consumo do NADH. O método foi baseado em Martin & Ames (37) e em Constantinides e cols. (14).

E) Espectros visível , ultravioleta e infravermelho das melanoidinas.

Foram usadas soluções aquosas da melanoidina 90-1 , nas concentrações de 17,0 mg/100 ml e 4,0 mg/100 ml para a obtenção dos espectros na região visível e ultravioleta, respectivamente.

Os espectros infravermelho das melanoidinas foram feitos em pastilhas de KBr , a 1,0%.

F) Testes qualitativos da solubilidade.

As melanoidinas 90-3 e 90-4 foram misturadas com cada um dos solventes e as misturas agitadas e deixadas em repouso por uma noite, após o que foi feita a avaliação visual da solubilidade, pela cor da solução e quantidade de resíduo. Os solventes empregados foram: água , n-hexano, cicloexano, benzeno, clorofórmio, tetracloreto de carbono, tricloroetileno , acetona, metanol, etanol, éter etílico, dioxano , tetraidrofurano, dimetilformamida, piridina , dimetilsulfóxido e ácido acético.

G) Reações químicas com as melanoidinas.

1. Ensaio prévios.

Soluções de melanoidinas 90-1 foram agitadas em tubos de ensaio com: solução de permanganato de potássio em meio alcalino; solução de boroidreto de sódio; hidrogênio nascente, produzido pela mistura de zinco em pó com ácido clorídrico; bromo em solução clorofórmica; bissulfito de sódio.

2. Oxidação com permanganato de potássio.

A 50 mg das melanoidinas 90-3 e 90-4 foi adicionada lentamente uma solução de permanganato de potássio a 1,0 %,

pH 8,2 , sob agitação constante, até que uma cor rósea persistisse na solução (duração da experiência: 20 horas); as misturas de reação foram filtradas à vácuo para separar o dióxido de manganês que se formou. O excesso de permanganato foi destruído pela adição de água oxigenada, sendo a solução filtrada novamente. O filtrado amarelo claro foi evaporado à vácuo em banho-maria , num evaporador rotatório. Os produtos sólidos, de cor castanha-escura, foram secados à vácuo, em um dessecador , sobre sílica-gel. Dos produtos , em parte cristalizados, foi medido o ponto de fusão e foram feitos os espectros IV.

3. Redução com hidrogênio nascente.

Foram pesados 20 mg da melanoidina 90-1, os quais foram dissolvidos em 100 ml de água destilada; à solução foram adicionados 2,0 g de zinco em pó fino e, sob agitação com agitador magnético, 6,0 ml de ácido clorídrico a 37%. A mistura foi deixada com agitação e aquecimento entre 50 e 60°C por 12 horas. Durante os primeiros 90 minutos foram colhidas amostras a fim de se acompanhar o descoramento.

A mistura de reação foi dialisada contra água corrente por dois dias e contra água destilada por mais 24 horas. A solução foi evaporada em evaporador rotatório e do produto marrom claro, secado em dessecador à vácuo sobre sílica-gel foi feito o espectro IV.

4. Redução com boroidreto de sódio.

A uma solução de 50 mg da melanoidina 90-1 em

água foram adicionados 3,0g de boroidreto de sódio. A solução foi deixada sob agitação à temperatura ambiente por 4 dias, após o que foi acidulada com ácido clorídrico e filtrada para separar o ácido bórico formado. A solução foi dialisada através de celofane contra água corrente durante 16 horas e contra água destilada por mais 24 horas, evaporada em evaporador rotatório e do produto marrom claro, secado em dessecador à vácuo sobre sílica-gel, foi obtido o espectro IV.

5. Acetilação.

Foi usado o método descrito por Shriner e Fuson (55), 1948. Uma parte da melanoidina acetilada foi submetida ao processo de acetilação por mais duas vezes. Foi obtido o espectro IV do produto e testada sua solubilidade nos seguintes solventes: água, n-hexano, etanol, metanol, clorofórmio, tetracloreto de carbono, benzeno, acetona e dimetilsulfóxido.

H) Titulação potenciométrica da melanoidina.

Foram titulados 20,0 ml de uma solução de melanoidina 90-1, contendo 2,00 g/l em água desionizada, com solução de hidróxido de sódio 0,10 N. O pH inicial da solução de melanoidina, originalmente de 5,6, foi levado a 1,0 pela adição de ácido clorídrico.

I) Dosagem de Na^+

Uma solução de melanoidina 90-1 contendo 0,0400mg

/ml. foi titulada com NaOH até pH 8,0. 0Na^+ nesta solução foi medido em um espectrofotômetro de absorção atômica, pelo método em que se mede a absorção da solução de concentração desconhecida e a absorção desta solução acrescida de quantidades do íon em questão

O espectrofotômetro foi operado nas seguintes condições:

Corrente na lâmpada de sódio	5,0 mA
Comprimento de onda da luz incidente	597 nm
Fluxo de acetileno	1,0 l/min
Fluxo de ar	5,0 l/min
abertura da fenda	0,08 mm

J) Reações com íons metálicos.

1. Precipitação com íons metálicos.

Foram preparadas soluções das melanoidinas 90-1 e 3 em água na concentração de 1,0 mg/ml. Alíquotas de 1,0 ml destas soluções foram misturadas com 3,0 ml de uma solução contendo o íon metálico na concentração expressa na Tabela 2. As misturas foram deixadas por 90 horas em repouso e ao abrigo / da luz, após o que o precipitado formado foi separado por centrifugação e a absorbância do sobrenadante lida a 450 nm, contra a solução do cátion usado.

Tabela 2 - Concentração dos sais usados na precipitação das melanoidinas 90-1 e 90-3.

SAL	CONCENTRAÇÃO (M)
AgNO_3	0,106
$\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,135
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,109
$\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,111
$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,111
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,114
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,118
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,111

2. Reação com Cu^{2+} .

a) Precipitação.

Uma solução de melanoidina 90-1 contendo 50,0 mg/100 ml de água, foi tratada com igual volume de uma solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,200 M. A mistura foi deixada em repouso por uma noite, centrifugada a 2500 rpm por 15 minutos, sendo medida a absorbância do sobrenadante a 450 nm.

Foram feitos os espectros visível e U.V. do sobrenadante.

b) Determinação da constante de estabilidade do complexo melanoidina - Cu^{2+}

Foram misturados volumes diversos de uma solução de $\text{Cu}^{2+} 10^{-3} \text{ M}$ com uma solução de melanoidina 90-1 a 0,2%, sendo medida a concentração do Cu^{2+} antes e depois da mistura. A constante de estabilidade foi calculada conforme está mostrado no apêndice.

3. Determinação da constante de estabilidade do complexo melanoidina- Fe^{3+} .

Uma solução de sulfato de ferro e amônio $1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ foi misturada a uma solução de melanoidina 90-1, em diversas proporções, sendo a solução elevada a 10,0 ml em balão volumétrico com água desionizada. Estas misturas foram colocadas em sacos de celofane para diálise contra água desionizada durante dois dias. Em seguida foi medida a concentração de Fe^{3+} na água do meio externo ao saco de diálise, por meio de reação com 8-hidroxiquinoleína (1,0 ml da solução do reagente a 1% + 10,0 ml da solução de Fe^{3+}) e leitura da absorbância a 410 nm. A constante de estabilidade foi calculada de maneira análoga à do complexo com Cu^{2+} .

L) Influência da melanoidina no crescimento do *Staphylococcus aureus* S6 .

O meio de cultura empregado para o crescimento do microorganismo tinha a seguinte composição, segundo Reiser e Weiss (45) , 1969:

NAK	40,0 g
niacina	10,0 mg
tiamina	0,5 mg

água desionizada qsp 1,00 l

pH acertado em 7,0 com NaOH

O inóculo foi preparado da seguinte maneira: 5,0 ml de meio de cultura foram semeados com microorganismos provenientes de uma cultura estoque guardada em geladeira. Após incubação a 35°C , sem agitação, por uma noite, esta cultura foi transferida para um erlenmeyer contendo 50 ml de meio, que foi incubado a 37,0°C com agitação, até atingir uma absorção bância de 0,3 a 800 nm. A cultura nesta etapa foi usada como inóculo, sendo semeados 0,1 ml em cada tubo de teste, que continha 5,0 ml de meio. Foram ensaiadas diversas concentrações de melanoidina 90-1. Os tubos foram incubados a 37,0°C, com agitação de 200 rpm , sendo lidas as absorbâncias a 900 nm , a intervalos de tempo.

Uma solução de melanoidina 90-1 a 3,0% no meio - de cultura, foi colocada em um saco de diálise de celofane e este foi mergulhado em igual volume do mesmo meio sem melanoidina. Todo o conjunto foi esterilizado e deixado com agitação no meio externo por cerca de 100 horas. Após este tratamento, o meio externo foi usado em experiência de crescimento, de modo análogo ao descrito anteriormente.

V. RESULTADOS

A) Síntese das melanoidinas.

Tabela 3 - Absorbância a 450 nm das misturas de reação no decorrer da síntese das melanoidinas.

Tempo (h)	A b s o r b â n c i a a 450 nm											
	70-1	80-1	90-1	70-2	80-2	90-2	70-3	80-3	90-3	70-4	80-4	90-4
0	0,015	0,022	0,016	0,010	0,008	0,015	0,024	0,022	0,032	0,022	0,008	0,031
16	5,42	27,3	80,2	0,075	0,760	P	45,7	135	391	2,99	50,2	P
22	-	34,6	115	-	1,98	-	-	195	479	-	97,2	-
37	25,1	63,1	209	0,791	2,48	-	148	251	763	35,4	P	-
42	-	79,6	-	-	4,81	-	-	305	-	-	-	-
56	-	132	-	-	P	-	-	431	-	-	-	-
61	55,1	148	-	3,40	-	-	335	444	-	79,0	-	-
65	-	162	-	-	-	-	-	464	-	P	-	-
81	84,0	214	-	5,14	-	-	359	538	-	-	-	-
101	109	-	-	8,41	-	-	433	-	-	-	-	-
123	136	-	-	P*	-	-	472	-	-	-	-	-
146	174	-	-	-	-	-	537	-	-	-	-	-
170	196	-	-	-	-	-	604	-	-	-	-	-

* P: Observada a formação de precipitado.

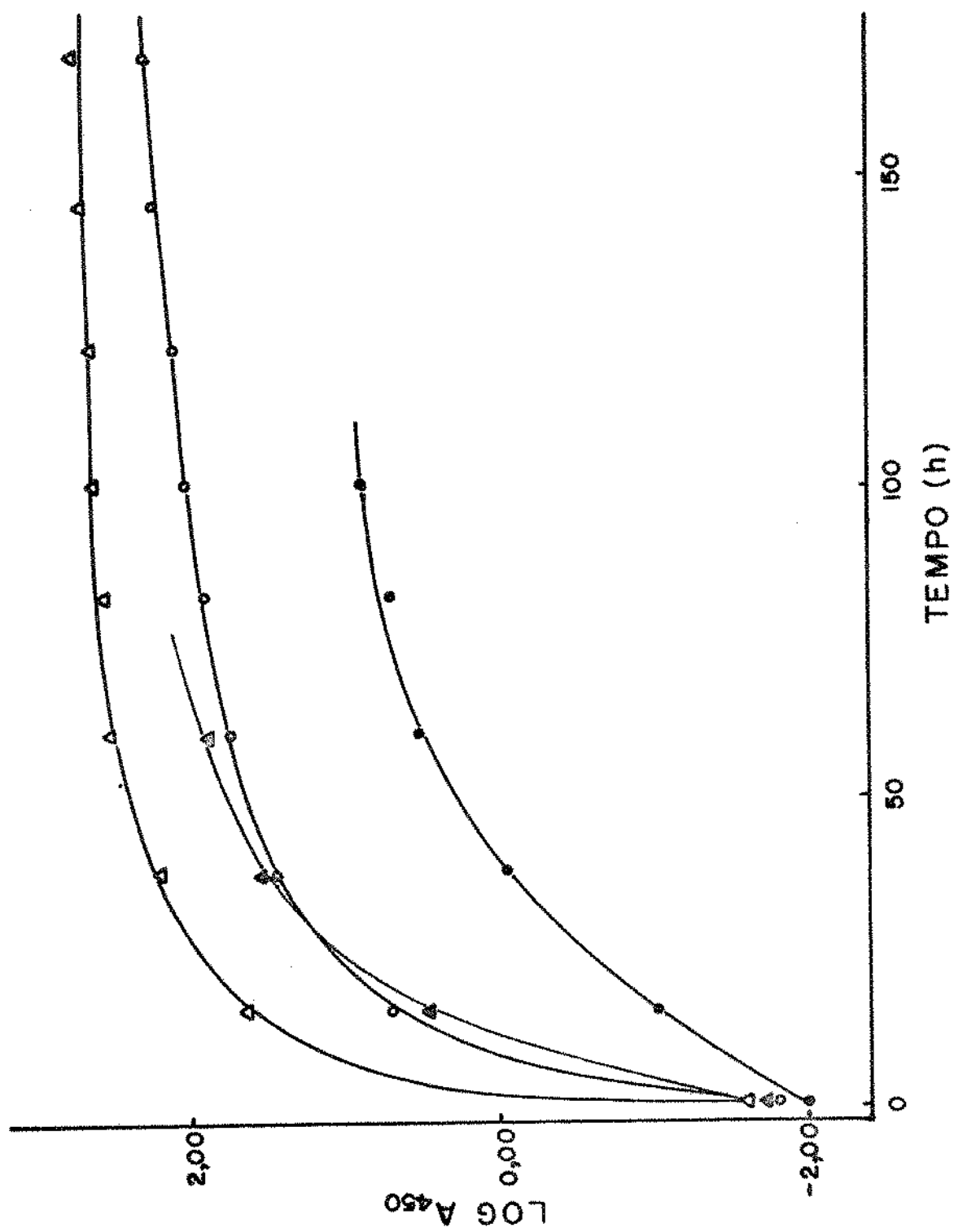


Figura 1 - Síntese das melanoidinas. Logaritmo das absorvâncias das misturas de reação em função do tempo. o 70-1 • 70-2 Δ 70-3 ▲ 70-4.

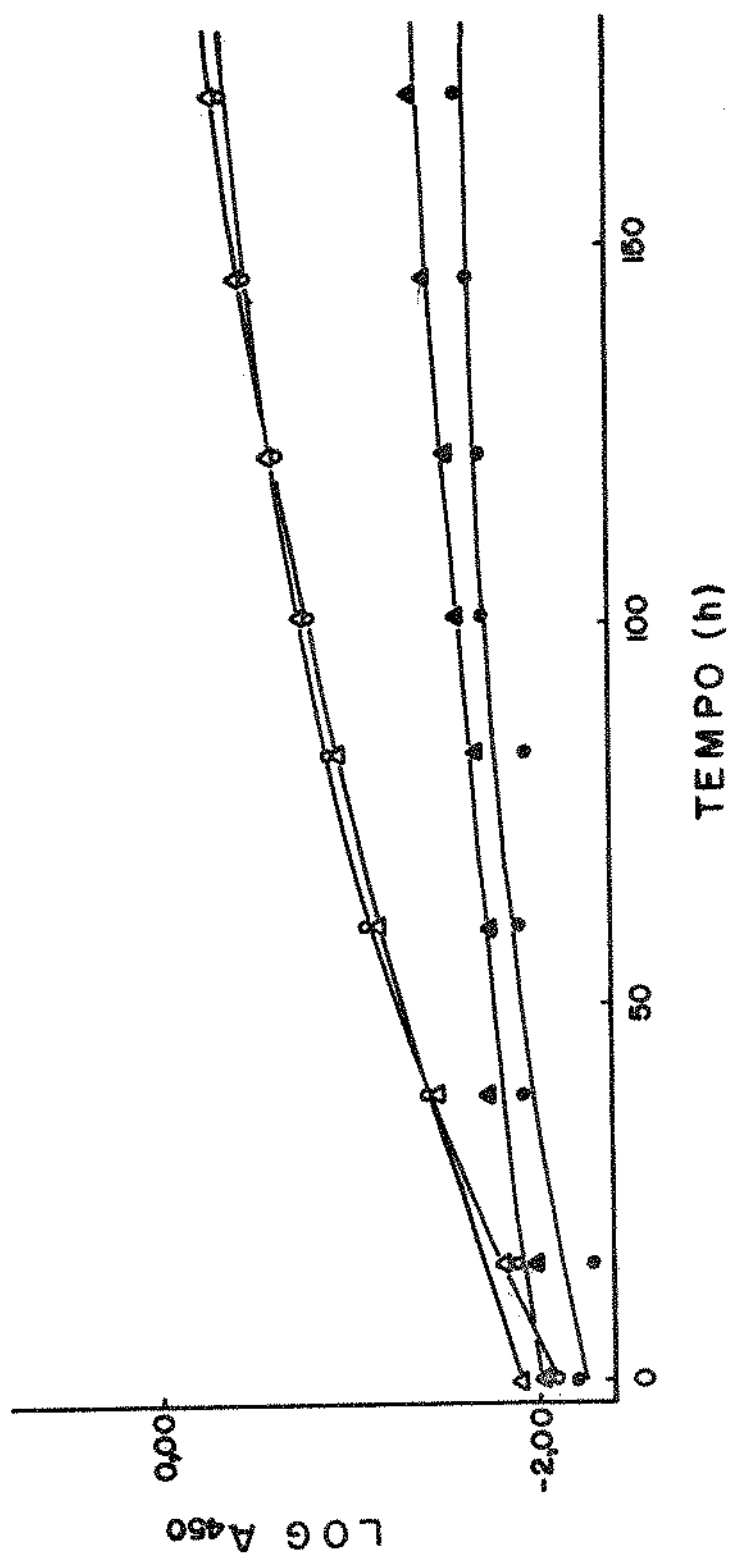


Figura 2 - Controles. Logaritmo das absorvâncias de soluções de glicose
(sem glicina) em função do tempo, • 70-1 • 70-2 ▲ 70-3 ▼ 70-4

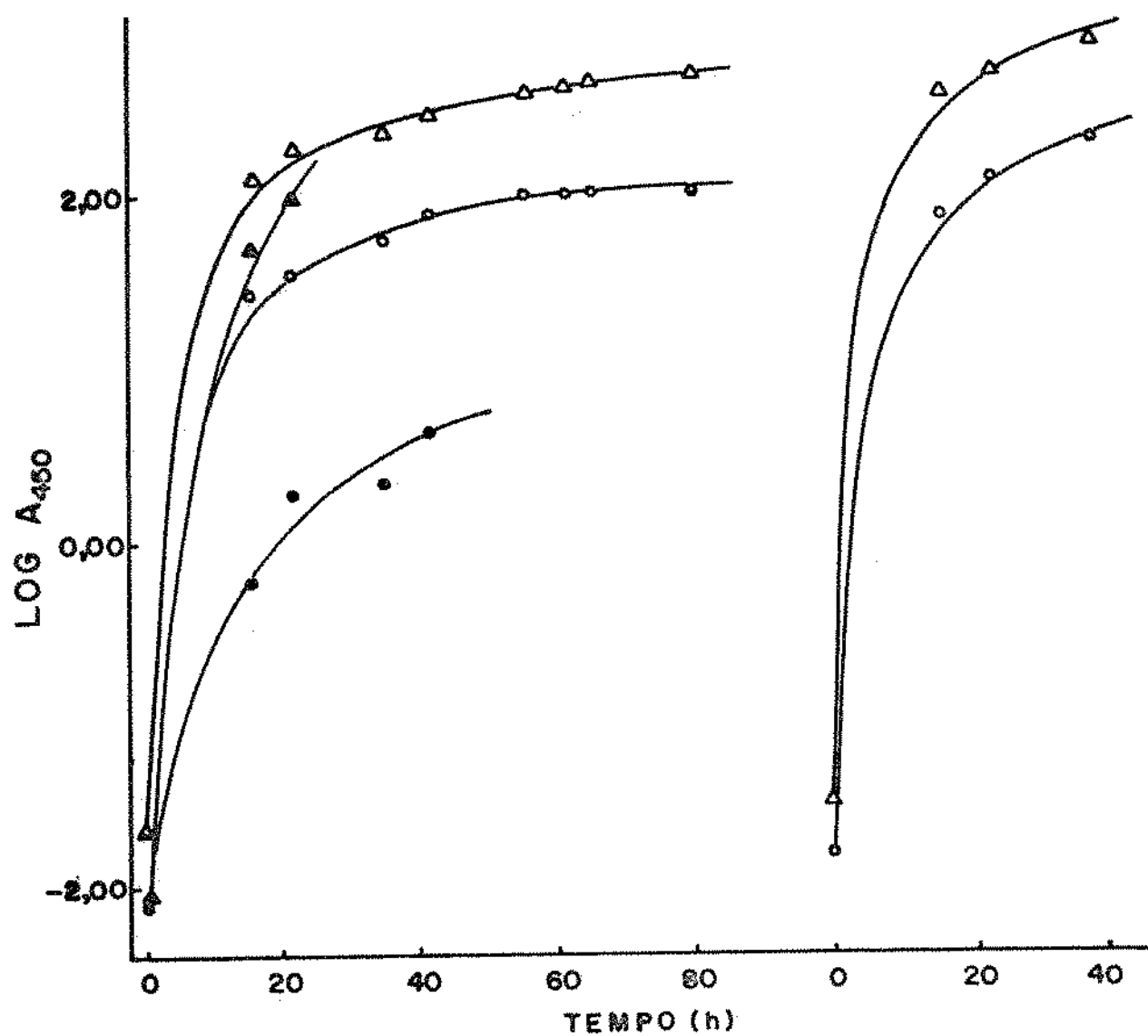


Figura 3 - Síntese das melanoidinas. Logaritmo das absorbâncias das misturas de reação em função do tempo.

À esquerda : • 80-1 • 80-2 △ 80-3 ▲ 80-4

À direita : • 90-1 △ 90-3

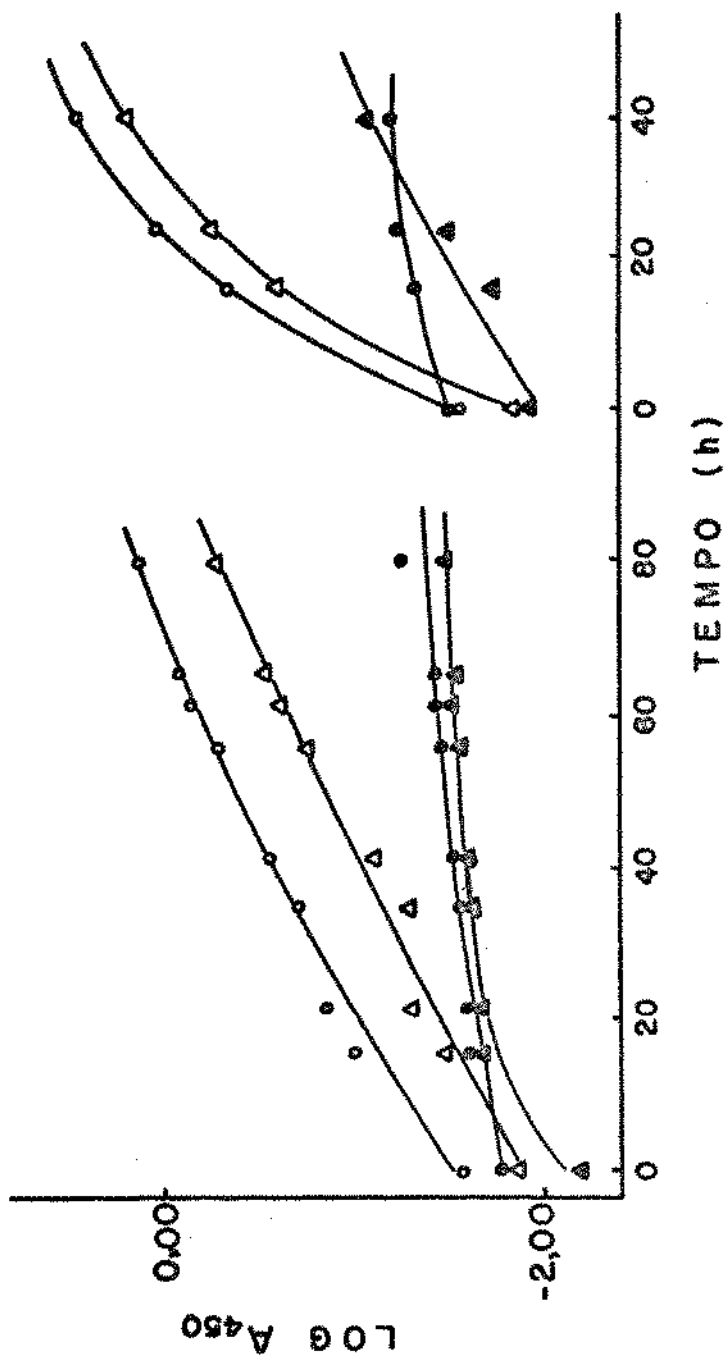


Figura 4 - Controles. Logaritmo das absorvâncias de soluções de glucose (sem glicina) em função do tempo.

À esquerda : Δ 80-1 ▲ 80-2 ○ 80-3 ● 80-4
 À direita : Δ 90-1 ▲ 90-2 ○ 90-3 ● 90-4

B) Dosagem da glucose residual.

Tabela 4 - Dosagem da glucose residual nas misturas de reação.*

Amostra	Glucose consumida
	na reação %
70-1	51
80-1	46
90-1	47
70-2	23
80-2	28
90-2	23
70-3	73
80-3	72
90-3	72
70-4	54
80-4	55
90-4	61

* Desvio encontrado para o método : 9%.

C) Análise elementar.

Tabela 5 - Análise elementar. Valores em porcentagem.

MELANOIDINA	C	H	N	O
70-1	51,3	5,1	5,4	38,2
80-1	47,8	5,1	5,4	41,7
90-1	52,0	5,3	5,1	37,6
70-2	54,5	4,6	5,4	35,5
80-2	54,0	5,3	5,1	35,6
90-2	55,2	4,9	5,2	34,7
70-3	51,4	5,0	5,1	38,5
80-3	53,7	5,7	5,3	35,3
90-3	53,0	5,3	5,1	36,6
70-4	57,0	4,5	5,0	33,5
80-4	57,0	5,1	5,2	32,7
90-4	57,8	4,6	5,2	32,4

D) Determinação dos pesos moleculares.

1. Filtração em gel de Sephadex.

Tabela 6 - Filtração em gel de Sephadex G-100. Padrões.

Padrão	pH	Peso Molecular (PM)	log PM	Volume de eluição (V) ml ($\pm 0,5$)	V/V ₀
mioglobina	5,0	16890 ⁽⁶⁰⁾	4,23	53,8	2,30 $\pm$ 0,07
mioglobina	8,0	16890	4,23	54,4	2,32 -
α -quimotripsina	5,0	21500 ⁽⁵¹⁾	4,33	50,0	2,14 -
tripsina	5,0	24000 ⁽¹⁵⁾	4,38	50,4	2,15 -
pepsina	8,0	32700 ⁽⁶⁷⁾	4,51	43,0	1,84 $\pm$ 0,06
pepsina	5,0	32700	4,51	43,0	1,84 -
albumina	8,0	67000 ⁽³¹⁾	4,83	37,0	1,58 -

Volume externo V₀ = 23,4 $\pm$ 0,5 ml.

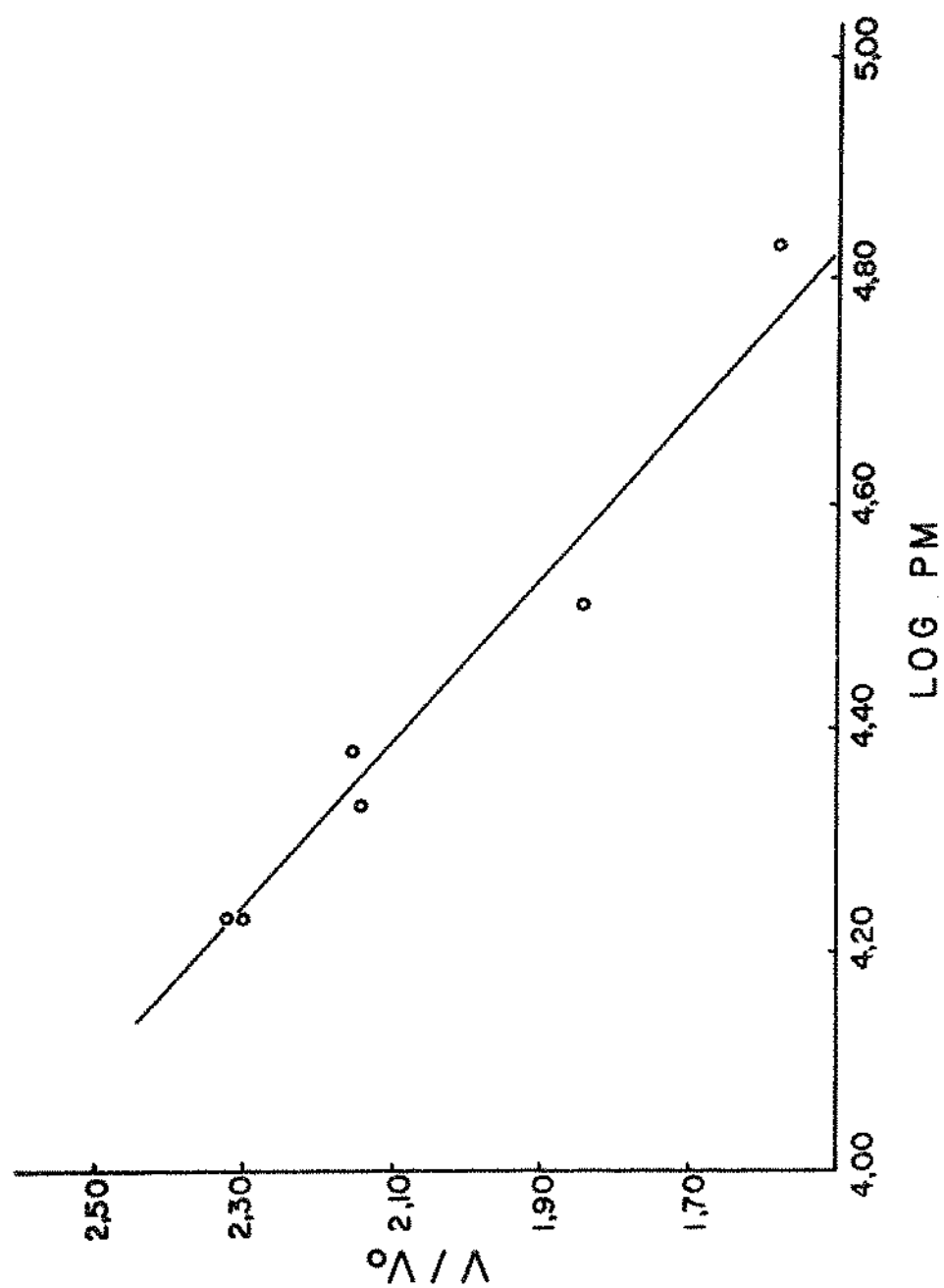


Figura 5 - Calibração da coluna de Sephadex G-100. Razão entre o volume de eluição dos padrões e o volume externo em função do logaritmo do peso molecular, (Segundo WHITAKER (66)).

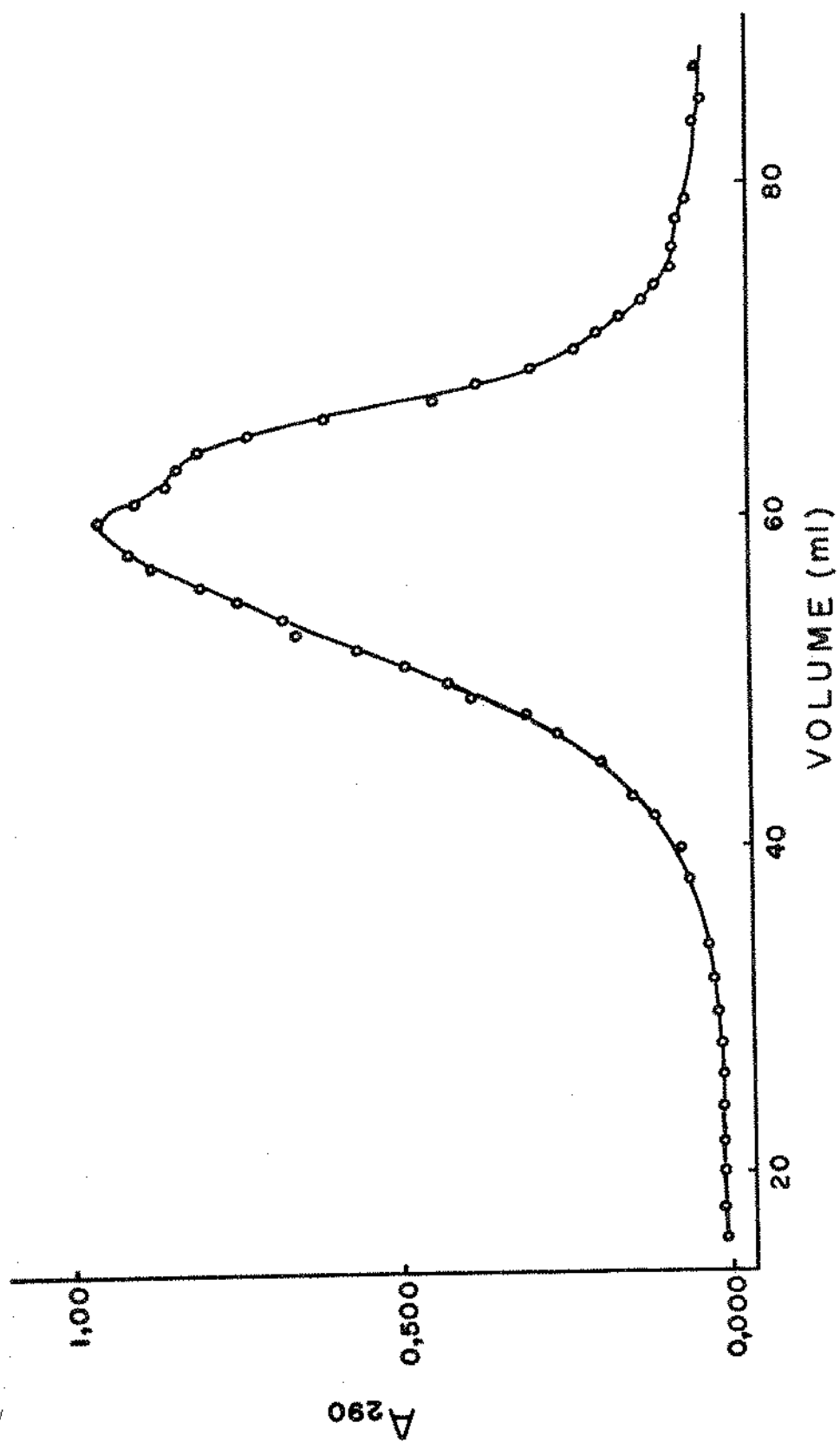


Figura 6 - Filtração em gel de Sephadex G-100.
Curva de eluição da melanoidina 70-1.

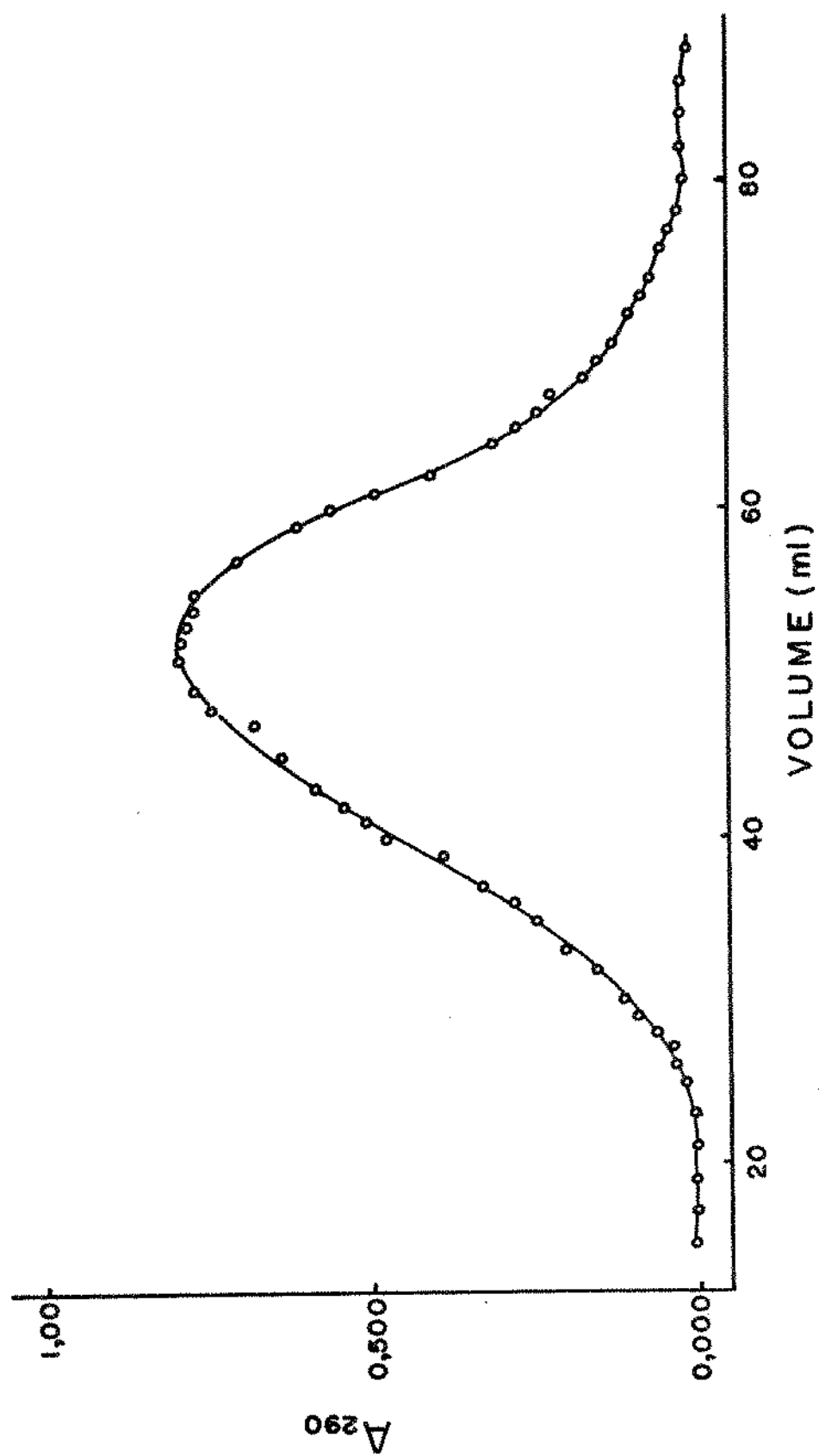


Figura 7 - Filtração em gel de Sephadex G-100.
Curva de eluição da melanoidina 70-3.

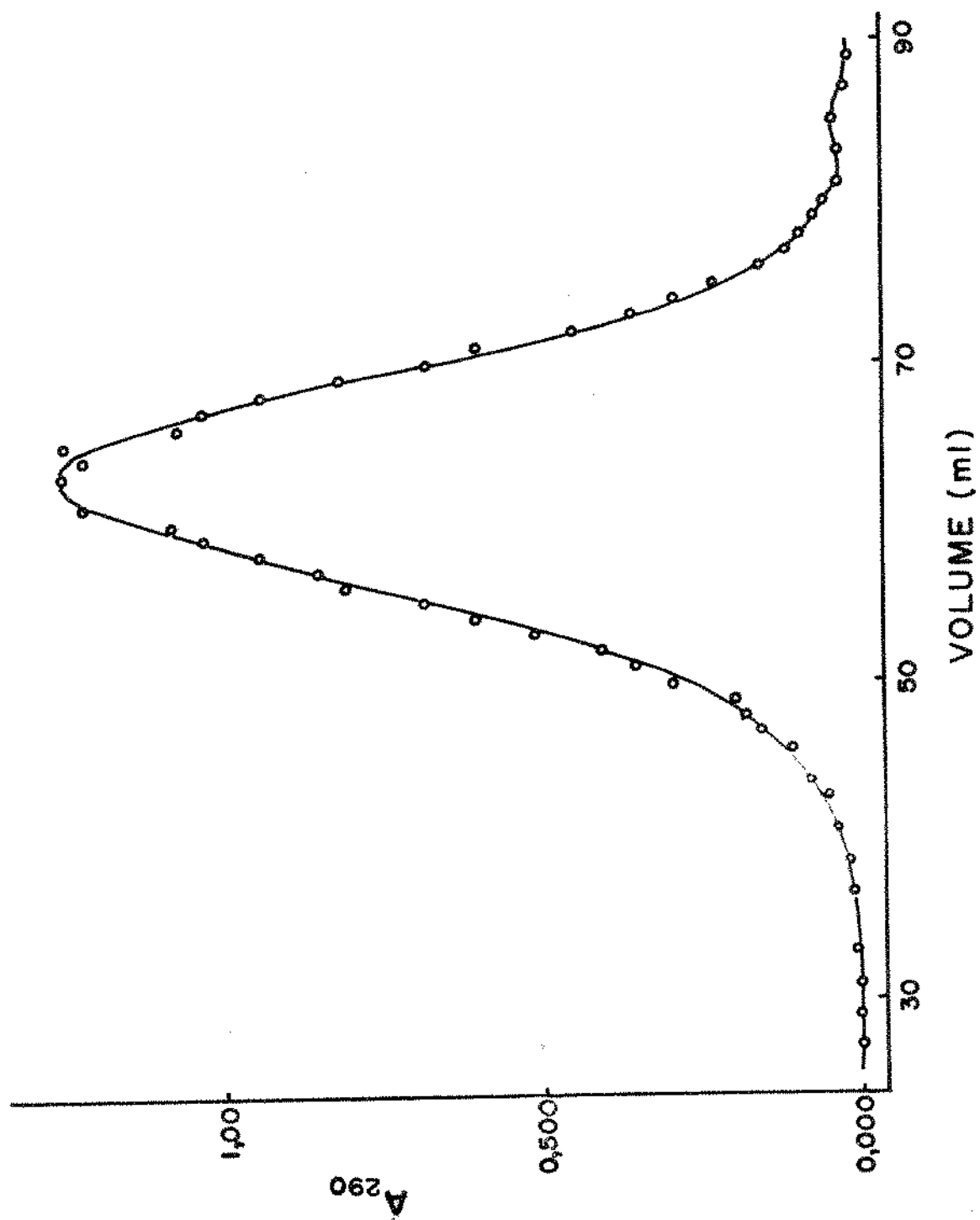


Figura 8 - Filtração em gel de Sephadex G-100.
Curva de eluição da melanoidina 80-1.

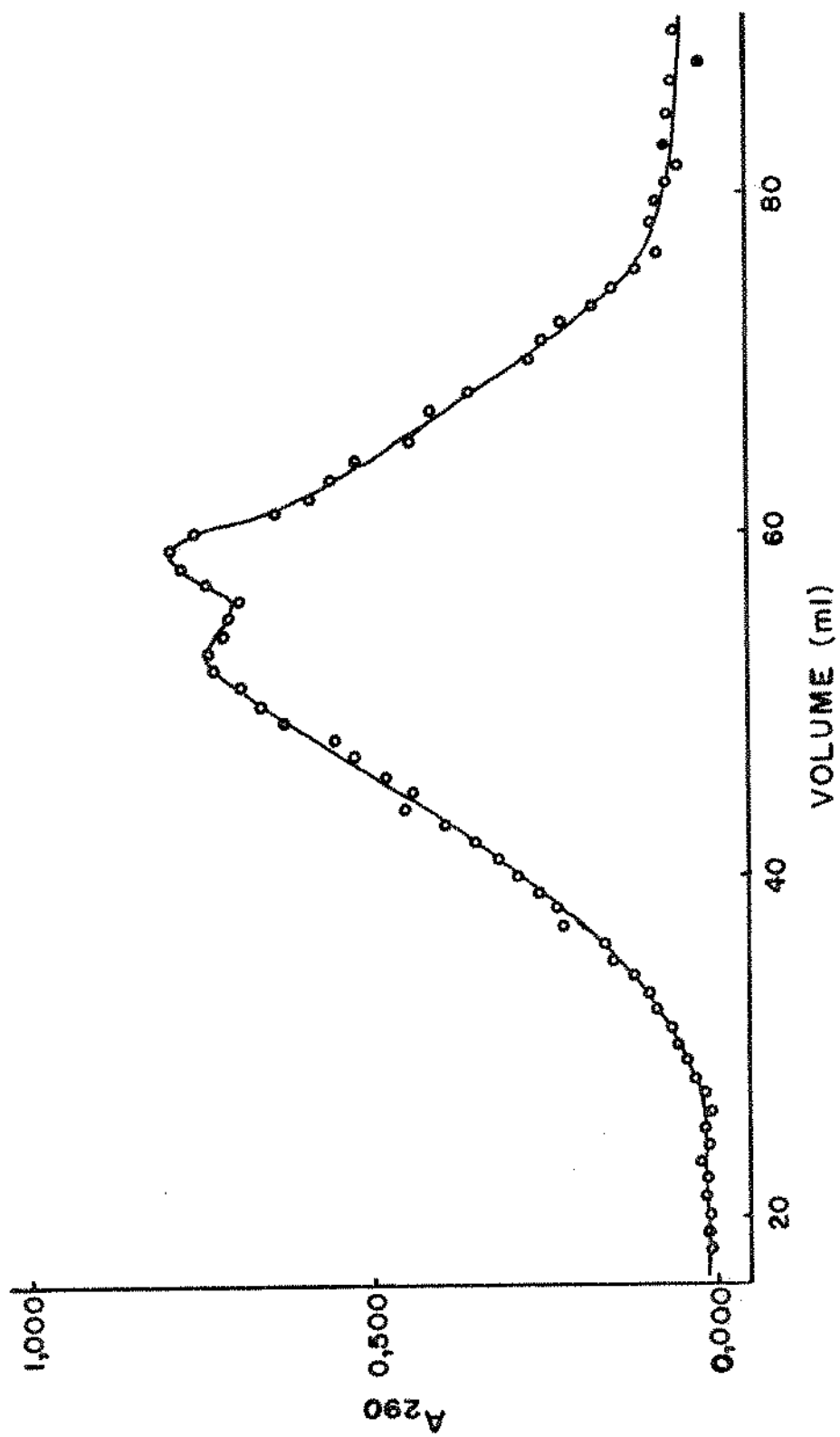


Figura 9 - Filtração em gel de Sephadex G-100.
Curva de eluição da melancoidina 80-3.

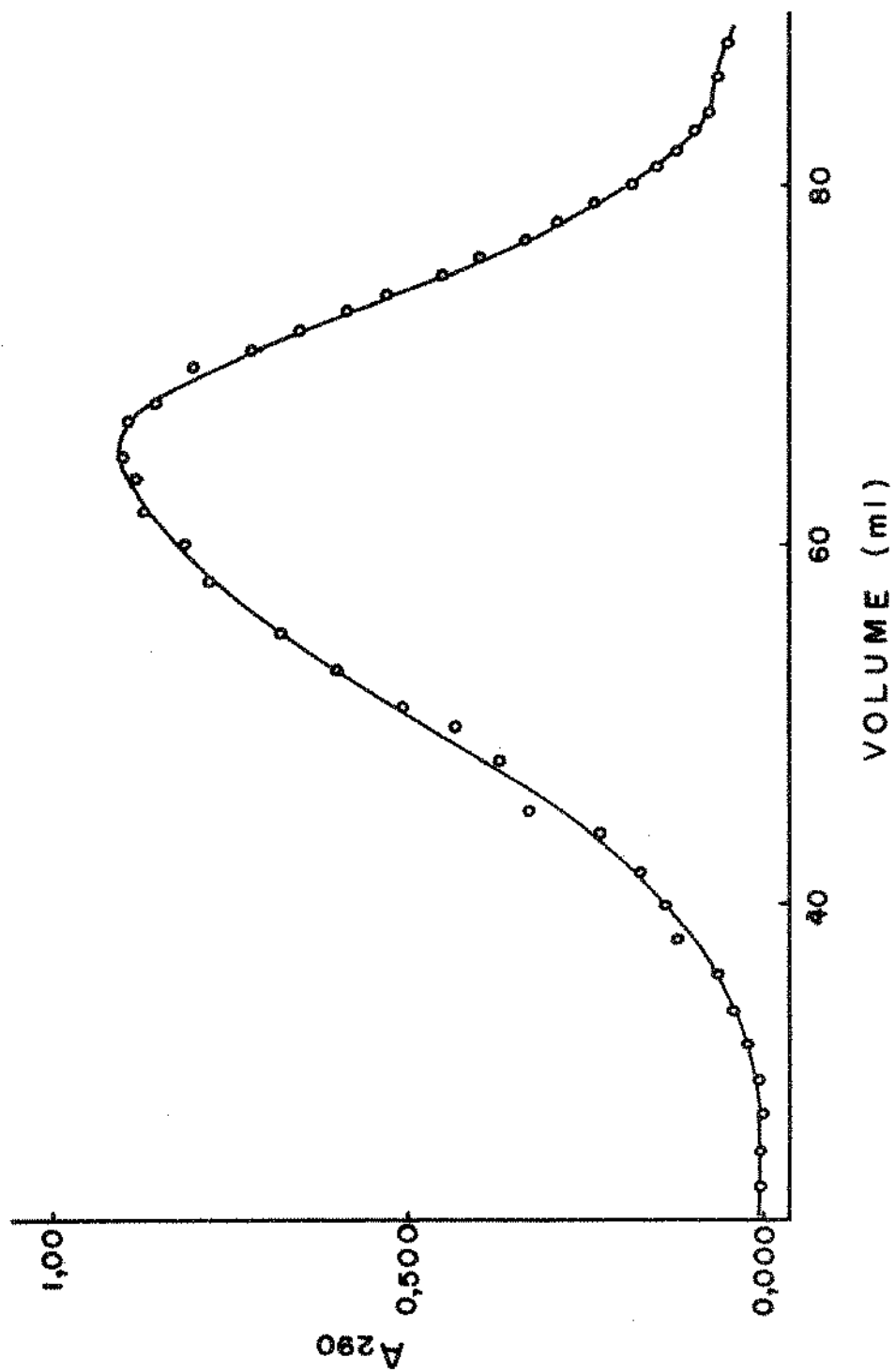


Figura 10 - Filtração em gel de Sephadex G-100.
Curva de eluição da melanoidina 90-1.

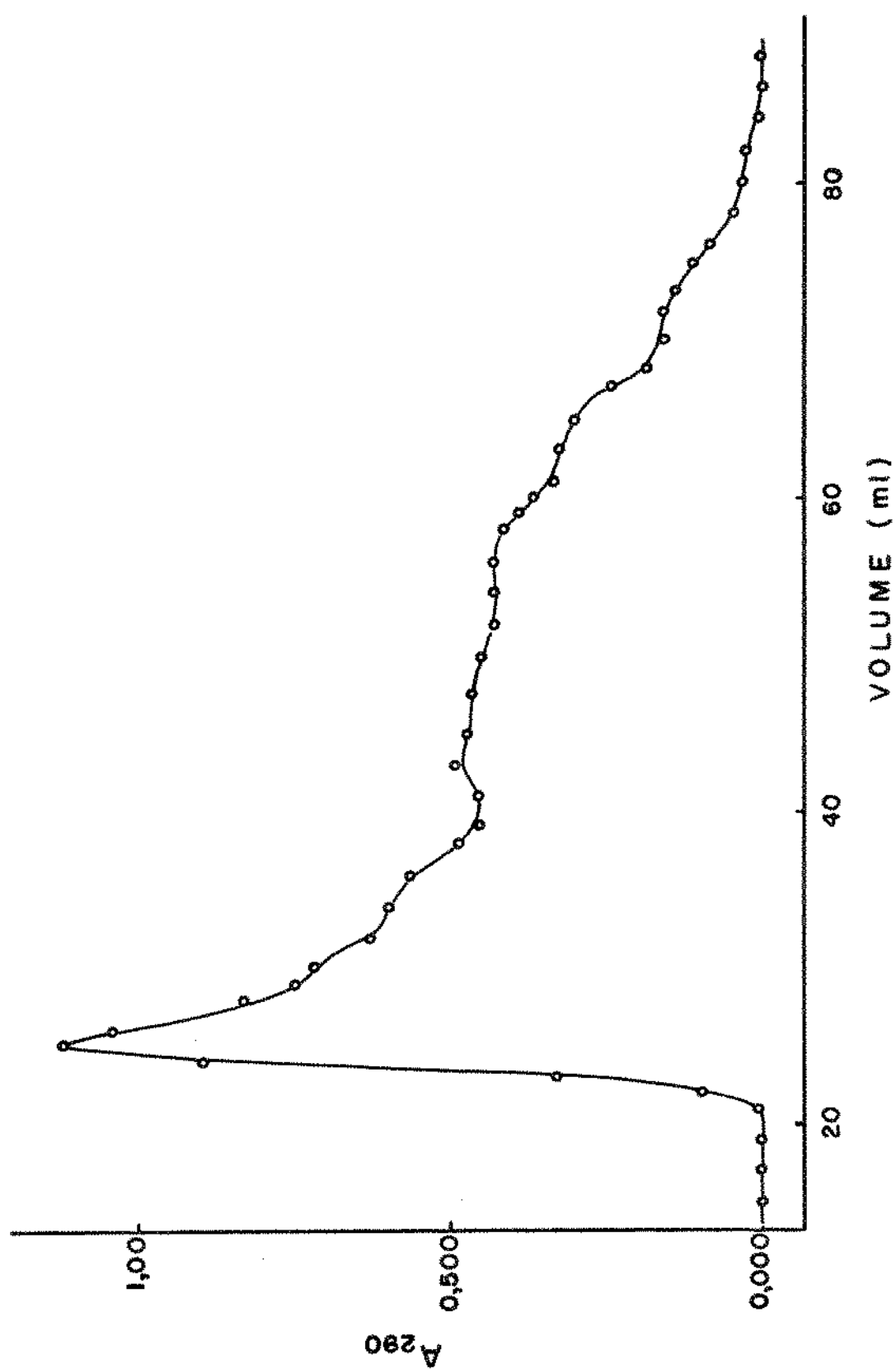


Figura 11 - Filtração em gel de Sephadex G-100.
Curva de eluição da melanoidina 90-3.

Tabela 7 - Filtração em gel de Sephadex G-100. Melanoidinas.

Melanoidina	Volume de eluição médio (V) ml ($\pm 0,5$)	V/V_0	log PM	Peso molecular médio $\times 10^{-4}$
70-1	59,6	2,55	4,05	1,1
80-1	63,0	2,69	3,95	0,89
90-1	64,0	2,74	3,92	0,83
70-3	51,6	2,21	4,30	2,0
80-3	56,0	2,39	4,17	1,5
90-3	-	-	-	-

Volume externo $V_0 = 23,4 \pm 0,5$ ml.

2. Ultracentrifugação em gradiente de sacarose.

Tabela 8 - Determinação do peso molecular da melanoidina - 90-1 por ultracentrifugação em gradiente de sacarose.

TUBO	S melanoidina	S LAD	PM LAD	PM melanoidina
1	1,20	7,40	135000 ⁽¹⁷⁾	8800
2	1,14	7,40	135000	8200
média	-	-	-	8500 ± 500*

S: Coeficiente de sedimentação.

PM: peso molecular

LAD: láctico - desidrogenase.

* Desvio segundo Constantinides e cols. (14).

E) Espectros infravermelho, visível e ultravioleta das/melanoidinas.

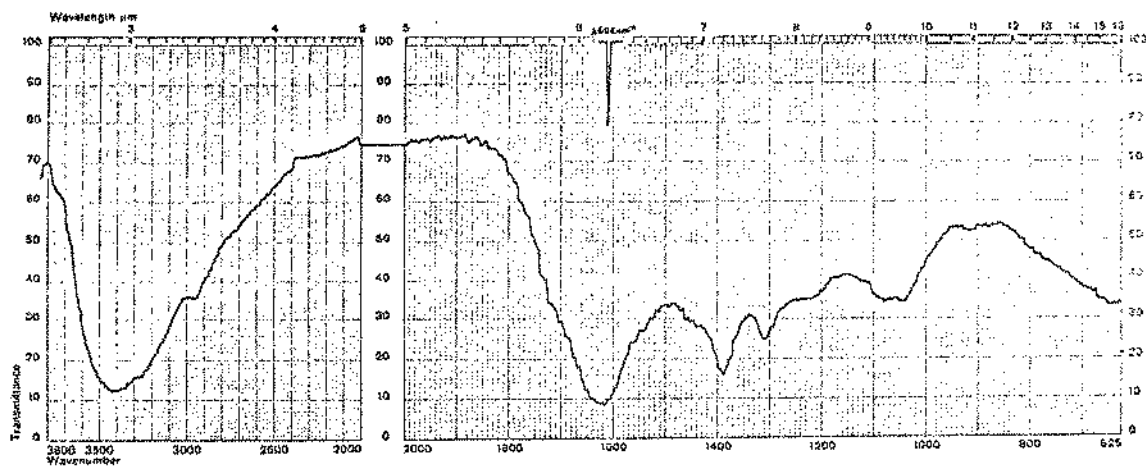


Figura 12 - Espectro infravermelho da melanoidina 70-1.

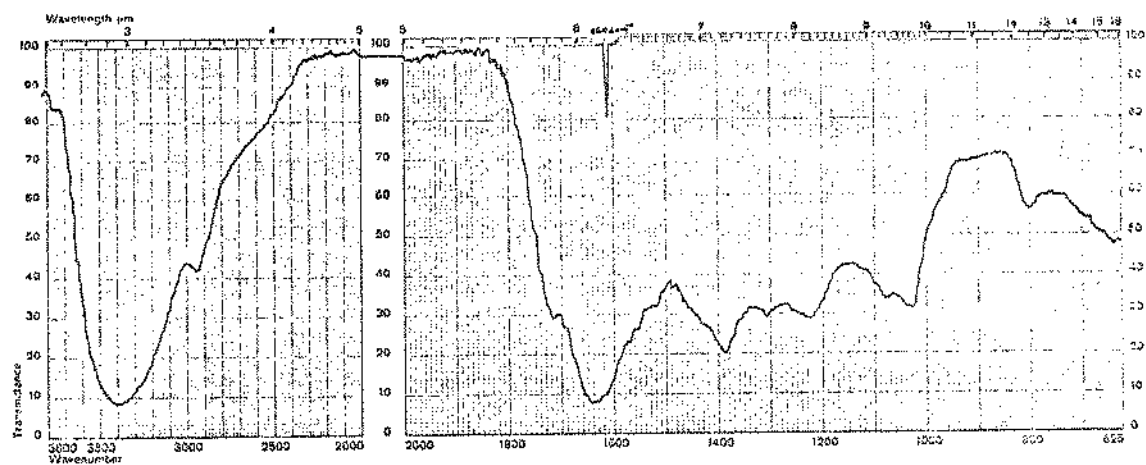


Figura 13 - Espectro infravermelho da melanoidina 70-2.

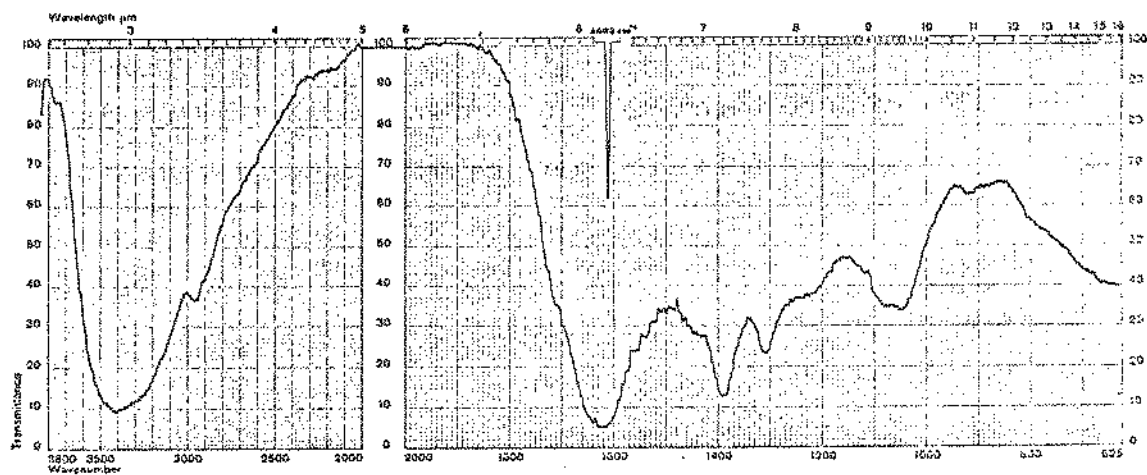


Figura 14 - Espectro infravermelho da melanoidina 70-3.

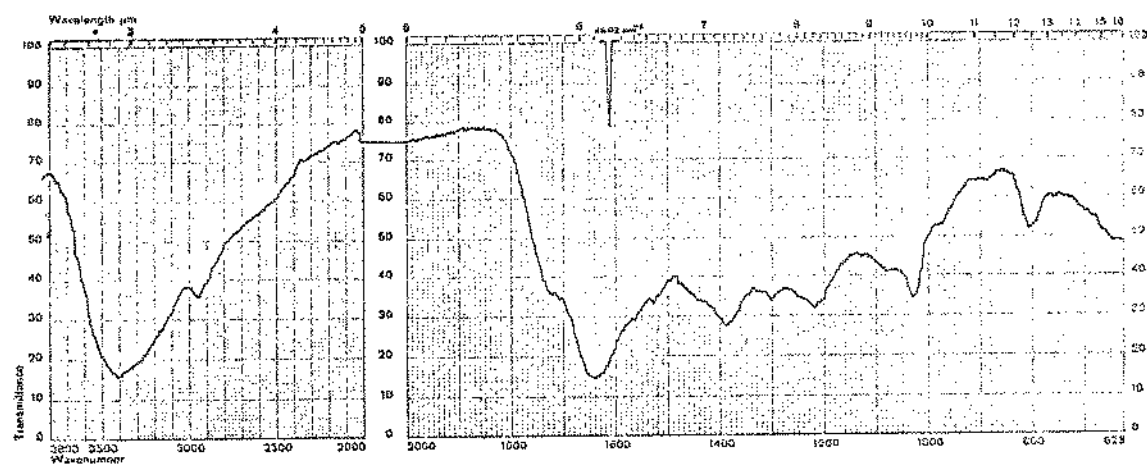


Figura 15 - Espectro infravermelho da melanoidina 70-4.

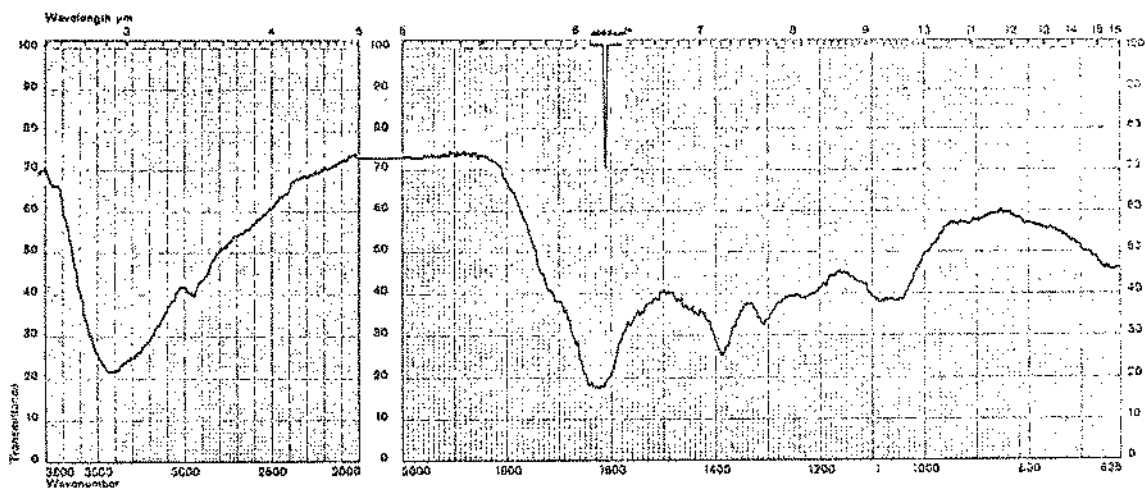


Figura 16 - Espectro infravermelho da melanoidina 80-1.

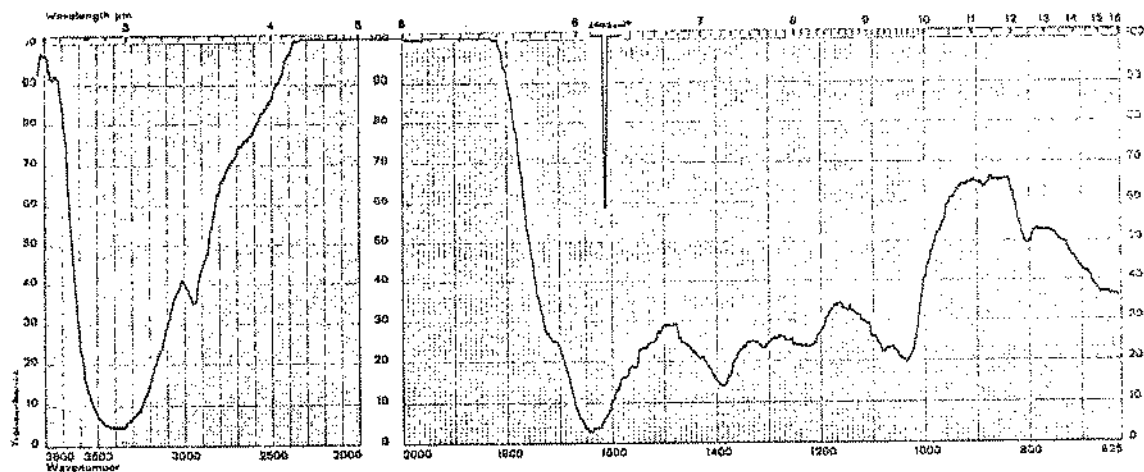


Figura 17 - Espectro infravermelho da melanoidina 80-2.

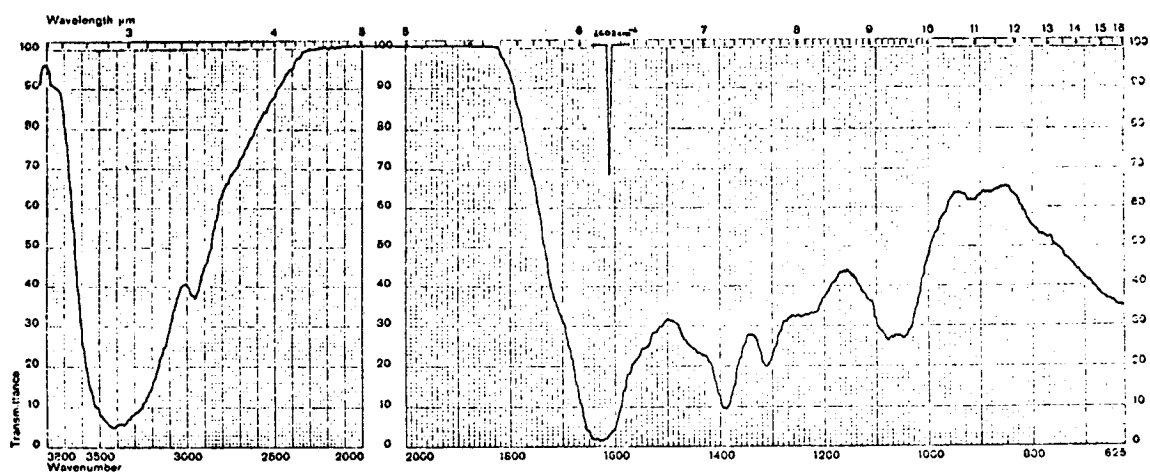


Figura 18 - Espectro infravermelho da melanoidina 80-3.

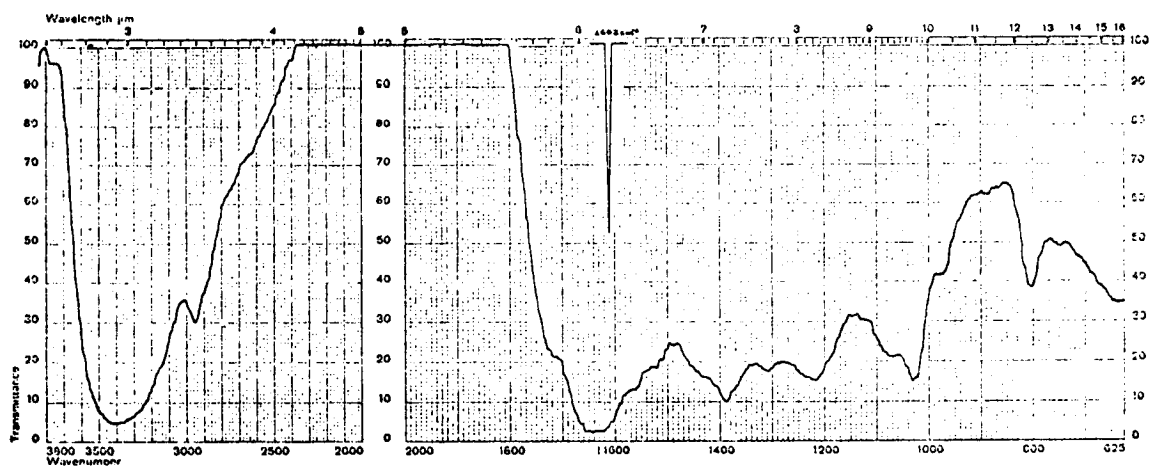


Figura 19 - Espectro infravermelho da melanoidina 80-4.

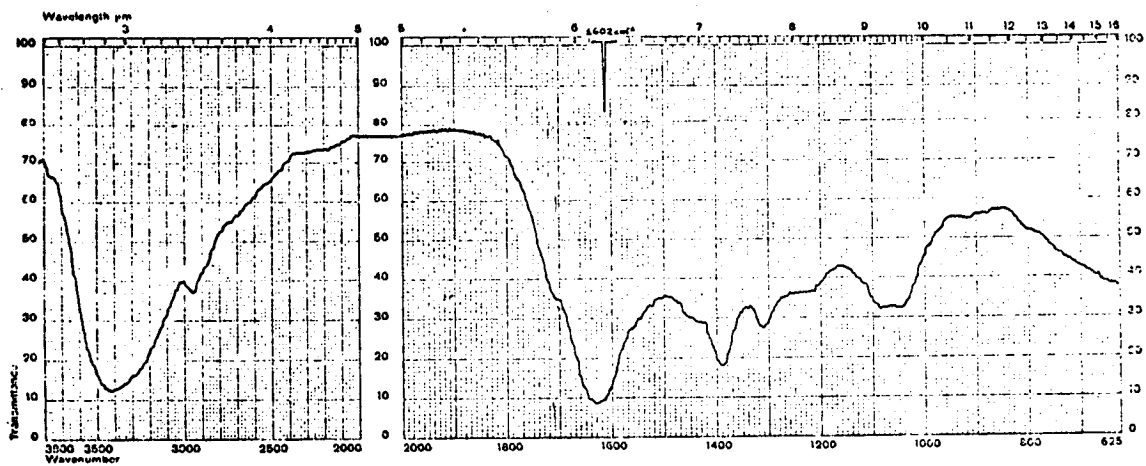


Figura 20 - Espectro infravermelho da melanoidina 90-1.

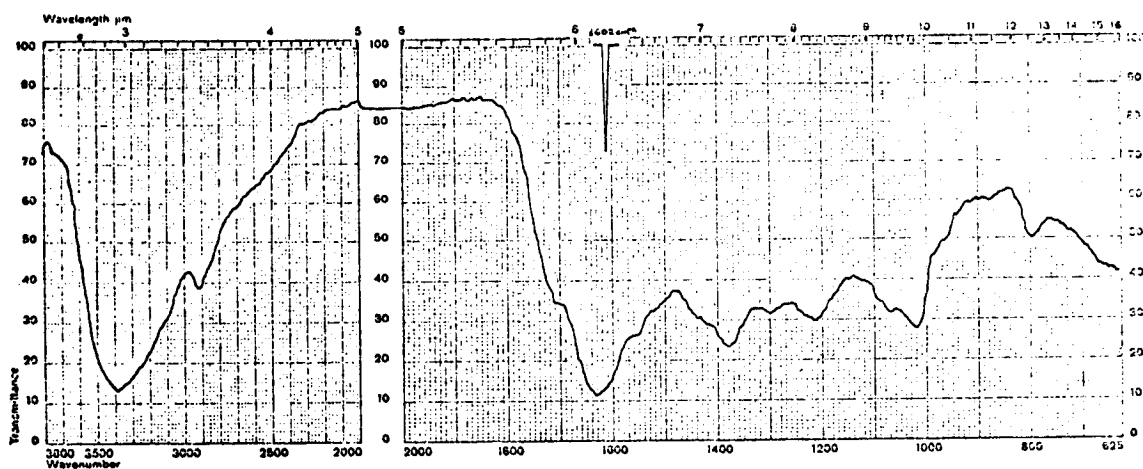


Figura 21 - Espectro infravermelho da melanoidina 90-2.

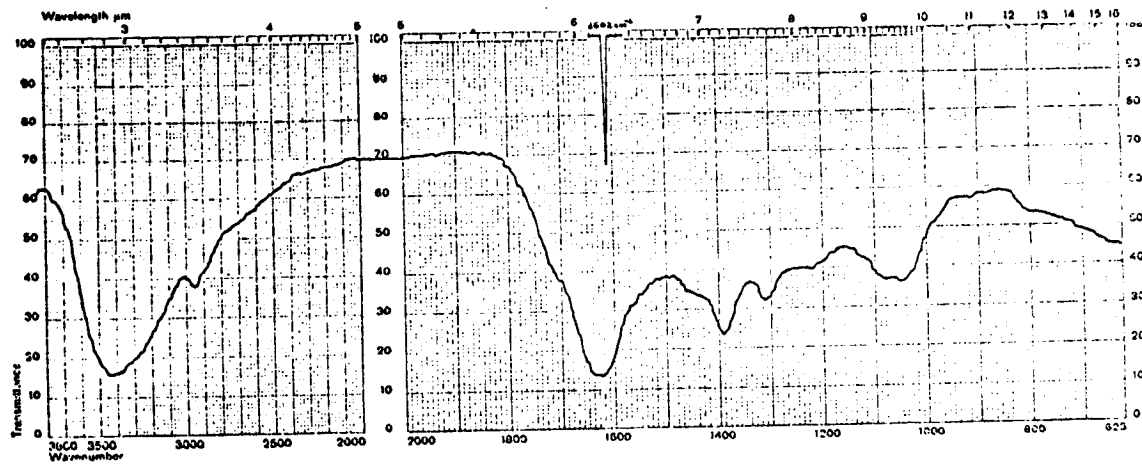


Figura 22 - Espectro infravermelho da melanoidina 90-3.

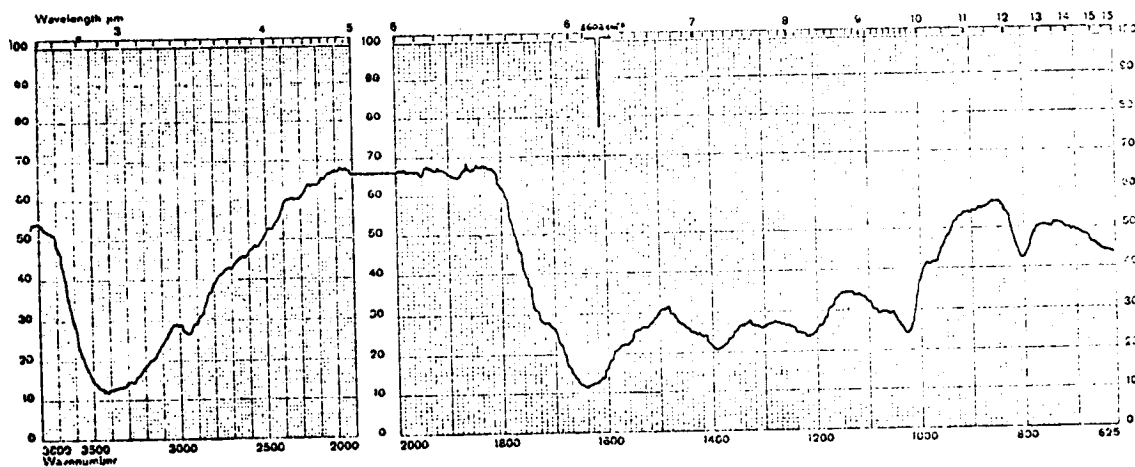


Figura 23 - Espectro infravermelho da melanoidina 90-4.

Tabela 9 - Espectros infravermelho das melanoidinas.

B A N D A S (cm^{-1})											
70-1	70-2	70-3	70-4	80-1	80-2	80-3	80-4	90-1	90-2	90-3	90-4
	800		795		795		795		790		795
1035	1025	1035	1020	1040	1025	1035	1020	1040	1010	1040	1015
1070	1070	1065	1065	1075	1070	1070	1065	1075	1065	1070	1070
1220	1225	1220	1210	1230	1225	1230	1210	1220	1210	1220	1210
1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1290	1300	1300
1380	1380	1380	1380	1375	1380	1380	1375	1380	1370	1380	1380
1615	1630	1615	1630	1615	1630	1620	1630	1620	1620	1620	1630
2940	2930	2930	2930	2930	2930	2930	2930	2940	2920	2930	2940
3410	3400	3400	3400	3410	3400	3400	3400	3420	3400	3420	3420

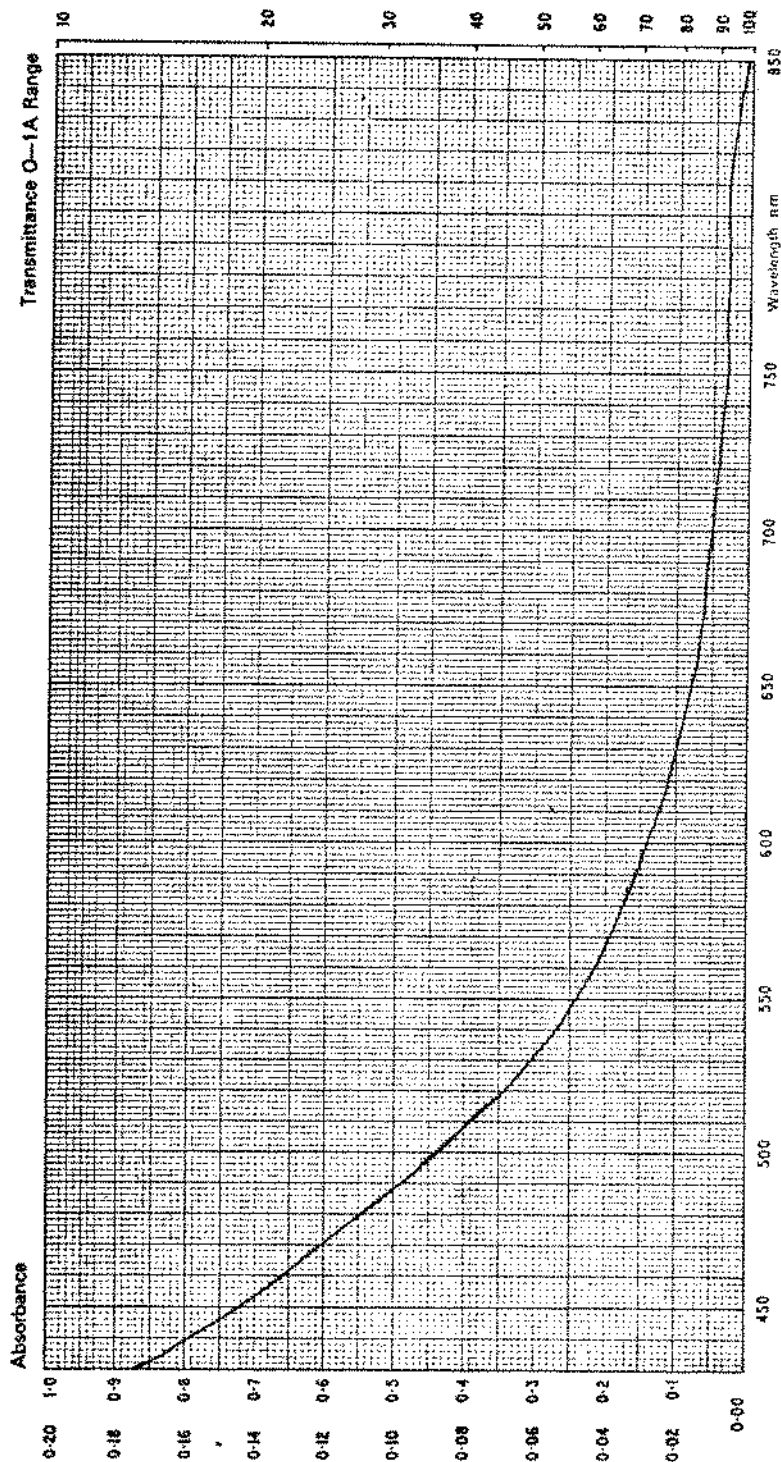


Figura 24 - Espectro visível da melanoidina 90-1.

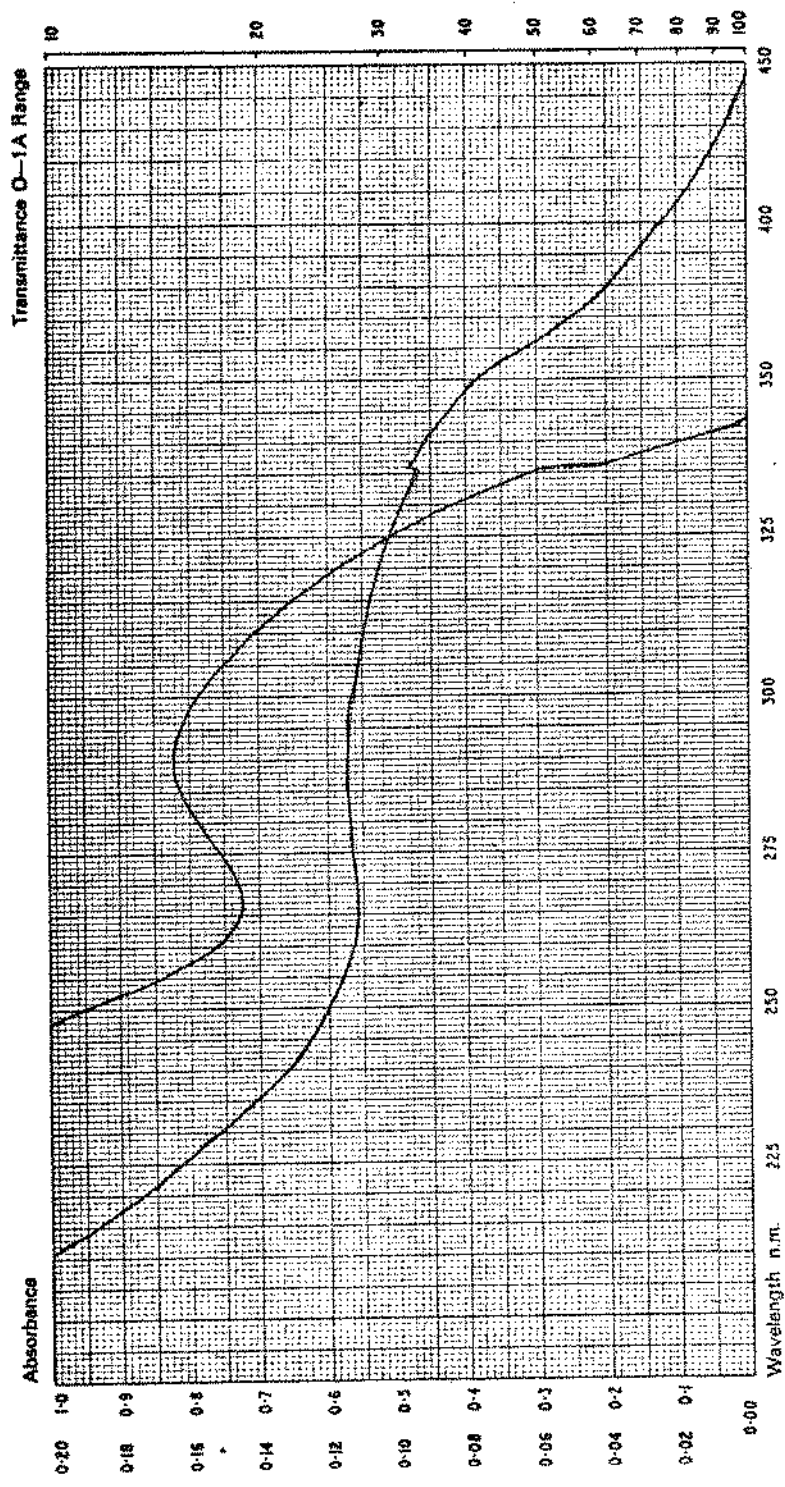


Figura 25 - Espectro ultravioleta da melanoidina 90-1.

F) Testes qualitativos da solubilidade.

Tabela 10 - Solubilidade das melanoidinas.

Avaliação qualitativa.

Solvente	Solubilidade	
	90-3	90-4
água	S	I
n-hexano	I	I
cicloexano	I	I
benzeno	I	I
clorofórmio	I	I
tetracloreto de carbono	I	I
tricloroetileno	I	I
acetona	I	I
metanol	T	T
etanol	I	I
éter etílico	I	I
dioxano	I	I
tetraidrofurano	I	I
piridina	I	I
dimetilsulfóxido	S	P
dimetilformamida	T	T
ácido acético	I	I

I: insolúvel

P: pouco solúvel

T: dissolve traços

S: solúvel

G) Reações químicas com as melanoidinas.

1. Ensaio prévios.

Tabela 11 - Ensaio químicos qualitativos com a melanoidina 90-1.

Reagente	Reação observada na melanoidina
$\text{KMnO}_4 / \text{OH}^-$	descoloramento parcial
NaBH_4	descoloramento parcial
H_2 (Zn/HCl)	descoloramento parcial
NaHSO_3	sem mudança de cor
$\text{Br}_2 / \text{CHCl}_3$	descoloramento parcial

2. Oxidação com permanganato de potássio.

Os produtos de oxidação , ao microscópio polarizador, apresentaram-se como massas amorfas , entremeadas a grupos de cristais aciculares.

O material fundiu entre 185 e 195° C.

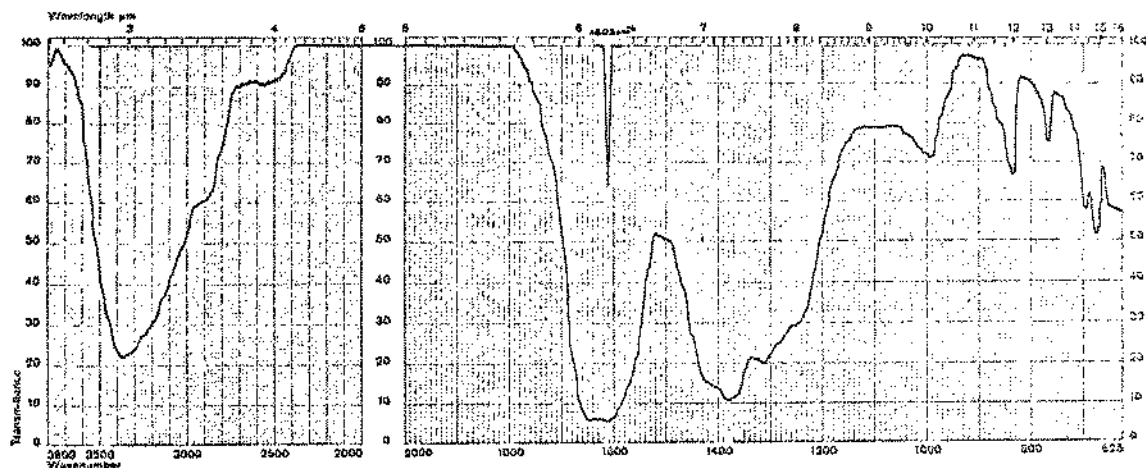


Figura 26 - Espectro infravermelho da melanoidina 90-3 oxidada com permanganato de potássio em meio alcalino.

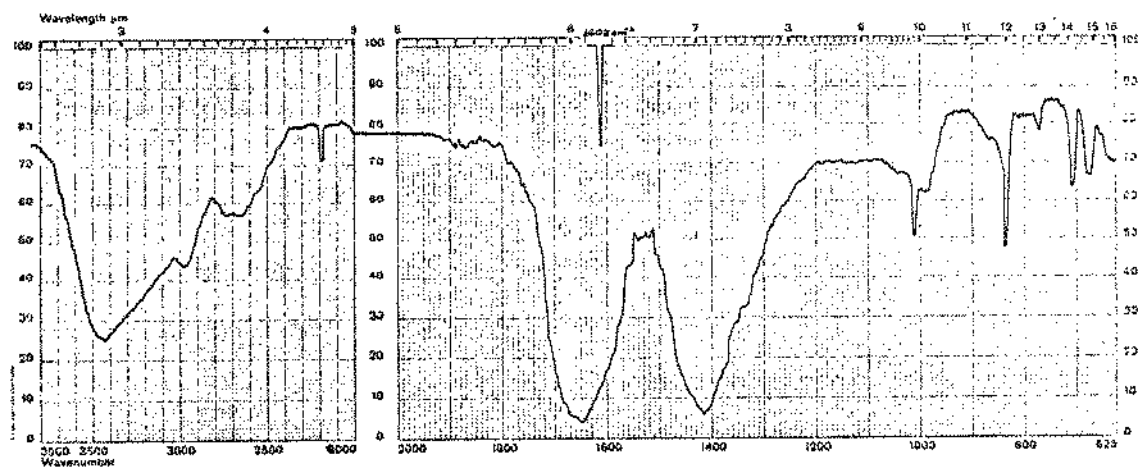


Figura 27 - Espectro infravermelho da melanoidina 90-4 oxidada com permanganato de potássio em meio alcalino.

3. Redução com hidrogênio nascente.

Tabela 12 - Descoramento de uma solução de melanoidina 90-1 com hidrogênio nascente (Zn/HCl).

Tempo (min)	Absorbância a 450 nm
0,0	0,744
1,0	0,442
2,0	0,387
3,0	0,384
4,0	0,359
5,0	0,353
6,0	0,357
7,0	0,347
8,0	0,339
9,0	0,330
10,0	0,322
11,0	0,311
12,0	0,300
14,0	0,290
24,0	0,275
44,0	0,243
90,0	0,206

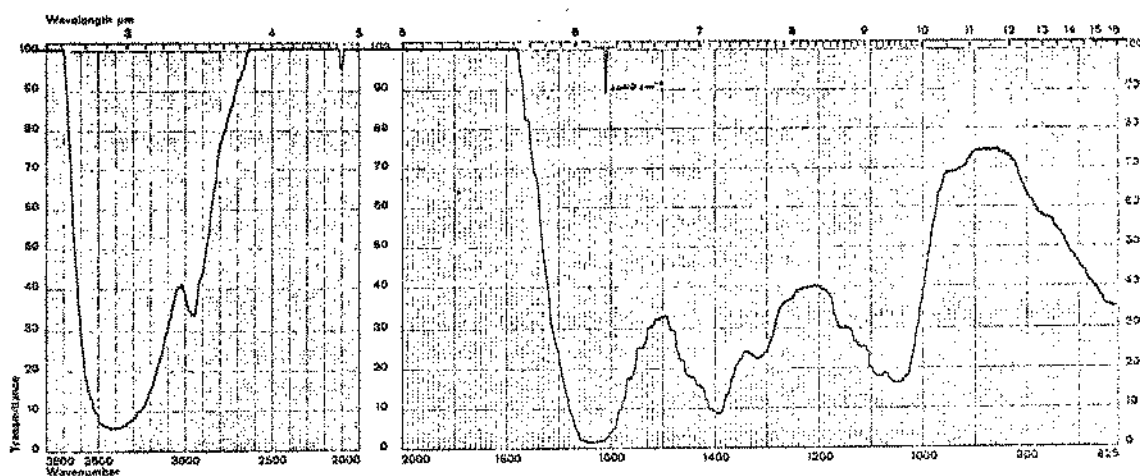


Figura 28 - Espectro infravermelho da melanoidina 90-1 reduzida com hidrogênio nascente.

4. Redução com boroidreto de sódio.

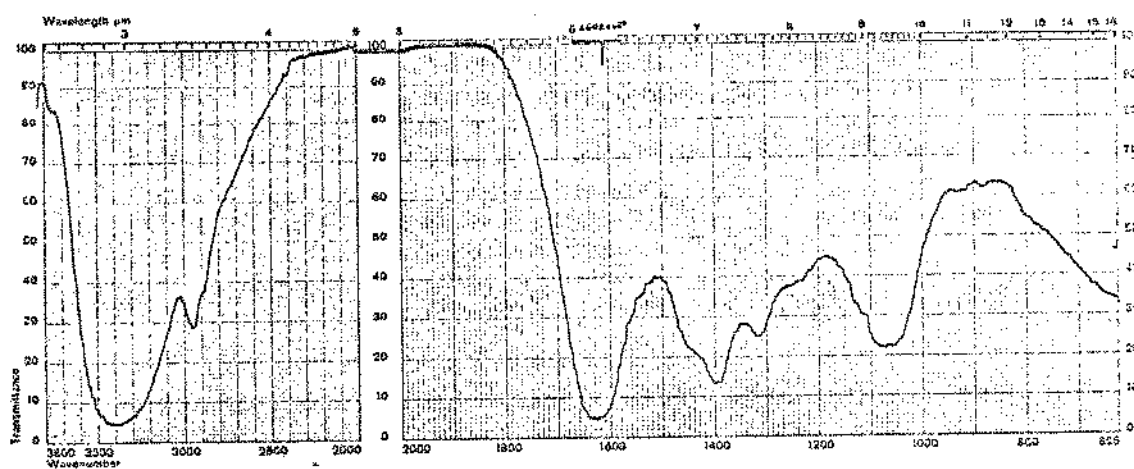


Figura 29 - Espectro infravermelho da melanoidina 90-1 reduzida com boroidreto de sódio.

5. Acetilação

Tabela 13 - Solubilidade da melanoidina 90-3 acetilada.

Solvente	Solubilidade
água	I
n-hexano	I
etanol	I
metanol	I
clorofórmio	I
tetracloreto de carbono	I
benzeno	I
acetona	I
dimetilsulfóxido	I

I: insolúvel

T: dissolve traços

P: pouco solúvel

S: solúvel

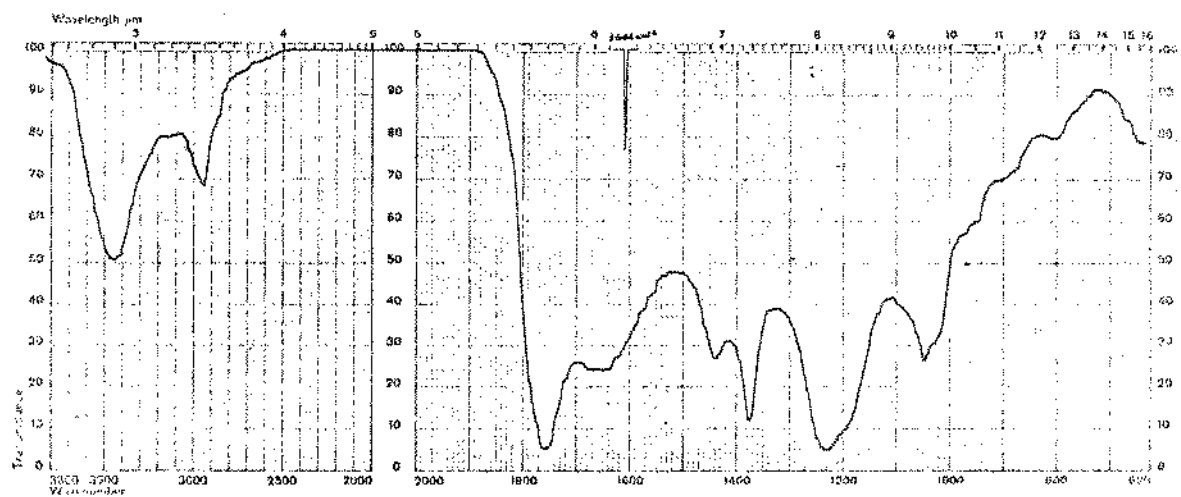


Figura 30 - Espectro infravermelho da melanoidina 90-3 acetilada.

Tabela 14 - Comparação entre os espectros IV da melanoidina 90-3 e da melanoidina 90-3 acetilada.

Bandas que desapareceram ou diminuíram de intensidade (cm^{-1})	Grupo Provável	Bandas que surgiram ou aumentaram de intensidade (cm^{-1}).	Grupo Provável
1070	álcool primário	1220	COOH, acetato
1300	OH (deformação)	1365	COOH
1380	OH (deformação)	1430	COOH
3430	OH (estiramento)	1750	acetato

H) Titulação potenciométrica da melanoidina.

Foram obtidos dois pontos de equivalência, nos /
pH 4,2 e 8,0.

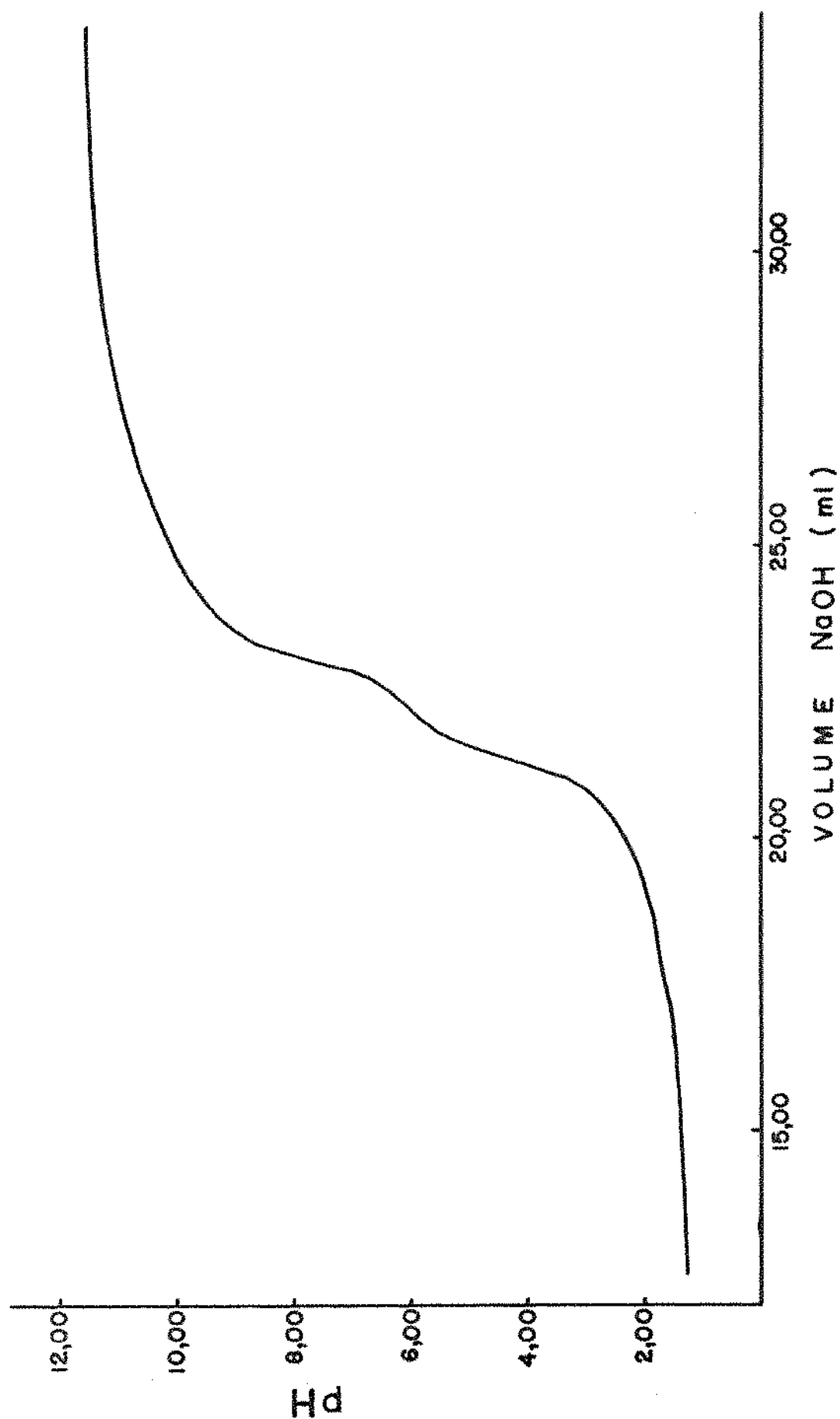


Figura 31 - Titulação potenciométrica da melanoidina 90-1.

I) Dosagem de Na^+ .

Foram encontrados 25 miligramas de Na^+ por grama de melanoidina 90-1, ou seja, 2,5% em massa.

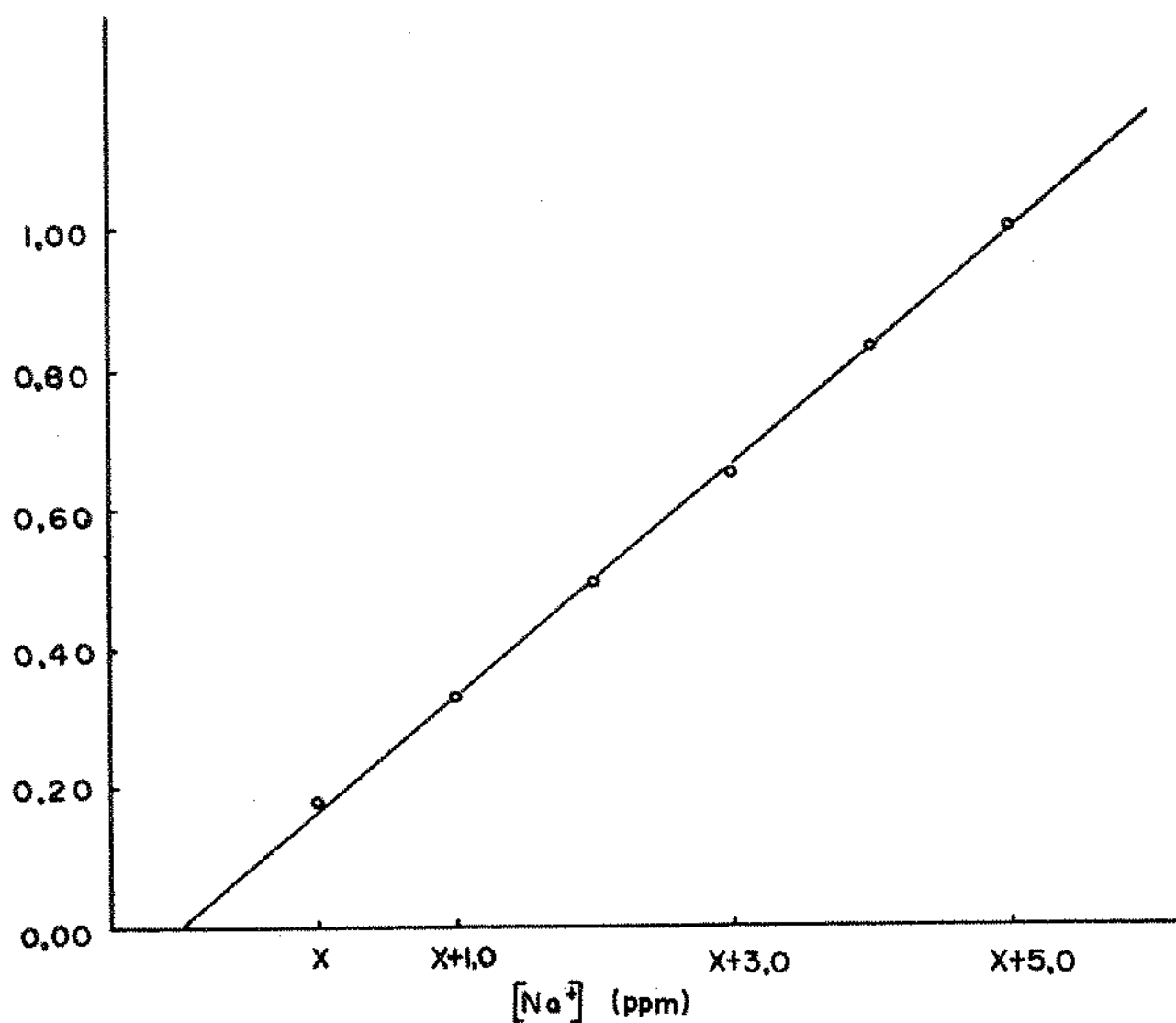


Figura 32 - Dosagem de Na^+ na melanoidina 90-1 por espectro_fotometria de absorção atômica.

J) Reações com íons metálicos.

1. Precipitação com íons metálicos.

Tabela 15 - Cálculo da melanoidina residual em relação à sua concentração inicial, após a precipitação com íons metálicos.

Íon	% de melanoidina remanescente após a precipitação	
	90-1	90-3
Ag ⁺	35,5	7,8
Ba ²⁺	90,4	74,0
Ca ²⁺	93,5	89,6
Co ²⁺	90,3	61,6
Cu ²⁺	48,7	14,4
Mn ²⁺	90,9	77,0
Pb ²⁺	25,2	1,9
Fe ³⁺	37,6	14,5

2. Reação com Cu^{2+}

a) Precipitação.

Foram precipitados 51% da melanoidina 90-1 da solu-
ção tratada com excesso de Cu^{2+} .

Os espectros visível e UV do sobrenadante não mos -
traram alteração significativa em relação aos espectros da
melanoidina sem Cu^{2+} .

b) Determinação da constante de estabilidade do complexo / melanoidina - Cu^{2+} .

O valor de n calculado (ver apêndice) para o com
plexo melanoidina 90-1 - Cu^{2+} foi igual a 2.

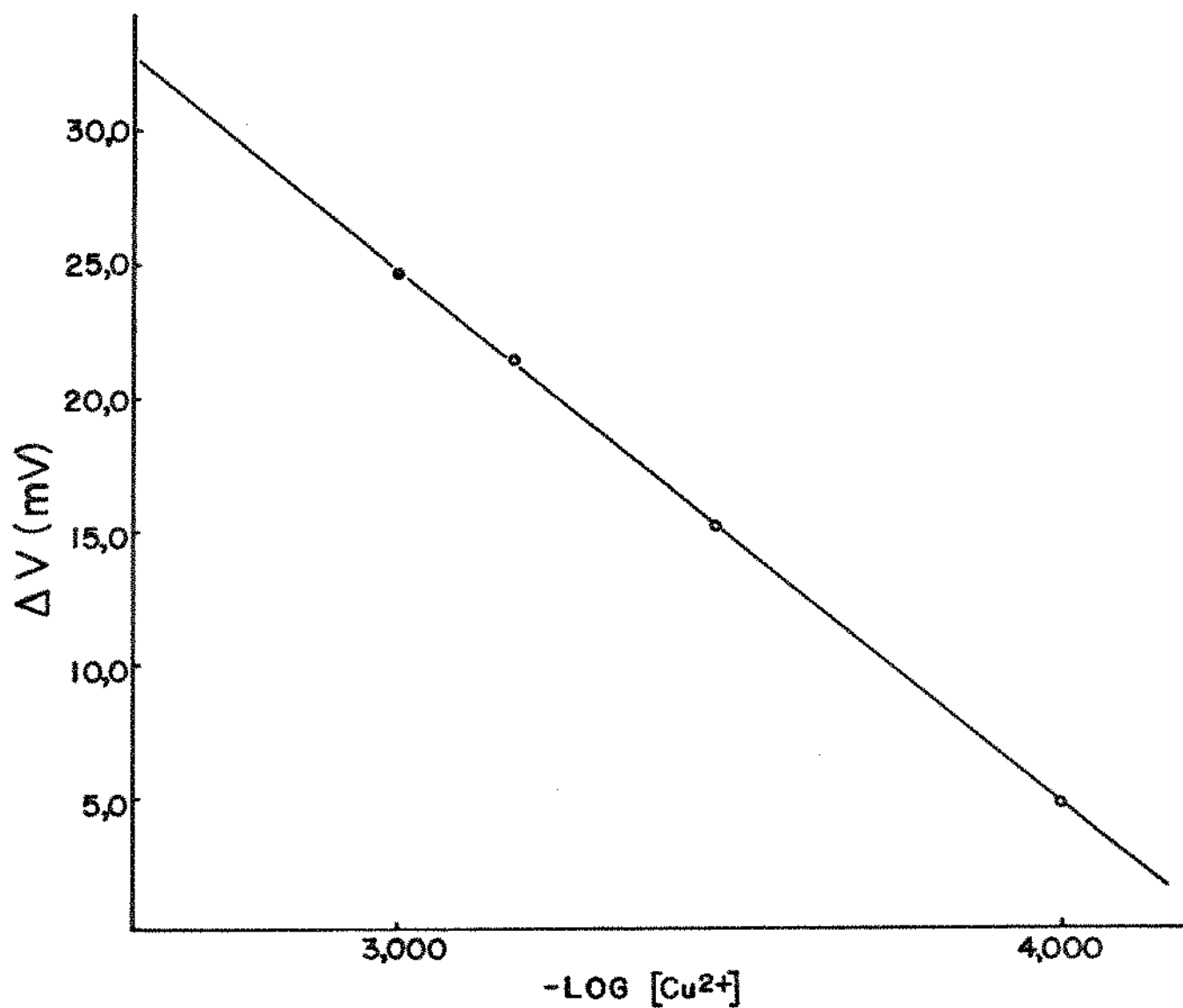


Figura 33 - Curva de calibração do eletrodo de cobre. Diferença de potencial em função do negativo do logaritmo da concentração de Cu^{2+}

Tabela 16 - Determinação potenciométrica das concentrações de Cu^{2+} antes e após a mistura com melanoidina 90-1.

	$(\text{DDP})_i$	$\log [\text{Cu}^{2+}]_i$	$[\text{Cu}^{2+}]_i$	$(\text{DDP})_f$	$\log [\text{Cu}^{2+}]_f$	$[\text{Cu}^{2+}]_f$
	(mV)		(M) $\times 10^4$	(mV)		(M) $\times 10^4$
1	10,8	-3,698	2,00	7,2	-3,879	1,32
2	14,3	-3,523	3,00	10,4	-3,719	1,91
3	16,8	-3,397	4,01	12,9	-3,593	2,55
4	18,7	-3,302	4,99	15,0	-3,487	3,26

$(\text{DDP})_i$: diferença de potencial inicial

$(\text{DDP})_f$: diferença de potencial final

$[\text{Cu}^{2+}]_i$: concentração inicial de Cu^{2+}

$[\text{Cu}^{2+}]_f$: concentração final de Cu^{2+}

Tabela 17 - Cálculo da constante de estabilidade K do complexo melanoidina 90-1 - Cu^{2+} .

	$[\text{Mel}]_i$	$[\text{MelCu}_2^{2+}]$	$[\text{Mel}]_f$	K	
	(M) $\times 10^4$	(M) $\times 10^4$	(M) $\times 10^4$	$(\frac{1}{\text{M}^2}) \times 10^{-7}$	log K
1	1,18	0,34	0,84	2,33	7,37
2	1,18	0,545	0,635	2,34	7,38
3	1,18	0,730	0,450	2,50	7,40
4	1,18	0,865	0,315	2,59	7,41
média	-	-	-	-	$7,39 \pm 0,02$

$[\text{MelCu}_2^{2+}]$: concentração do complexo

$[\text{Mel}]_i$: concentração inicial de melanoidina

$[\text{Mel}]_f$: concentração final de melanoidina.

3. Determinação da constante de estabilidade do complexo melanoidina - Fe^{3+} .

Para este complexo o valor calculado de n (ver apêndice), foi igual a 1.

Tabela 18 - Determinação da constante de estabilidade K do complexo melanoidina 90-1 - Fe^{3+}

	$[\text{Fe}^{3+}]_i$ (M) $\times 10^5$	$[\text{Fe}^{3+}]_f$ (M) $\times 10^5$	$[\text{Mel}]_i$ (M) $\times 10^4$	$[\text{Mel Fe}^{3+}]$ (M) $\times 10^5$	$[\text{Mel}]_f$ (M) $\times 10^4$	K (M^{-1}) $\times 10^{-4}$	log K
1	0,874	0,32	1,15	0,55	1,10	1,6	4,2
2	2,35	1,12	1,15	1,23	1,03	1,1	4,0
3	9,06	5,72	1,15	3,34	0,82	0,7	3,9
média	-	-	-	-	-	-	4,0 $\pm$ 0,2

$[\text{Fe}^{3+}]_i$: concentração inicial de íons Fe^{3+}

$[\text{Fe}^{3+}]_f$: concentração final de íons Fe^{3+}

$[\text{Mel Fe}^{3+}]$: concentração do complexo

$[\text{Mel}]_i$: concentração inicial de melanoidina

$[\text{Mel}]_f$: concentração final de melanoidina

L) Influência da melanoidina no crescimento do *Staphylococcus aureus* S6.

Tabela 19 - Crescimento do *Staphylococcus aureus* S6 na presença de concentrações diferentes de melanoidina 90-1.

Concentração de melanoidina* (%)	Tempo (h)	Absorbância a 900 nm ** A	ln (A x 100)
0	0,0	0,013	0,26
	1,0	0,060	1,79
	2,3	0,255	3,24
	3,5	0,458	3,82
	4,0	0,528	3,97
	5,3	1,20	4,79
	6,0	1,43	4,96
0,5	0,0	0,005	-0,7
	1,0	0,040	1,39
	2,3	0,145	2,67
	3,5	0,320	3,47
	4,0	0,405	3,70
	5,3	0,595	4,09
	6,0	0,680	4,22
1,0	0,0	0,018	0,59
	1,0	0,038	1,34
	2,3	0,073	1,99
	3,5	0,113	2,42
	4,0	0,135	2,60
	5,3	0,248	3,21
	6,0	0,338	3,52
1,5	0,0	0,010	0,00
	1,0	0,025	0,92
	2,3	0,035	1,25
	3,5	0,055	1,70
	4,0	0,063	1,84
	5,3	0,070	1,95
	6,0	0,070	1,95

* Concentrações de melanoidina inferiores a 0,5% não inibiram o crescimento.

** Cada valor de absorbância é a média de duas medidas.

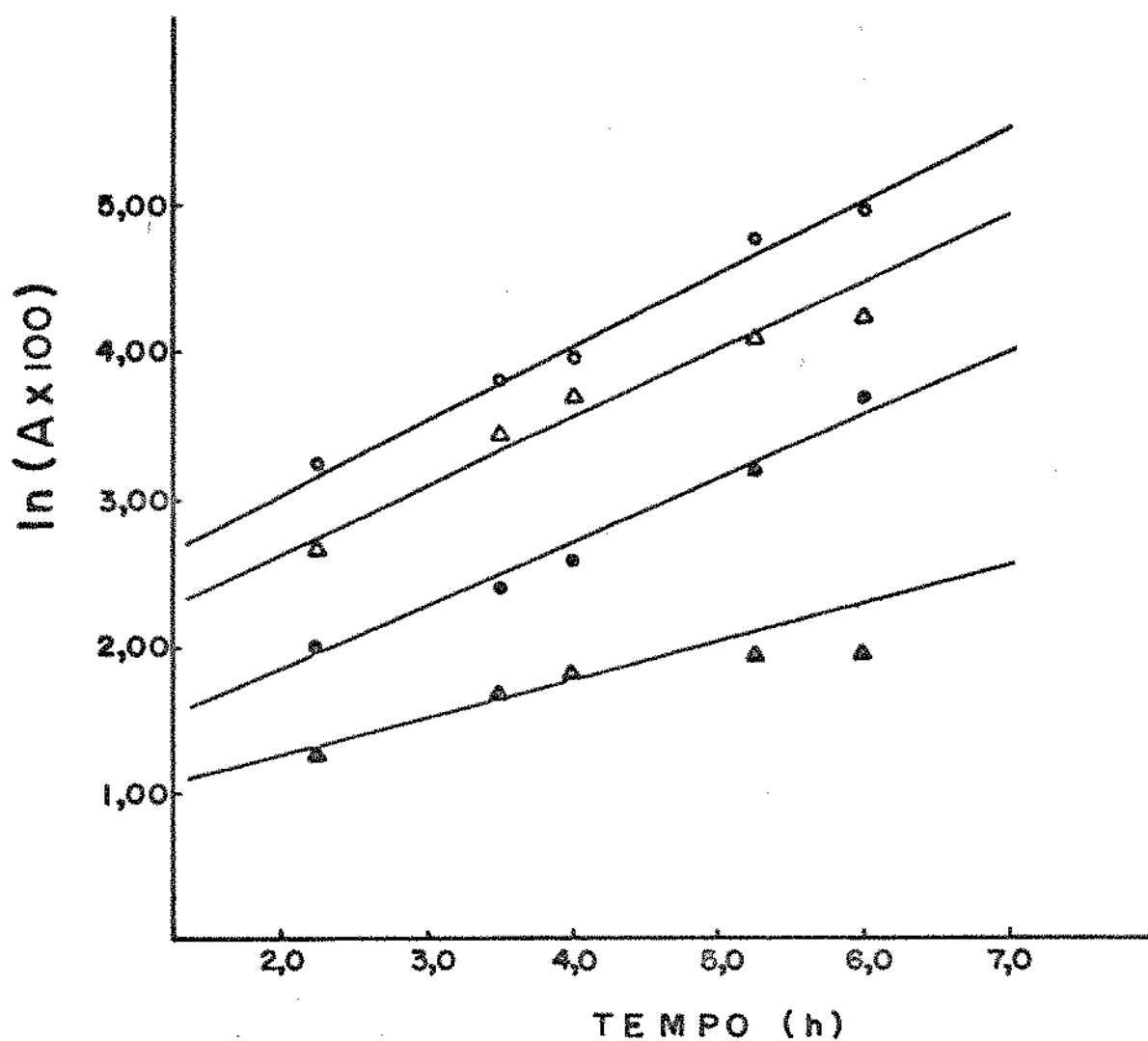


Figura 34 - Curvas de crescimento do *Staphylococcus aureus* S6 em meios de cultura contendo diferentes concentrações de melanoidina 90-1.

0% ○ 0,5% Δ 1,0% ● 1,5% ▲

Tabela 20- Velocidades específicas de crescimento do *S. aureus* S6 em meios contendo concentrações diferentes de melanoidina 90-1.

Concentração de melanoidina (%)	constante de velocidade: k (h ⁻¹)	Diminuição no valor de k em relação ao padrão s/melanoidina (%)
0	0,50	-
0,5	0,47	6,0
1,0	0,43	14
1,5	0,27	46

Tabela 21 - Crescimento do *Staphylococcus aureus* S6 em um meio de cultura dialisado contra uma solução de melanoidina 90-1.

Meio de Cultura	Tempo (h)	Absorbância* a 900 nm A	ln (A x 100)
não dialisado	1,5	0,041	1,41
	2,5	0,097	2,27
	3,0	0,148	2,69
	3,5	0,200	3,00
	4,0	0,260	3,26
	4,5	0,324	3,48
	5,0	0,399	3,69
	5,5	0,629	4,14
dialisado	1,5	0,014	0,34
	2,5	0,059	1,77
	3,0	0,106	2,36
	3,5	0,153	2,73
	4,0	0,201	3,00
	4,5	0,238	3,17
	5,0	0,297	3,39
	5,5	0,378	3,63

* Cada valor de absorbância é a média de dez medidas.

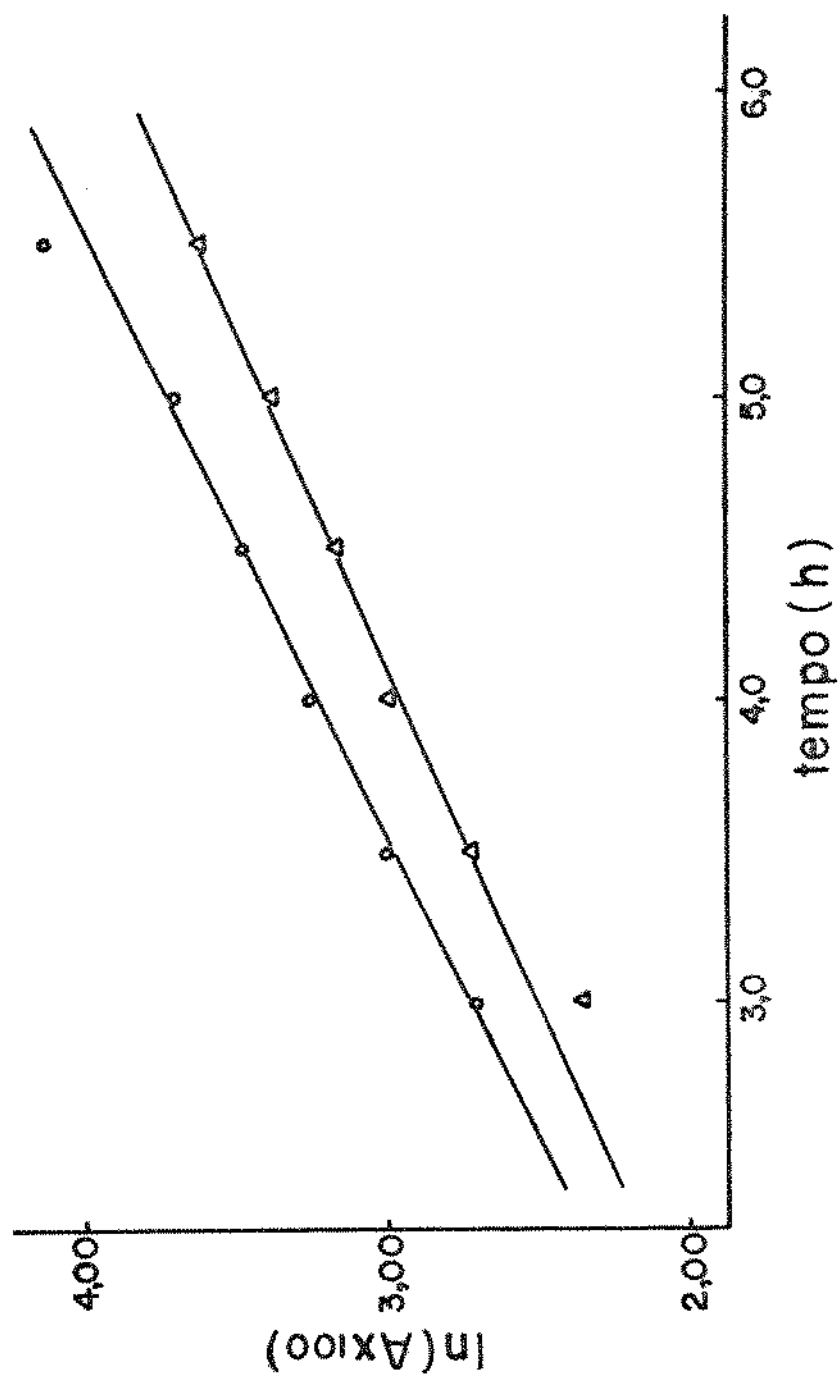


Figura 35 - Curva de crescimento do *Staphylococcus aureus* 58 em um meio de cultura normal (●) e em um meio dialisado durante 116 horas contra outro contendo 3,0% de melanoidina 90-1 (Δ).

Tabela 22 - Velocidades específicas de crescimento do *S. aureus* S6 nos meios dialisado e não dialisado.

Meio de Cultura	Constante de velocidade de crescimento : k (h ⁻¹)	Diminuição no va- lor de k em rela- ção ao padrão não dialisado. (%)
não dialisado	0,50	-
dialisado	0,45	10

VI. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Considerando que no processamento de alimentos são usados pH e temperaturas diferentes e que pela própria natureza do alimento as concentrações relativas de açúcares e aminoácidos podem variar consideravelmente, no presente trabalho foram escolhidas condições de reação que:

a) permitissem a obtenção das melanoidinas dentro de limites de tempo razoáveis; b) oferecessem possibilidades de extrapolação dos resultados obtidos para os alimentos, tanto no que diz respeito ao processamento como ao armazenamento. O uso de sistemas modelo se justifica se considerarmos que poderão ser exercidos controles mais rigorosos na preparação das melanoidinas e permitirão a obtenção de produtos finais mais fáceis de purificar para posterior estudo, além de permitir a reprodutibilidade dos resultados nas condições usadas.

Na preparação das melanoidinas verificou-se uma diferença característica entre elas e que foi a insolubilidade dos produtos obtidos em pH 3,0. Examinando-se a tabela 3 e admitindo que a variação de absorbância a 450 nm tenha sido proporcional à formação das melanoidinas ou ao seu peso molecular, verifica-se que em pH 3,0 a reação não pode ser acompanhada por esse método devido à formação de precipitado, tanto mais precoce quanto maior a concentração inicial dos reagen-

tes e a temperatura. A insolubilidade desses produtos em água e em qualquer outro solvente usual (tabela 10) impediu o seu uso em subseqüentes determinações. Por outro lado, as melanoidinas obtidas em pH 6,0 apresentaram solubilidade em água e em dimetilsulfóxido, ambos solventes de elevada constante dielétrica.

Tanto em pH 3,0 como 6,0 verificou-se que o aumento da temperatura e da concentração produziram aumento da velocidade de formação das melanoidinas. O fator pH pareceu ser decisivo na fase inicial da reação, possivelmente retardando a formação de intermediários não coloridos em pH 3,0, mas em fases mais tardias o efeito do pH já não foi tão evidente (figuras 1 e 3).

Considerando que a formação de caramelo poderia ocorrer nas condições de reação usadas, foram feitas experiências com sistemas iguais, mas sem o aminoácido. Os resultados estão nas figuras 2 e 4. Em todos os casos a caramelização ocorreu em pequena quantidade e o maior aumento da velocidade de caramelização com o aumento da temperatura, em relação ao aumento ocorrido na formação das melanoidinas, indicou uma energia de ativação maior para aquela reação.

O estudo da formação de complexos entre melanoidinas e íons metálicos é dependente da possibilidade de serem as melanoidinas solúveis, ainda que não possa ser rejeitada a formação de complexos com íons metálicos nos alimentos durante a formação das melanoidinas, baseada na possibilidade de polimerização de complexos já formados e ainda solúveis.

As determinações espectroscópicas e dos pesos moleculares, bem como a análise elementar das melanoidinas solúveis obtidas em condições diferentes porém padronizadas, permitiu a verificação da semelhança na composição e na estrutura dos produtos obtidos (tabelas 5, 7 e 9). A semelhança entre as melanoidinas solúveis e insolúveis foi também constatada pelas determinações espectroscópicas e pela análise elementar (tabelas 5 e 9).

A considerável semelhança nas porcentagens de C , H, N e O das diversas melanoidinas (tabela 5), apesar das diferenças nos seus pesos moleculares (tabela 7), leva a admitir que se trate de compostos com diferentes graus de polimerização. A razão C/N mostrou que a temperatura, pH e concentração inicial dos reagentes não afetaram significativamente a interação quantitativa açúcar-aminoácido.

O consumo de glucose apresentou diferenças sensíveis em relação ao pH e à concentração dos reagentes, mas não quanto à temperatura (tabela 4).

Aparentemente, a reação ainda que semelhante em pH diferentes, é inicialmente mais rápida em pH 6,0 , permitindo um acúmulo de intermediários incolores que favorecem a formação de polímeros em maior número, enquanto em pH 3,0 há formação de menos moléculas porém mais polimerizadas, o que é indicado pela precipitação das melanoidinas neste pH.

A determinação dos pesos moleculares das melanoidinas solúveis (tabela 7) permitiu verificar que para a mesma concentração inicial dos reagentes, o aumento de temperatura

parece tender a diminuir o peso molecular, com exceção da melanoidina 90-3, que inclusive foi excluída do Sephadex G-100 (figura 11). Aparentemente a estrutura das melanoidinas é estereoquimicamente próxima daquela das proteínas usadas para padronizar a coluna de Sephadex G-100 (tabela 6 e figura 5), já que o peso molecular de uma das melanoidinas foi confirmado por ultracentrifugação em gradiente de sacarose (tabela 8).

Os espectros visível e ultravioleta (Figuras 24 e 25) não contribuíram para o esclarecimento das estruturas e somente indicaram a possibilidade da existência de estruturas complexas, com superposição de bandas, resultando em espectros não característicos.

Os espectros infravermelho (figuras 12 a 23), ainda que de baixa resolução, permitiram verificar que todas as melanoidinas preparadas apresentaram espectros com as mesmas bandas de absorção correspondentes a grupos funcionais bem caracterizados (tabela 9). Todos os espectros das melanoidinas produzidas em pH 6,0 são iguais bem como o são entre si aqueles correspondentes às melanoidinas obtidas em pH 3,0. Há uma diferença pequena mas constante entre os máximos de absorção de algumas bandas dos espectros das melanoidinas obtidas em pH 6,0 e 3,0, o que poderia indicar diferenças estruturais das vizinhanças dos grupos funcionais. Em alguns casos, por exemplo, pode-se tratar da existência ou não de ligações de hidrogênio envolvendo o H do grupo funcional correspondente à banda deslocada.

Os resultados resumidos na tabela 9 indicam a pre-

sença de, pelo menos, os seguintes grupos funcionais: hidroxila, carboxilato e C-H.

Os dados da tabela 4 mostram que a pH 6,0 há um maior consumo de glucose, não relacionado com a temperatura da reação, a qual é mais importante para a fase final da transformação (Tabela 3).

Os dados da análise elementar mostram uma semelhança na composição porcentual das melanoidinas, sendo que o quociente C/N sofreu pequena variação em relação às várias condições de reação. Também se verifica que as melanoidinas incorporaram relativamente pouco N do aminoácido e a ausência de grupos C-O-C indica que tais compostos devem ser formados predominantemente de cadeias carbônicas, com um número grande de duplas ligações, tendo em vista a relação entre C e H.

Por outro lado, os espectros infravermelho mostram a existência de grupos que podem funcionar como ligantes de íons metálicos. A existência dos grupos OH é confirmada pelo espectro infravermelho da melanoidina acetilada (figura 30) , onde desapareceram bandas características de grupos OH (tabela 14). A insolubilidade em água da melanoidina acetilada (tabela 13) indica que a presença de grupos OH livres é essencial para a solubilidade, provavelmente pela hidrofili^{da} de destes grupos, em contraste com a hidrofobicidade dos grupos acetato. A banda em 3450 cm^{-1} no espectro IV do produto acetilado sugere a presença do grupo amina.

A relação entre duplas ligações presentes e a cor das melanoidinas foi evidenciada pelo descoramento que elas

sofreram ao serem oxidadas com permanganato de potássio.

Estabelecida a existência de grupos funcionais li-gantes de íons metálicos pelo espectro infravermelho e demonstrada a semelhança estrutural entre as diversas melanoidinas obtidas, foi testado o efeito do peso molecular sobre a formação de precipitados das melanoidinas com íons metálicos. Os resultados da tabela 15 mostram que a um peso molecular maior correspondeu uma maior precipitação, sendo que a capacidade relativa de precipitação dos diferentes íons foi a mesma para ambos os pesos moleculares. As porcentagens de melanoidina não precipitada em cada caso permitem agrupar os catiões em "fortemente precipitantes" , Pb^{2+} , Ag^+ , Fe^{3+} e Cu^{2+} e "fracamente precipitantes" ou " não precipitantes", Ba^{2+} e Ca^{2+} . Não foi encontrada uma correlação satisfatória entre peso atômico ou diâmetro do íon e a precipitação das melanoidinas. Em geral, verificou-se que as melanoidinas (em particular as de maior peso molecular) seriam praticamente eliminadas da solução pela presença de íons Pb^{2+} e Ag^{2+} e o seu teor seria consideravelmente reduzido pelos íons Fe^{3+} e Cu^{2+} .

A formação de precipitados ou de complexos solú -
veis pela interação da melanoidina com íons metálicos, pode -
ria estar ligada à existência de grupos - COOH na molécula,
segundo Gomyo e Horikoshi (23). Assim, era de interesse
confirmar a presença desses grupos e determinar o seu número.

Pela titulação da melanoidina com solução de hidróxido de sódio foi confirmada a presença de grupos ácidos, tendo sido definidos dois pontos de equivalência para a melanoidina 90-1 (Figura 31). Esta melanoidina, titulada até o segundo ponto de equivalência e portanto totalmente na forma de sal de sódio, apresentou 2,5% em peso deste íon. Admitindo-se que todo este Na^+ estivesse associado a grupos carboxilas, então existiriam no máximo nove destes grupos por molécula de melanoidina 90-1. Desde que foram encontrados dois pontos de equivalência, podemos inferir a existência de carboxilas de diferentes pK ou de outro grupo ácido além da carboxila, possivelmente amina protonada ou grupos $\text{>C} = \underset{\text{OH}}{\underset{|}{\text{C}}} - \overset{|}{\underset{\text{OH}}{\text{C}}} -$.

A precipitação de melanoidinas com diversos íons metálicos (tabela 15), poderia ser interpretada em princípio pela comparação com a reação com o Na^+ , como sendo devido à formação de sais, porém neste caso pouco solúveis. Entretanto, como ficou demonstrado (tabelas 16,17 e 18) para o caso do Cu^{2+} e Fe^{3+} , mesmo quando as concentrações dos íons eram baixas o bastante para que não ocorresse precipitação, ainda assim existia uma interação com a melanoidina, pois parte dos íons metálicos era retirada da solução. Existe assim forte probabilidade de ter ocorrido a formação de um complexo entre a melanoidina e o íon, ligados por coordenação com os ligantes presentes na molécula.

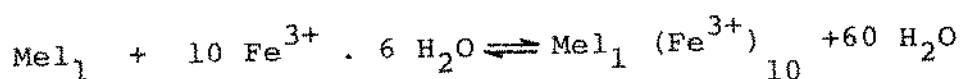
Os resultados apresentados na tabela 15, mostram

que a precipitação com íons metálicos da melanoidina 90-3, de peso molecular maior do que a 90-1, se deu em maior extensão do que com esta. É de se esperar que a solubilidade do complexo com a melanoidina 90-3, de peso molecular muito maior, seja menor. Além da diferença na solubilidade, a diferença no peso molecular da melanoidina deve influir na própria constante de estabilidade, como será discutido mais adiante.

O espectro visível - ultravioleta da melanoidina ligada ao Cu^{2+} não diferiu daquele da própria melanoidina, ao contrário do relatado por Gomyo e Horikoshi (23) em 1976. Possivelmente a intensa e generalizada absorção, devido à própria melanoidina, encubra as absorções resultantes de transições entre níveis gerados pelo campo ligante.

Os valores das constantes de estabilidade com o Cu^{2+} e o Fe^{3+} (tabelas 17 e 18) diferem bastante (várias ordens de grandeza) dos obtidos por Gomyo e Horikoshi (23). Além disso, o número de íons ligados por molécula da melanoidina obtida por estes autores era várias vezes maior do que em nosso caso. A causa dessas diferenças poderia ser atribuída à diferença no peso molecular das melanoidinas. A melanoidina estudada pelos autores citados apresentou um peso molecular da ordem de cem mil, enquanto a nossa tinha um peso molecular de 8500. É evidente que num polímero várias vezes maior o número de locais de ligação para os íons metálicos também deve ser maior. Em uma situação como esta é de se esperar uma diferença entre as constantes de estabilidade dos complexos das duas melanoidinas, sendo maior a constante do complexo em que se li-

gam mais íons por molécula, devido a um fenômeno semelhante ao conhecido como " efeito quelato ". Tal efeito acredita-se que se deva principalmente à variação da entropia ocorrida durante a formação do complexo em meio aquoso, como é discutido por exemplo por Yatsimirskii e Vasil' ev (69), 1960. Por exemplo as reações de complexação da melanoidina com o Fe^{3+} em meio aquoso, podem ser escritas esquematicamente da seguinte maneira:



Onde Mel_1 é a melanoidina obtida por Gomyo e Horikoshi e Mel_2 a nossa 90-1. Vê-se que na primeira reação houve um aumento grande no número de partículas, pois haviam 11 moléculas e se formaram 61, o que leva a um aumento considerável na entropia do sistema. Na segunda reação houve formação de apenas 5 moléculas, o que produz um aumento bem menor da entropia. Desde que:

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T \Delta S^{\circ}$$

e

$$\Delta G^{\circ} = - RT \ln K$$

onde K é a constante de estabilidade do complexo, é evidente que quanto maior o aumento da entropia, maior será o valor da constante de estabilidade.

De tudo o que foi discutido, conclui-se que as mela

noidinas são capazes de se ligar a íons metálicos e que a estabilidade destes compostos ou a porcentagem de melanoidina precipitada pelos íons, dependem do peso molecular da melanoidina. Estes fenômenos poderiam influir nas propriedades de sistemas em que a melanoidina está presente, como em alimentos processados e no húmus. Assim, nos primeiros, a melanoidina poderia interferir no aproveitamento de íons metálicos de interesse para a nutrição; esta hipótese ainda não foi confirmada por estudos nutricionais.

Do mesmo modo, o efeito antioxidante das melanoidinas poderia estar ligado à formação de complexos estáveis com íons pró-oxidantes, como o Fe^{3+} e o Cu^{2+} (23). Esta hipótese é bastante viável, tendo em vista que, por exemplo, para o Cu^{2+} , o valor obtido da constante do complexo com a melanoidina foi da ordem de 10^7 , que se compara favoravelmente com a constante de estabilidade desse íon com o ácido cítrico, que é da ordem de 10^2 (64).

O ácido cítrico é um componente de misturas antioxidantes para gorduras e sua ação se baseia na retirada de íons metálicos do meio.

A capacidade da melanoidina de se ligar a íons metálicos sugeriu a possibilidade da mesma inibir o crescimento de microorganismos dependentes de tais íons. A fim de se verificar esta hipótese, foi testado o efeito da melanoidina no crescimento do *Staphylococcus aureus* S6, o qual depende de íons de ferro para seu crescimento (Shade (53), 1963; Theodore e Shade (59), 1965). Os resultados mostraram (figura 34 e tabela

las 19 e 20), que para haver uma inibição significativa, de 46%, foi necessária uma concentração de melanoidina de 1,5% no meio de cultura. Até a concentração de 0,2% não houve inibição detectável.

A experiência de crescimento do microrganismo no meio dialisado contra uma solução de melanoidina, teve por finalidade verificar a origem da atividade inibidora. Esta poderia ser devido à diminuição da concentração de algum componente essencial do meio de cultura, dialisável, o Fe^{3+} em particular, causada pela melanoidina, ou por uma ação direta deste pigmento sobre as células do microrganismo. Uma inibição de apenas 10% neste caso, indicou que não estava envolvida apenas a retirada do íon Fe^{3+} , tornando a segunda hipótese mais provável.

Segundo Theodore e Shade (59), o tratamento do meio de cultura com o complexante batofenantrolina não reduziu a concentração de íons ferro o suficiente para que ocorresse inibição do crescimento do microrganismo, tendo sido necessário para tal o tratamento com conalbumina, cujo complexo com o ferro tem uma constante de estabilidade da ordem de 10^{28} - 10^{30} (59). Desde que o valor da constante de estabilidade do complexo melanoidina - Fe^{3+} estudado aqui foi da ordem de 10^4 (tabela 18), o teor de íons Fe^{3+} livres ainda seria suficiente para o crescimento do microrganismo, o que explicaria o resultado da experiência com o meio dialisado.

VII. CONCLUSÕES

Os resultados das experiências permitem concluir que:

- A) A velocidade de formação das melanoidinas obtidas a partir de glucose e glicina, depende da temperatura, concentração dos reagentes e pH, aumentando com a elevação dos dois primeiros e diminuindo com o abaixamento do último.
- B) A solubilidade das melanoidinas depende do pH em que foram preparadas. As melanoidinas obtidas a pH 6,0 são solúveis em água e as produzidas a pH 3,0 são pouco solúveis.
- C) O peso molecular das melanoidinas é também função das condições de sua preparação.
- D) As moléculas das melanoidinas estudadas possuem grupos $-OH$, $-COO^-$, $-\dot{C}H$, $>C = C<$ e provavelmente $-NH_2$ ou $>NH$.
- E) A melanoidina possui grupos ácidos em sua molécula, sendo detectáveis dois pontos de equivalência na titulação com OH^- , nos pH 4,2 e 8,0.
- F) A melanoidina pode-se complexar com íons metálicos, como o Fe^{3+} e o Cu^{2+} , formando complexos solúveis em concentrações baixas de melanoidina (da ordem de 10^{-4} M) e

dos íons, precipitando em soluções mais concentradas.

- G) A melanoidina inibe o crescimento do *Staphylococcus aureus* S6, a partir da concentração de 0,5% no meio de cultura.
- H) A inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus* S6 não é somente devida à retirada do íon Fe^{3+} do meio pela melanoidina, mas o mecanismo principal deve envolver uma ação direta sobre a célula bacteriana.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGARWAL, S.K.D. ; JOHARY, P.C. & MISRA, D.S.

Infrared spectroscopics studies on different constituents of sugar colorants as obtained by paper chromatographic elution and on dialysis. Z. Zuckerind. 24 (10): 532-535 (1974). In: Chem. Abs. 82 : 45535n (1975).

2. BARBETTI, P. & CHIAPPINI, I. - Fractionation and spectroscopic characterization of melanoidic pigments from a glucose-glycine non-enzymic browning system. Ann. Chim. (Roma) 66 (5-6) : 293-304 (1976).

3. BARBETTI, P. & CHIAPPINI, I. - Identification of the furan group in the melanoidic pigments from a glucose-glycine Maillard reaction. Ann. Chim (Roma) 66 (7-8) : 485-488 (1976).

4. BERTHELOT, M. & ANDRÉ, G. - Sur les matières organiques constitutives du sol végétal. Ann. de chim. et de phys. 7e. série 1 : 273-288 (1894).

5. BINKLEY, W.W. - Hydrogenolysis of the dialysed

- browning products of final cane molasses. Intern. Sugar J. 59 : 64-66 (1957).
6. BINKLEY, W. W. - The action of glycol - splitting reagents on the dialysed browning products from cane final molasses. Intern. Sugar J. 59 : 178-180 (1957).
7. BINKLEY, W. W. - Action of bromine on the dialysed browning product from final cane molasses. Intern. Sugar J. 60 : 62-64 (1958).
8. BINKLEY, W. W. - Acetylation and oximation. Assay for certain oxygen-bearing groups in the dialysed browning products from cane final molasses. Intern. Sugar J. 60 : 322-323 (1958).
9. BINKLEY, W. W. - An estimation of the molecular weight of the dialysed browning products from cane final molasses. Intern. Sugar J. 62 : 36-38 (1960).
10. BINKLEY, W. W. - The isolation by membrane diffusion of certain browning products from cane final molasses. Intern. Sugar J. 62 : 187-189 (1960).
11. BINKLEY, W. W. - Studies on the browning products of

cane final molasses.

Abstr. Papers Am. Chem. Soc. 168 th Meeting (1974)

12. CARSON, J. F. & OLCOTT, H. S. - Brown condensation products from acetaldehyde and aliphatic amines
J. Am. Chem. Soc. 76 : 2257-2259 (1954).
13. CLARK, A. V. & TANNEBAUM, S. R. - Isolation and characterization of pigments from protein-carbonyl browning systems. J. Agr. Food Chem. 18 (5): 891-894 (1970).
14. CONSTANTINIDES, S. M. ; SGARBIERI, V. C. & GALEAZZI, M. A. M. - Comunicação pessoal (1978).
15. CUNNINGHAM, L. W. , Jr.; TIETZE, F. ; GREEN, N. M. & NEURATH, H. - Molecular-kinetic properties of trypsin and related proteins. Discuss. Faraday Soc. 13 : 58-67 (1953).
16. DEHÉRAIN, P.P. - Traité de chimie agricole. 2. édit. Paris, 1902. p.791. In: Maillard, L. C. Identité des matières humiques de synthèse avec les matières humiques naturelles. Ann. Chim. 7 : 113-152 (1971).
17. DIXON, M. & WEBB, E. - Enzymes. 2. ed. London, Longman ,

1971. p. 454.

18. DUTOIT, M. M. S. & PAGE, H. J. - Studies on the carbon and nitrogen cycles in the soil. IV. Natural and artificial humic acids. J. Agr. Sci. 22 : 115-125 (1932). In: DANEHY, J. P. & PIGMAN, W. W. - Reactions between sugars and nitrogenous compounds and their relationship to certain food problems. In : MRAK, E. M. & STEWART, G.F., ed. Advances in food research. New York, Academic Press, 1951. v.3 p. 241-290.
19. ENDERS, C. Melanoidins. Kolloid-Z. 85 : 74 (1938). In : DANEHY, J. P. & PIGMAN, W. W. - Reactions between sugars and nitrogenous compounds and their relationship to certain food problems. In : MRAK, E. M. & STEWART, G. F. , ed. Advances in food research. New York, Academic Press , 1951. v. 3 , p. 241-290.
20. ENDERS, C. & THEIS, K. - The melanoidins and their relation to humic acids. Brennstoff - Chem. 19:360 (1938). In: DANEHY, J.P. & PIGMAN, W. W. - Reactions between sugars and nitrogenous compounds and their relationship to certain food problems. In : MRAK, E. M. & STEWART, G. F. , ed. Advances in food research. New York, Academic Press, 1951 . v.3 , p. 241-290.

21. ENDERS, C. - Über den chemismus der huminsäurebildung unter physiologischen bedingungen. III. Die abhängigkeit von bildungsgeschwindigkeit eigenschaften und zusammensetzung der aus methylglyoxal und glykokoll gebildeten huminsäuren. Biochem. Z. 313 : 352-371 (1943).
22. FERRERONI, M. C. ; JORDAN, I. & TOLEDO, A. P.
Adsorção de íons Cu^{2+} em ácido fúlvico. Ciên. e Cult. Resumos da 28^a. Reunião Anual da SBPC. 28 (7) : 136 (1976).
23. GOMYO, T. & HORIKOSHI, M. - On the interaction of melanoidin with metallic ions. Agr. Biol. Chem. 40 (1) : 33-40 (1976).
24. HÄRTEL, A. ; FABEL - SCHULTE, K. ; LANG, H. & RICK, W. - Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. 6 : 34 (1968).
25. HENDRICKSON, J. B. ; CRAM, D. J. & HAMMOND, G. S.
Organic chemistry. 3. ed. New York, Mc Graw - Hill, 1970 . p. 18.
26. JORDAN, I. ; FERRERONI, M. C. & TOLEDO, A. P. - In fluência da massa molecular na adsorção de íons cúpricos por ácido húmico. Ciên. e Cult. Resu

mos da 28a. Reunião Anual da SBPC. 28 (7): 135-136 (1976).

27. KAJIMOTO, G. ; YOSHIDA, H. & TAKAMORI, Y. - Studies on the metal protein complex. V. Reaction between the browning reactions products from glycine and reducing sugars and metals. J. Japan Oil Chem. Soc. 24 (1) : 15-21 (1975).
28. KATO, H. ; GOMYO, T. ; UDAKA, K. & FUJIMAKI, M. - Melanoidins. II. Properties of melanoidins fractionated through gel filtration. Nippon Nogei Kagaku Kaishi. 45 (12) : 559-564 (1971).
29. KATO, H. ; ISHIKAWA, H. ; KASHIO, H. ; TSUCHIDA, H. & FUJIMAKI, M. - Antioxidative activity of the oxidation and the reduction products prepared from melanoidins. Nippon Nogei Kagaku Kaishi. 49 (3) : 179-183 (1975).
30. KOCH, F. C. & MC MEEKIN, T. L. - A new direct nesslerization micro-kjeldahl method and a modification of the Nessler - Folin reagent for ammonia. J. Am. Chem. Soc. 46 (9) : 2066-2069 (1924).
31. LOEB, G. I. & SCHERAGA, H. A. - Hydrodynamic and thermodynamic properties of bovine serum albumin

at low pH. J. Phys. Chem. 60 (7) : 1633-1644
(1956).

32. MAILLARD, L. C. - Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoidines par voie méthodique. Compt. rend. 154 : 66-68 (1912).
33. MAILLARD, L. C. - Formation d'humus et de combustibles minéraux sans intervention de l'oxygène atmosphérique, des microorganismes, des hautes températures, ou des fortes pressions. Compt. rend. 155 : 1554-1556 (1912).
34. MAILLARD, L. C. - Formation de matières humiques par action de polypeptides sur les sucres. Compt. rend. 156 : 1159-1160 (1913).
35. MAILLARD, L. C. - Synthèse des matières humiques par action des acides aminés sur les sucres réducteurs. Ann. chim. 9e. série. 5 : 258-317 (1916).
36. MAILLARD, L. C. - Identité des matières humiques de synthèse avec les matières humiques naturelles. Ann. chim. 9e. série 7 : 113-152 (1917).
37. MARTIN, R. G. & AMES, B. N. - A method for determining the sedimentation behavior of enzymes:

Application to protein mixtures. J. Biol. Chem.
236 (5) : 1372-1379 (1961).

38. MEYBECK, A. - A spectroscopic study of the reaction products of dihydroxyacetone with aminoacids. J. Soc. Cosmet. Chem. 28 (1) : 25-35 (1977).
39. MILIC, B. L. ; GRUJIC-INJAC, B. ; PILETIC, M. V. ; LAJSIC, S. & KOLAROV, L. A. - Melanoidins and carbohydrates in roasted barley. J. Agric. Food Chem. 23 (5) : 960-963 (1975).
40. MOTAI, H. - Color tone of various melanoidins produced from model systems. Agr. Biol. Chem. 37 (7) : 1679-1685 (1973).
41. MOTAI, H. & INOUE, S. - Oxidative browning of melanoidin. I. Conversion of color components of melanoidin produced from the glycine-xylose system. Agr. Biol. Chem. 38 (2) : 233-239 (1974).
42. MOTAI, H. - Relationship between the molecular weight and the color intensity of color components of melanoidin from the glycine-xylose system. Agr. Biol. Chem. 38 (12) : 2299-2304 (1974).
43. MOTAI, H. - Viscosity of melanoidin from a glycine

xylose system. Support for the equation exhibiting a relation between color intensity and molecular weight. J. Agric. Food Chem. 23 (3) : 606-607 (1975).

44. REINEFELD, E. & MUSSAWI - BARAB, M. H. - Molasses coloring materials. Zucker 16 : 322-329 (1963). In: Chem. Abs. 64 : 5282b (1966).
45. REISER, R. F. & WEISS, K. F. - Production of staphylococcal enterotoxins A, B, and C in various media. Appl. Microbiol. 18 (6) : 1041-1043 (1969).
46. REYNOLDS, T. M. & FENWICK, D. E. - Resultados não publicados (1961). In: REYNOLDS, T. M. - Chemistry of nonenzymic browning. I. The reaction between aldoses and amines. In: CHICHESTER, C. O., MRAK, E. M. & STEWART, G. F., ed. Advances in food research. New York, Academic Press, 1963. v.12, p. 1-52.
47. REYNOLDS, T. M. - Resultados não publicados (1962). In: REYNOLDS, T. M. - Chemistry of nonenzymic browning. I. The reaction between aldoses and amines. In: CHICHESTER, C. O.; MRAK, E. M. & STEWART, G. F., ed. Advances in food research.

New York, Academic Press, 1963. v. 12, p. 1-52.

48. REYNOLDS, T. M. - Noenzymic browning. Sugar-amine interactions. In: SCHULTZ, H. W., ed. Symposium on foods: carbohydrates and their roles. Westport The Avi Publishing Co., 1969. p. 219-252.
49. RIPP, B. - Formation of caramel substances in the presence of nitrogenous compounds. Z. Ver. deut. Zucker - Ind. 76 : 627 (1926). In : DANEHY, J.P. & PIGMAN, W. W. - Reactions between sugars and nitrogenous compounds and their relationship to certain food problems. In : MRAK, E. M. & STEWART, G. F., ed. Advances in food research. New York, Academic Press, 1951. v.3, p. 241-290.
50. SCHMIEDEBERG, O. - Arch. exptl. Path. Pharmacol. 39 (1) : 65 (1897). In : DANEHY, J. P. & PIGMAN, W. W. - Reactions between sugars and nitrogenous compounds and their relationship to certain food problems. In : MRAK, E. M. & STEWART, G. F., ed. Advances in food research. New York, Academic Press, 1951. v.3, p. 241-290.
51. SCHWERT, G. W. & KAUFMAN, S. - The molecular size and shape of the pancreatic proteases. J. Biol. Chem. 190 (1) : 807-816 (1951).

52. SELEMENEV, V. F. ; CHIKIN , G. A.; VEISSENBERG, N. V. ;
ZAV'YALOVA , T.A. ; UGLYANSKAYA, V.A. &
SHAMRITSKAYA, I. P. - Structure of melanoidins -
and products of the alkaline decomposition of
invert sugar. Sakh. Prom. 46 (2) : 7-11 (1972)
In : Chem. Abs. 76 : 129152 z (1972).
53. SHADE, A. L. - Significance of serum iron for the
growth, biological characteristics and metabolism
of *S. aureus*. Biochem. Z. 338 : 140-148 (1963).
54. SHAH, R. K. ; SONI, K. P.; CHOKSHI, M. R. & JOSHI, B. C.
Infrared studies of standard and synthetic humic
acids. Chem. Era 12 (5) : 176-178 (1976). In :
Chem. Abs. 86 : 42934n (1977).
55. SHRINER, R. L. & FUSON , R. C. - The systematic
identification of organic compounds. 3. ed. New
York , John Wiley & Sons , 1948. p. 165.
56. STEINER, R. F. - Reversible association processes of
globular proteins. VI. The combination of trypsin
with soybean inhibitor. Arch. Biochem. and
Biophys. 49 : 71-92 (1954).
57. STOLTZENBERG, H. - Die farbstoffe der melasse und
entzuckerungsschlempe. I. Ber. 49:2021-2023 (1916).

58. TAN, T. L. ; WOLFROM, M. L. & LANGER, A. W. , Jr. -
Chemical reactions of amino compounds and sugars.
V.J.Am. Chem. Soc. 72 : 5090-5095 (1950).
59. THEODORE, T. S. & SHADE, A. L. - Growth of
Staphylococcus aureus in media of restricted and
unrestricted inorganic iron availability. J. Gen.
Microbiol. 39 : 75-83 (1965).
60. THEORELL, H. - Sedimentations konstante und
moleculargeiwicht des myoglobins. Biochem. Z.
268 : 46-54 (1934).
61. UNDERWOOD, J. C.; WILLITS, C. O. & LENTO, H. G. -Browning
of sugar solutions. VI. Isolation and
characterization of the brown pigment in maple
sirup. J. Food Sci. 26 : 397 (1961).
62. VELISEK, J. & DAVIDEK, J. - Reactions of glyoxal with
amino acids. I. Formation of brown pigments. Sb.
Vys. Sk. Chem.- Technol. Praze, Potraviny E 46 :
51-65 (1976). In : Chem. Abs. 87 : 51889 a(1977).
63. VILLELA, G. G. ; BACILA, M. & TASTALDI, H. - Técnicas
e experimentos de bioquímica. Rio de Janeiro, Ed.
Guanabara Koogan , 1973. p. 408-410.

64. WARNER, R.C. & WEBER, I. - The cupric and ferric citrate complexes. J. Amer. Chem.Soc. 75 (20): 5086-5094 (1953).
65. WEAST, C.A. & MACKINNEY, G. - Noenzymatic darkening of fruits and fruit products. Ind. Eng. Chem. 33:1408 (1941). In : REYNOLDS, T.M. - Chemistry of monenzymic browning. I. The reaction between aldoses and amines. In : CHICHESTER, C.O. ; MRAX, E.M. & STEWART, G.F. , ed. Advances in food research. New York, Academic Press, 1963 , v.12 , p. 1-52.
66. WHITAKER, J.R. - Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex. Anal. Chem. 35 (12) : 1950-1953 (1963).
67. WILLIAMS, R.C., Jr. & RAJAGOPALAN, T.G.
Ultracentrifugal characterization of pepsin and pepsinogen. J. Biol. Chem. 241 (21) : 4951-4954 (1966).
68. WOLFROM, M.L. ; SCHLICHT, R.C. ; LANGER, A.W., Jr. & ROONEY, C.S. - Chemical interactions of amino compounds and sugars. VI. The repeating unit in brown polymers. J. Am. Chem. Soc. 75 : 1013 (1953)
69. YATSIMIRSKII, K.B. & VASIL'EV, V.P.
Instability constants of complex compounds.
New York, Consultants Bureaus Enterprises, 1960.
p. 69-70 e 86.

RESUMO

Foram estudadas melanoidinas obtidas por reação entre D-glucose e glicina, nas concentrações de 1,25 M e 2,50 M da primeira e 0,66 M e 1,32 M da segunda, nos pH 3,0 e 6,0 e nas temperaturas de 70, 80 e 90° C.

As melanoidinas preparadas em pH 6,0 eram solúveis em água e as obtidas em pH 3,0, pouco solúveis. Todas apresentaram um conteúdo de nitrogênio em torno de 5%, de carbono que variou de 47,8 a 57,8% e de hidrogênio entre 4,5 e 5,7%. O peso molecular das melanoidinas solúveis foi determinado por filtração em gel de Sephadex, variando desde $8,3 \times 10^3$ até acima de cem mil, dependendo das condições de preparação. Espectroscopia no infravermelho e reações químicas, revelaram a presença na molécula de melanoidina de grupos hidroxila, carboxilato, duplas ligações carbono-carbono, CH e provavelmente amina.

Foi demonstrado que a melanoidina solúvel interagia com íons metálicos, sendo determinadas as constantes de estabilidade dos complexos com o Cu^{2+} e o Fe^{3+} , da ordem de 10^7 e 10^4 , respectivamente.

A melanoidina solúvel inibiu o crescimento do *Staphylococcus aureus* S6 e esta inibição não foi devida somente à retirada de algum nutriente dialisável do meio de cultura (como o Fe^{3+}) pela melanoidina, mas dependeu do contato direto deste pigmento com a célula bacteriana.

ABSTRACT

Melanoidins obtained from the reaction between D-glucose and glycine, at concentrations of 1.25 M and 2.50 M of the former and 0.66 M and 1.32 M of the latter, at pH 3.0 and 6.0 and temperatures of 70, 80 and 90° C , were studied.

The melanoidins prepared at pH 6.0 were water soluble, and those obtained at pH 3.0 , poorly soluble. All the melanoidins had a content of nitrogen of about 5%, of carbon between 47.8 and 57.8% and of hydrogen between 4.5 and 5.7%. The molecular weights of the soluble melanoidins were determined by gel filtration on Sephadex, and they varied from 8.3×10^3 to above hundred thousand. Infrared spectroscopy and chemical reactions showed the following groups in the melanoidin molecule: hydroxyl, carboxylate, $>C = C<$ and CH groups and probably amine.

It was demonstrated that the soluble melanoidin interacts with metallic ions, the stability constants with Cu^{2+} and Fe^{3+} being about 10^7 and 10^4 , respectively.

The soluble melanoidin inhibited the growth of the *Staphylococcus aureus* S6 and this inhibition was not caused only by the withdrawal of some dialysed nutrient, such as the Fe^{3+} ion, from the culture medium, but depended on the direct contact of the pigment with the bacterian cell.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor André Tosello, diretor da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Professor Paulo Anna Bobbio, pela dedicação e interesse no trabalho de orientação desta tese.

À Professora Maria A. M. Galeazzi, pela ajuda prestada na experiência de ultracentrifugação em gradiente de sacarose.

À Professora Sonia P. C. de Salzberg, ao Professor Fernando Carlos Pagnocca (UNESP - Rio Claro) e à Senhora Rosa M.T.A. Tosello, pelo auxílio nas experiências realizadas no Laboratório de Microbiologia.

Ao Senhor João C. Tosello, técnico do laboratório, à Sra. Alice C. Bressane e à Sra. Maria P. B. Birolli, funcionárias responsáveis pela limpeza do material do laboratório.

Ao Sr. Valdir Cassiano do Amaral, pela datilografia deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de mestrado e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo custeio parcial da análise elementar das melanoidinas.

A todos que inconscientemente foram omitidos.

Apêndice: Cálculo da constante de estabilidade (K) do complexo melanoidina - íon metálico e do número n de íons metálicos que se ligam a uma molécula de melanoidina.

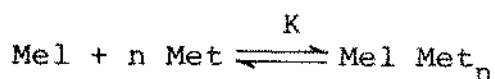
$[Mel]_i$: concentração inicial de melanoidina.

$[Mel]_f$: concentração final de melanoidina.

$[Met]_i$: concentração inicial do íon metálico.

$[Met]_f$: concentração final do íon metálico.

$[Mel Met_n]$: concentração do complexo melanoidina-íon metálico.



$$K = \frac{[Mel Met_n]}{[Mel]_f [Met]_f^n}$$

$$[Mel Met_n] = \frac{[Met]_i - [Met]_f}{n}$$

$$[Mel]_f = [Mel]_i - [Mel Met_n]$$

Cálculo de n:

$$K = \frac{[Mel Met_n]_1}{[Mel]_{f1} [Met]_{f1}^n} = \frac{[Mel Met_n]_2}{[Mel]_{f2} [Met]_{f2}^n}$$

$$\frac{[\text{Met}]_{f1}^n}{[\text{Met}]_{f2}^n} = \frac{[\text{MelMet}_n]_1 [\text{Mel}]_{f2}}{[\text{MelMet}_n]_2 [\text{Mel}]_{f1}}$$

$$n \log \frac{[\text{Met}]_{f1}}{[\text{Met}]_{f2}} = \log \frac{[\text{MelMet}_n]_1 [\text{Mel}]_{f2}}{[\text{MelMet}_n]_2 [\text{Mel}]_{f1}}$$

$$n = \log \frac{[\text{MelMet}_n]_1 [\text{Mel}]_{f2}}{[\text{MelMet}_n]_2 [\text{Mel}]_{f1}} \frac{1}{\log \frac{[\text{Met}]_{f1}}{[\text{Met}]_{f2}}}$$

$$\frac{[\text{Mel}]_{f2}}{[\text{Mel}]_{f1}} = \frac{[\text{Mel}]_{i2} - [\text{MelMet}_n]_2}{[\text{Mel}]_{i1} - [\text{MelMet}_n]_1}$$

$$\frac{[\text{MelMet}_n]_1}{[\text{MelMet}_n]_2} = \frac{\frac{[\text{Met}]_{i1} - [\text{Met}]_{f1}}{n}}{\frac{[\text{Met}]_{i2} - [\text{Met}]_{f2}}{n}} = \frac{[\text{Met}]_{i1} - [\text{Met}]_{f1}}{[\text{Met}]_{i2} - [\text{Met}]_{f2}}$$

$$n = \log \left(\frac{[\text{Met}]_{i1} - [\text{Met}]_{f1}}{[\text{Met}]_{i2} - [\text{Met}]_{f2}} \cdot \frac{[\text{Mel}]_{i2} - \frac{[\text{Met}]_{i2} - [\text{Met}]_{f2}}{n}}{[\text{Mel}]_{i1} - \frac{[\text{Met}]_{i1} - [\text{Met}]_{f1}}{n}} \right) \cdot \frac{1}{\log \frac{[\text{Met}]_{f1}}{[\text{Met}]_{f2}}}$$

$$n = \log \left(\frac{[\text{Met}]_{i1} - [\text{Met}]_{f1}}{[\text{Met}]_{i2} - [\text{Met}]_{f2}} \cdot \frac{n [\text{Mel}]_{i2} - [\text{Met}]_{i2} + [\text{Met}]_{f2}}{n [\text{Mel}]_{i1} - [\text{Met}]_{i1} + [\text{Met}]_{f1}} \right) \cdot \frac{1}{\log \frac{[\text{Met}]_{f1}}{[\text{Met}]_{f2}}}$$

O valor de n é calculado por tentativa, testando - se números inteiros positivos até a obtenção da igualdade.