

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

REAÇÃO DE MAILLARD: PROPRIEDADES
E ESTRUTURA DAS MELANOIDINAS
DA FRUTOSE E GLICINA

Hidetake Imasato
Bacharel em química

Orientador:

Prof. Paulo Anna Bobbio

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.

1979

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A meus pais e
minhas irmãs

ÍNDICE

	<u>Página</u>
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
III. MATERIAIS	
A. Aparelhagem	24
B. Reagentes	24
IV. MÉTODOS	
A. Preparação das melanoidinas	25
B. Medida dos consumos de frutose no preparo das melanoidinas	
1. Isolamento da frutose	26
2. Dosagem da frutose	27
C. Propriedades das melanoidinas	
1. Avaliação do peso molecular das melanoidinas por filtração em gel de Sephadex	27
2. Composição elementar das melanoidinas	
a) Nitrogênio	29
b) Carbono e hidrogênio	29
3. Espectros das melanoidinas	
a) Espectros infravermelho das melanoidinas	29
b) Espectros visível da melanoidina FG-90-6-1	29
c) Espectros ultravioleta da melanoidina FG-90-6-1	30
4. Reações de caracterização de grupos funcionais das melanoidinas	
a) Aminas primárias, secundárias e terciárias com tiocianato de potássio recém fundido	30

b) Aminas primárias e secundárias com disulfeto de carbono	30
c) Fenol por formilação	30
d) Formação de iodofórmio.....	30
e) Metilcetonas por conversão a índigo	30
f) Grupos carbonilas	
i. Reação com hidreto de boro e sódio .	30
ii. a) Reação com hidrogênio nascente: Zn/H^+	30
b) Reação com hidrogênio nascente: Zn/OH^-	31
g) Hidrogenação catalítica	31
5. Acetilação	
a) Com anidrido acético e acetato de sódio	32
b) Com cloreto de acetila e piridina	32
6. Bromação	33
7. Oxidação com permanganato de potássio em meio alcalino	33
8. Determinação de aminas primárias por nitro-sação	34
V. RESULTADOS	
A. Preparação das melanoidinas	35
B. Medidas dos consumos de frutose no preparo das melanoidinas	41
C. Propriedades das melanoidinas	
1. Avaliação dos pesos moleculares das melanoidinas por filtração em gel de Sephadex	42
2. Composição elementar das melanoidinas	44
3. Espectros das melanoidinas	
a) Espectros infravermelho das melanoidinas	45
b) Espectros visível da melanoidina FG-90-6-1	52
c) Espectros ultravioleta da melanoidina FG-90-6-1	53

4. Reações de caracterização de grupos funcionais	
a) Aminas primárias, secundárias e terciárias com tiocianato de potássio	54
b) Aminas primárias e secundárias com dissulfeto de carbono	54
c) Fenol por formilação	54
d) Formação de iodoformio	54
e) Metilcetonas pela conversão e índigo ...	54
f) Grupos carbonilas	
i. Reação com hidreto de boro e sódio .	54
ii. Reação com hidrogênio nascente	56
g) Hidrogenação catalítica	57
5. Acetilação	
a) Com anidrido acético e acetato de sódio	58
b) Com cloreto de acetila e piridina	60
6. Bromação	65
7. Oxidação com permanganato de potássio em meio alcalino	67
8. Determinação de aminas primárias por nitro-sação	71
VI. DISCUSSÃO	72
VII. CONCLUSÕES	81
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
RESUMO	92
ABSTRACT	93
AGRADECIMENTOS	94

I. INTRODUÇÃO

As melanoidinas são produtos escuros de natureza polimérica decorrentes de uma série de transformações iniciadas pela interação de açúcares redutores, por meio da carbonila, com uma amina livre. Esta série de reações é denominada reação de Maillard.

A reação de Maillard, devido ao seu efeito organoléptico e nutricional em inúmeros alimentos industrializados, tem sido objeto de vários estudos.

O presente trabalho visou trazer subsídios para o conhecimento das propriedades e estrutura de melanoidinas obtidas da reação entre frutose e glicina em diferentes condições de temperatura, pH e concentração de reagente.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O emprego do termo melanoidina se deve a SCHMIEDEBERG, que em 1897 (1), assim designou os produtos escuros resultantes da hidrólise ácida ou da decomposição pirolítica das proteínas.

Em 1902, SAMUELY (2) sugeriu que as melanoidinas eram o resultado da interação dos grupos aminas disponíveis das proteínas e dos seus produtos de hidrólise, tais como as peptonas e aminoácidos, com os açúcares. Para esclarecer a sua hipótese, SAMUELY (2), aqueceu glucose com diferentes compostos nitrogenados como o cloreto de amônio, uréia, acetamida, glicina, ácido aspártico, cistina e tirosina. Obteve também melanoidinas a partir do hidrolisado da albumina de soro que apresentaram a seguinte composição elementar:

C - 61,8 %

H - 5,02%

N - 7,1 %

S - 3,8 %

O - 0,22%

O estudo sistemático das melanoidinas teve o seu início com as experiências de MAILLARD, que em 1912 (3), fazendo reagir D-glucose com diversos aminoácidos, concluiu que a carbonila do açúcar prevalecia sobre os grupos alcoólicos na condensação inicial.

Ainda em 1912, MAILLARD (4), usando sistemas-modelo obteve melanoidinas cujos teores de nitrogênio eram de 4,35%, 4,86%, 5,48% e 6,00%. Estes valores eram semelhantes para aquele obtido para o material húmico extraído do solo. MAILLARD (4), cita ainda - que as melanoidinas podiam ser obtidas na ausência de oxigênio, sem a intervenção de microrganismos e sem empregar temperaturas e pressões altas.

MAILLARD em 1913 (5), demonstrou a necessidade de um grupo amínico livre para que ocorresse a reação, produzindo melanoidinas à partir de dipeptídeos e outras peptonas.

STOLTZENBERG em 1916 (6), isolou do melaço de beterraba um pigmento escuro, solúvel em álcalis, ácidos fortes e em solventes orgânicos hidroxilados, com exceção do álcool. O pigmento apresentou a seguinte composição elementar:

C - 54,92%

H - 5,66%

N - 6,60%

O - 32,82%

Aquecendo a 100°C D-glucose e glicina, MAILLARD em 1917 (7), observou que durante o escurecimento gradual da solução, havia desenvolvimento de CO₂ e à partir deste instante verificou a formação de um produto escuro insolúvel em água, parcialmente - solúvel em amônia aquosa e solúvel em solução de hidróxido de sódio ou de potássio. Este produto escuro, isolado, apresentou uma composição elementar semelhante àquela do humo extraído dos solos.

RIPP em 1926 (8), obteve do sistema D-frutose e glicina (4:1) dissolvidas em quatro partes de água, aquecidas a refluxo, um produto insolúvel $C_{12}H_5O_6N$. O produto isolado:

1. não foi passível de acetilação;
2. não reagiu com fenil-hidrazina;
3. reduziu o reagente de Fehling;
4. descorou parcialmente com Zn/OH^- .

O autor obteve ainda melanoidinas reagindo a frutose com outros compostos aminados: ácido aspártico, asparagina, ácido glutâmico, glutamina, hexametileno-tetra-amina e amônia. Todas as melanoidinas apresentavam absorção em toda a extensão do espectro visível, aumentando de intensidade com a diminuição do comprimento de onda da radiação excitante.

AMBLER em 1929 (9), obteve melanoidinas aquecendo a ebulição uma solução aquosa contendo glucose (0,11 mol) e alanina (0,03 mol). As melanoidinas eram compostas de uma fração solúvel e uma outra insolúvel com as seguintes composições elementares:

Fração	Composição elementar (%)			
	C	H	N	O
Insolúvel	60,5	5,3	3,2	31,1
Solúvel	58,4	6,4	3,27	32,1

DU TOIT e PAGE em 1932 (10), determinaram as composições elemen

tares dos pigmentos húmicos isolados do solo, da turfa e do pigmento obtido à partir de glicina e glucose. Os valores obtidos pelos autores estão relacionados a seguir:

Produto	Composição elementar (%)		
	C	H	N
Ácido húmico do solo	56,0	5,1	5,36
Ácido húmico da turfa	50,8	5,4	2,37
Melanoidina (glucose e glicina)	53,1	5,2	5,46

Os autores (10) concluíram, ainda, da necessidade de grupos aminas livres nos compostos precursores da reação de Maillard.

ENDERS e FRIES em 1936 (11), através dos resultados obtidos na determinação do peso molecular pela avaliação do coeficiente de difusão e na determinação da massa equivalente, evidenciaram a semelhança existente entre a melanoidina e o ácido húmico.

ENDERS e THEIS, em 1938 (12), sintetizaram melanoidinas aquecendo a refluxo uma solução aquosa de glicina (2,20 M) e glucose (3,70 M) durante 10 horas. A massa resultante, resfriada, foi lavada com etanol e acetona e secada. As melanoidinas resultantes apresentaram as seguintes propriedades: eram produtos com propriedades tamponantes; não reduziram o reagente de Fehling, porém reduziram diversos indicadores de oxi-redução; apresenta-

ram o potencial de meia onda polarográfica de -1,8 V. Como sólidos ou em soluções concentradas, quando expostas à luz ultravioleta, apresentaram uma fluorescência amarela e azul quando em soluções diluídas. As melanoidinas sintetizadas apresentaram a fórmula mínima $C_{67}H_{76}O_{32}N_5$ com a seguinte distribuição de grupos funcionais por molécula:

5 carboxilas

8 hidroxilas alcoólicas

3 hidroxilas fenólicas

2 carbonilas

e ainda um pequeno número de duplas ligações.

ENDERS, em 1938 (13), obteve da oxidação das melanoidinas, citadas no trabalho de ENDERS e THEIS (12), com ácido nítrico diluído, produtos solúveis em acetona, enquanto com ácido nítrico concentrado obteve os ácidos oxálico, pícrico, glicólico e dihidroxi-benzeno-dicarboxílico e um composto com fórmula $C_5H_{12}O_2N_4$ (P.F. $156^{\circ}C$). As melanoidinas quando tratadas com água oxigenada produziram NH_3 , CO_2 e os ácidos fórmico, glicólico, acético, succínico e tartárico.

SHALYGIN, em 1941 (14), procurou demonstrar a semelhança entre o ácido húmico natural e as melanoidinas sintéticas, através dos produtos da oxidação com ácido nítrico e com permanganato de potássio.

WEAST e MACKINNEY, em 1941 (15), isolaram do damasco seco, pigmentos com a seguinte composição elementar:

C - 53,05 - 53,16%

H - 4,90 - 5,03%

N - 3,25 - 3,26%

e produziram melanoidinas que apresentaram os seguintes teores de nitrogênio:

Sistema		
Aminoácido	Açúcar	Nitrogênio (%)
Asparagina	glucose	5,7 - 5,8
	frutose	7,6 - 7,7
Ácido aspártico	glucose	3,05 - 3,06
	frutose	3,09 - 3,10

ENDERS, em 1943 (16), observou que as melanoidinas obtidas da reação de uma solução aquosa de metilglioxal (2,08 M) e glicina (1,98 M) tinham teores crescentes de carbono e nitrogênio com o decorrer do tempo, enquanto o teor de hidrogênio, praticamente, permaneceu constante. A solubilidade das melanoidinas em água diminuiu com o aumento do tempo de reação. As variações observadas estão resumidas numericamente a seguir:

Tempo de reação (horas)	Material insolúvel (%)	Composição elementar (%)		
		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

ENDERS e FUHLROTT, no ano de 1945 (17), obtiveram melanoidinas a partir da glucose e glicina conforme o procedimento descrito por ENDERS e THEIS (12), porém diminuindo o tempo de reação. Sintetizaram as melanoidinas, também, a partir do metilglioxal como composto carbonílico. As melanoidinas isoladas apresentaram a seguinte composição elementar:

Sistema	Composição elementar (%)		
	C	H	N
Glucose + glicina	47,5	6,3	5,2
Metilglioxal + glicina	49,6	5,5	7,3

Estas melanoidinas mostraram resistência à fusão alcalina e a

sua metilação com iodeto de metila em amônia resultou em uma incorporação de grupos metilas inferior a 2%.

KRETOVICH e TOKAREVA, em 1948 (18), observaram que a sacarose não produziu melanoidina, ao contrário da maltose, concluindo que era necessário uma carbonila livre para a reação de Maillard. Identificaram na mistura de reação aldeídos que consideraram como prováveis intermediários da reação de Maillard.

TAN e colaboradores em 1950 (19), comparando as reações entre D-xilose e glicina e entre 2-furaldeído e glicina, concluíram que o furfural pode ser um precursor na formação de melanoidina do sistema D-xilose-glicina. As condições experimentais usadas pelos autores estão relacionadas abaixo:

Melanoidina	Concentração (molar)		Temperatura (°C)	Tempo (horas)	Método de isolamento
	D-xilose	glicina			
1	0,12	1,24	95	23	A
2	0,999	0,991	95	50	A
3	0,24	0,25	refluxo	40	C
4	0,999	0,991	95	50	C
5	0,12	1,24	95	90	B
	Furfural	glicina			
6	0,12	1,24	95	90	E
7	0,12	1,24	95	20	A
8	0,12	1,24	95	90	D
9	0,12	1,24	95	20	D
10	1,03	0,991	95	55	C
11	0,25	0,25	refluxo	40	C

Método de isolamento:

- A) Precipitação com etanol da mistura de reação dialisada;
- B) Precipitação com dioxano da mistura de reação dialisada;
- C) Filtração;
- D) Centrifugação da mistura de reação dialisada;
- E) Precipitação com dioxano da mistura de reação dialisada e centrifugação.

Todos os produtos foram lavados com etanol, acetona e éter.

As melanoidinas obtidas apresentaram a seguinte composição elementar:

Melanoidina	Composição elementar (%)			
	C	H	O	N
1	54,4	6,40	32,15	7,05
2	55,2	6,89	32,13	5,78
3	57,3	6,43	30,22	6,00
4	57,9	6,65	29,65	5,80
5	58,0	6,86	28,29	6,85
6	59,5	5,86	29,99	4,65
7	62,4	4,55	29,12	3,93
8	63,8	5,29	27,10	3,81
9	64,4	5,19	26,89	3,52
10	65,6	4,86	26,43	3,11
11	66,7	4,99	25,22	3,09

Com exceção das melanoidinas designadas pelos números 3,4 e 10, todas foram solúveis em álcali.

Excetuando-se as melanoidinas 1, 2, 5 e 6, as demais reagiram com o reagente de Folin.

As melanoidinas apresentaram absorção a 320 nm na região do ultravioleta, que juntamente com as bandas a 6200 e 5900 nm no infravermelho foram associadas a duplas ligações. As melanoidinas derivadas do furfural apresentaram uma banda adicional a 280 nm.

WOLFROM e colaboradores, em 1953 (20), usando traçadores radioativos, obtiveram melanoidinas marcadas a partir da glicina com arabinose, D-xilose e D-glucose. Os autores deduziram as seguintes fórmulas empíricas para as unidades repetitivas das frações solúveis não dialisáveis: $C_{6,0}H_{6,4}O_{2,0}N_{1,0}(CH_2)(CO_2H)_{0,5}$ e $C_{5,0}H_{4,7}O_{1,5}N_{0,8}(CH_2)(CO_2H)_{0,3}$, respectivamente, para as hexoses e para as pentoses.

Estes resultados levaram os autores (20) a concluir que a reação se dava entre quantidades equimolares de aminoácido e açúcar com a perda de 3 moléculas de água e descarboxilação parcial dos aminoácidos, porém sem a ruptura das moléculas dos açúcares.

CARSON e OLCOTT em 1953 (21), obtiveram pigmentos solúveis em água a partir de soluções de acetaldeído e várias aminas alifáticas e amônia em tampão fosfato (pH 6-7), nas temperaturas entre 3-25°C. Os pigmentos mostraram-se solúveis em metanol e et

nol e insolúveis em éter, acetona e acetato de etila; não reduziram o reagente de Fehling; a titulação potenciométrica indicou que menos da metade do nitrogênio total era básico e que a forma provável de ligação para o nitrogênio não titulável seria

$C = N$. Estes pigmentos apresentaram absorção a 272-277 nm, em solução metanólica, diminuída pela adição de álcali. Por outro lado, a hidrogenação catalítica sobre óxido de platina e paládio em carvão não afetou a cor do pigmento. A reação com hidreto de boro e sódio não alterou apreciavelmente a cor. A melanoidina sintetizada da etilamina apresentou um ponto isoelétrico superior a 9,2.

Em 1957 (22), BINKLEY, obteve a seguinte composição elementar para o pigmento isolado do melaço de cana: C = 47,33%, H = 6,04%, N = 3,16% e O = 36,00%, sugerindo a seguinte unidade repetitiva: $C_{17-18}H_{26-27}O_{10}N$.

BINKLEY em 1958 (23), utilizando condições que favoreceriam a adição de bromo, avaliou de 1,6 a 1,8 insaturações por unidade repetitiva no pigmento do melaço de cana e observou uma diminuição da cor em 72%, concluindo serem as insaturações um dos cromóforos.

No mesmo ano, 1958 (24), BINKLEY determinou de 4 a 6 grupos hidroxilas por unidade repetitiva, acetilando o pigmento do melaço de cana em BF_3-Ac_2O . A existência de uma carbonila para cada 5 unidades repetitivas foi determinada por oximação com metoxilamina.

BINKLEY em 1960 (25), avaliou o peso molecular em 15000, pela medida da difusão do pigmento do melaço de cana através da membrana de diálise.

BINKLEY em 1960 (26), do resultado difusométrico do pigmento do melaço de cana, inferiu ser o pigmento um polímero semelhante a um novelo aleatório. O peso molecular determinado por viscosimetria e ultracentrifugação foi de 27000 ± 1000 .

UNDERWOOD e colaboradores em 1961 (27), isolaram o corante contido no xarope de bordo usando resina de troca iônica. O produto apresentou a seguinte composição elementar: C = 48,5%, H = 6,8%, N = 3,6% e O = 41,1%. O espectro infravermelho apresentou banda forte de OH, fraca de CH e outras características de grupos carboxilatos. O produto obtido a partir do xarope acidificado, apresentou um enfraquecimento das bandas correspondentes aos grupos carboxilatos no espectro infravermelho, porém não surgiram bandas relativas às carboxilas. Este material tinha a seguinte composição elementar: C = 47,8%, H = 6,0%, N = 3,1% e O = 43,1%. O espectro ultravioleta apresentou absorção crescente com a diminuição do comprimento de onda, especialmente para valores inferiores a 250 nm.

ADRIAN em 1963 (28), preparou melanoidinas a partir de soluções contendo glucose (1,11 M) e aminoácidos (0,1 M), em diferentes concentrações de NaOH e HCl. Observou que o desenvolvimento de cor foi maior para NaOH 1-2 N, porém foi também intensa a caramelização. Em soluções ácidas, obteve melanoidinas na forma de precipitados com teores baixos de nitrogênio, exceto quando usou a

metionina como aminoácido. Usando outras substâncias, diferentes da glucose, observou que o consumo de aminoácidos foi maior com as pentoses, diminuindo com as hexoses e menor com a sacarose , enquanto que os polióis não reagiram.

REINEFELD e BARAB observaram em 1963 (29), que a fração de maior peso molecular, das melanoidinas isoladas do melaço de beter raba, era um colóide esférico de elevado poder corante.

CLARK e TANNEBAUM em 1970 (30), estudaram o produto, que designaram como pigmento-peptídeo-limite, obtido da hidrólise enzimática do pigmento isolado de um sistema contendo caseína e gluco se. O espectro visível mostrou absortividade crescente com a di minuição do comprimento de onda. A acidificação provocou um de-crêscimo na absorção no visível, ao contrário da adição de álca-li que aumentou a absorção. A alcalinização ou a acidificação - deslocaram a banda a 270 nm do espectro ultravioleta para uma região de menor energia, além de intensificar a absorção. O espectro infravermelho era característico de açúcares e proteí-nas, exceto a banda correspondente à carbonila, que era mais in tensa. O pigmento-peptídeo-limite apresentou a seguinte reativi-dade:

Reagente	Branqueamento	Peso molecular
H ₂ O ₂ quente	Completo	Diminuiu
NaBH ₄ (temp.ambiente)	45%	Pequena alteração
NaOCl	—	Diminuiu e aumentou a dispersão
1.NaOCl;2.NaBH ₄	90%	—
1.NaBH ₄ ;2.NaOCl	95%	—

KHARIN e colaboradores em 1971 (31), mediram por difusometria o diâmetro das melanoidinas obtidas aquecendo a refluxo, durante 10 horas, uma solução de glucose (2,6 M) e glicina (1,3 M). Os autores concluíram que, aproximadamente, 70% das melanoidinas tinham diâmetros de 0,73 a 4,21 nm e o restante, diâmetros superiores a 4,21 nm.

SELEMENEV e colaboradores em 1972 (32), verificaram por eletroforese que as melanoidinas obtidas do açúcar invertido eram constituídas por 13 frações: 2 carregadas positivamente e 11 com cargas negativas. Associaram as bandas do espectro infravermelho aos grupos amina, carboxila, carbonila, hidroxila e às insaturações.

AGARWAL e colaboradores em 1974 (33), identificaram nos espectros infravermelho das melanoidinas obtidas da reação de glucose com β-alanina, glicina, ácido γ-aminobutírico e asparagina, bandas características de duplas ligações carbono-carbono conjugadas a carbonilas, β-dicetonas e hidroxicetonas α, β-insaturadas.

Associaram as bandas a $3500-3400\text{ cm}^{-1}$ aos estiramentos NH assimétrico e simétrico. As melanoidinas obtidas da β -alanina absorveram a $665-800\text{ cm}^{-1}$ que os autores associaram às vibrações oscilantes fora do plano dos grupos NH de amidas primárias e secundárias.

BINKLEY em 1974 (34), caracterizou os grupos -OH, CH, C = O e íons "Zwitter" por espectroscopia infravermelha e empregando ^{14}C e ^3H inferiu que os aminoácidos sofreram condensação e descarboxilação durante a polimerização do pigmento isolado do melão de cana.

YOUNG e colaboradores em 1974 (35), obtiveram por filtração em gel, a seguinte distribuição de peso molecular para as melanoidinas obtidas aquecendo glucosaminas:

$$k_d = 1,537 - 0,481 \log M$$

onde, k_d - coeficiente de distribuição;

M - peso molecular.

A filtração em gel revelou também a existência de material não melanoidínico de alto peso molecular.

MOTAI e INOUE em 1974 (36), sintetizaram melanoidinas aquecendo a 100°C por 2 horas uma solução aquosa contendo glicina (0,2 M) e xilose (0,2 M). Estas melanoidinas eluídas de uma coluna de celulose DEAE com tampões de acetato contendo quantidades crescentes de cloreto de sódio, forneceram 8 frações. Das análises dos espectros infravermelho, das composições elementares, das distribuições do peso molecular e do aquecimento destas frações

em condições anaeróbicas, os autores concluíram que as frações eram resultantes do escurecimento oxidativo e constituíam uma série homóloga de polímeros.

MOTAI em 1974 (37), verificou que os coeficientes de distribuição, k_d , em gel de dextrana das frações acima citadas obedeciam a uma relação linear em função do logaritmo da absorção a 450 nm das soluções a 1% das respectivas frações.

$$k_d = a \log A + b$$

e como:

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

que resultam:

$$\underline{A = k_1 \cdot M^{\alpha_1}} \quad (I)$$

$$\text{onde, } \alpha_1 = \frac{a'}{a}$$

$$k_1 = 10^{\frac{b'-b}{a}}$$

M = peso molecular.

para a absortividade molar, MOTAI (37) obteve:

$$a = k_1 \cdot M^{\alpha_1 + 1}$$

O valor de α_1 é um parâmetro que representa a estabilidade das melanoidinas quanto ao escurecimento oxidativo, isto é, para um mesmo grau de escurecimento, um menor valor de α_1 será acompanhado de uma maior polimerização. O autor, ainda, verificou que o

valor de α_1 era diretamente proporcional, enquanto o valor k_1 era inversamente proporcional ao peso molecular do composto amínico.

Em 1976, MOTAI (38), obteve uma equação experimental que relacionava as absorbâncias das soluções a 1% das frações das melanoidinas obtidas pelo autor e INOUE (36) e as respectivas viscosidades intrínsecas (η):

$$\underline{A = k_2 (\eta)^{\alpha_2}} \quad (II)$$

Comparando as equações (I) e (II), o autor obteve uma equação (III) similar à de Staudinger que é válida, somente, para uma série homóloga de polímeros.

$$\underline{(\eta) = k_3 M^{\alpha_3}} \quad (III)$$

O coeficiente α_3 representa a expansão linear de uma molécula enrolada aleatoriamente e provavelmente a flexibilidade da cadeia que aumenta na ordem inversa de α_3 . A ausência de rotação óptica na análise da dispersão óptica rotatória, levou MOTAI (41) a concluir que as melanoidinas formam uma série homóloga de polímeros de cadeias simetricamente flexíveis.

BARBETTI e CHIAPPINI em 1976 (39), fracionaram por ultrafiltração e filtração em gel, as melanoidinas preparadas aquecendo a refluxo uma solução aquosa de glucose (0,33 M) e glicina (0,33 M). Os autores submeteram uma amostra da mistura, após 24 horas de

reação, à ultrafiltração usando diferentes membranas filtrantes e obtiveram as seguintes frações:

Fração	Peso molecular
U_1	1000 - 10000
U_2	10000 - 100000
U_3	> 100000

As frações citadas acima e mais as amostras colhidas em diferentes tempos, foram cromatografadas em uma coluna de peneira molecular. Os autores obtiveram o fracionamento das amostras onde as frações U_1 e U_3 eram homogêneas e a U_2 era heterogênea, constituída de duas porções de pesos moleculares diferentes. A seguir estão relacionadas as constituições das amostras da mistura de reação colhidas em diferentes tempos:

Tempo de reação (horas)	Frações (peso molecular crescente)				
	D	C	B	E	A
24	+	+	+	-	+
48	+	+	-	-	+
72	+	+	+	+	+
96	+	+	++	++	+
120	-	++	+	-	+

Abaixo estão resumidas as frações e as respectivas bandas de absorção no ultravioleta:

Espectro	Bandas (nm)			Frações
I	-	290	-	A(24), A(48) A(72), B(72), E(72) A(96), B(96), C(96), E(96) A(120), C(120) U ₃
II	255	-	-	B(24), D(24) D(48), B(120), U ₁
III	255	-	320	C(24)
IV	255	290	-	C(48), C(72), U ₂

As bandas a 255 . 290 nm foram associadas a carbonila conjugada a 1 ou 2 duplas ligações.

As frações U₁, U₂ e U₃ e a mistura reativa após 24 horas de reação, liofilizadas, apresentaram espectros infravermelho semelhantes onde foram identificadas bandas de absorção que foram atribuídas aos seguintes grupos:

Banda (cm^{-1})	Grupos
3400 (Forte)	OH ligado
2320 (Forte)	$\text{C} = \overset{+}{\underset{ }{\text{N}}} - \text{H}$
2100 (Forte)	$\text{C} = \overset{+}{\underset{ }{\text{H}}} - \text{H}$
1600	C = O ligado
1550	C = C, C = N, N = N de heterocíclicos (pirróis, pirazinas, pirimidinas)
1500	$-\text{CO}_2^-$
1380	$-\text{CO}_2^-$
1300	ROH (estiramento OH)
1020-1050	ROH (estiramento CO)

Em um trabalho subsequente, ainda em 1976, BARBETTI e CHIAPPINI (40), oxidaram com permanganato/carbonato de potássio e com ácido acético/água oxigenada aquelas melanoidinas obtidas após 24 horas de reação (39). Dos produtos da oxidação foram isolados os ácidos glicólico, oxálico, malônico, succínico, glutárico e 2,5-furano-dicarboxílico, todos identificados por cromatografia de camada delgada em sílica gel e por cromatografia gasosa dos respectivos derivados ésteres metílicos. Dos resultados obtidos os autores (40) concluíram que:

1. Existiam um ou mais grupos metilênicos, interrompendo a policonjugação na cadeia ou nas ramificações;

2. É provável a participação do hidroximetil-furfural como um dos intermediários na reação de Maillard.

GOMYO e HORIKOSHI em 1976 (41), obtiveram melanoidinas aquecendo a 95°C, durante 36 horas, uma solução aquosa contendo glicina (2 M), glucose (2 M) e NaHCO_3 (0,2 M). Estas melanoidinas, isoladas por precipitação com ácido clorídrico, tiveram o peso molecular estimado em 1×10^5 por filtração em gel (Bio-Gel P-300). A titulação com NaOH, das melanoidinas, indicou a existência de 500 prótons por mol de melanoidina. A análise elementar sugeriu a existência de 4420 átomos de carbono, 5100 de hidrogênio, 2230 de oxigênio e de 450 de nitrogênio por mol de melanoidina. Os autores, tendo em vista os resultados acima mencionados, concluíram que os prótons tituláveis eram provenientes dos grupos carboxilas dos resíduos de aminoácidos, uma vez que observaram que o pH da inflexão era entre os valores 3 e 4 na titulação das melanoidinas. Dos estudos feitos da interação das melanoidinas com cátions metálicos estimaram as estabilidades dos complexos e os números de íons quelados para o Fe^{3+} e Cu^{2+} .

MEYBECK em 1977 (42), analisou por métodos instrumentais as melanoidinas sintetizadas aquecendo a refluxo, durante 24 horas, soluções aquosas contendo quantidades equimolares (2 e 4 M) de di-hidroximetil-cetona e diversos aminoácidos. Todas as melanoidinas apresentaram espectros ultravioleta semelhantes que não foram alterados pela adição de NH_4OH . Apresentaram uma banda a 320 nm. Os aminoácidos com anel aromático, fenilalanina e tirosina, produziram melanoidinas com bandas adicionais a 260 e 270 nm. A alcalinização na síntese de algumas melanoidinas nada afectou o aspecto geral do espectro infravermelho. Todas as mela -

noidinas absorveram a 3400, 1600 e 1400 cm^{-1} . As melanoidinas sintetizadas a partir de α -aminoácidos com cadeia lateral longa, lisina, leucina e valina e os obtidos de aminoácidos não vicinais, ácido 4-aminobutírico apresentaram bandas a 2930 e 2860 cm^{-1} características de cadeias hidrocarbônicas. As melanoidinas da alanina apresentaram uma banda a 2970 cm^{-1} atribuída a grupos metílicos. Nas melanoidinas de aminoácidos não vicinais foram identificadas uma banda a 1700 cm^{-1} que o autor relacionou a carboxilas. Aminoácidos com anel aromático produziram bandas a 750 e 700 cm^{-1} características de grupo aromático. Uma banda a 1300 cm^{-1} foi relacionada ao grupo metilênico da melanoidina da glicina que apresentou a seguinte composição elementar:

C - 46,7%

H - 5,5%

N - 8,4%

O - 39,4%

O espectro de ressonância do spin eletrônico revelou um comportamento paramagnético das melanoidinas obtidas da glicina. O autor encontrou evidências de ser tal propriedade inerente às moléculas de melanoidina e resultante de uma estrutura composta de insaturações altamente conjugadas.

LEITE em 1979 (43), assumindo que as melanoidinas obtidas da reação envolvendo glucose e glicina eram globulares, obteve um peso molecular por filtração em gel de 8300, usando como padrões proteínas globulares. Este valor esteve de acordo com o obtido por ultracentrifugação: 8500 ± 500 .

III. MATERIAIS

A. Aparelhagem

1. Espectrofotômetro visível e ultravioleta:
 - a) Varian Tectrom, modelo 635D;
 - b) Pye Unicam, modelo SP8000.
2. Espectrofotômetro infravermelho:
 - a) Pye Unicam, modelo SP1000;
 - b) Perkin-Elmer, modelo 180.
3. Potenciômetro:
 - a) Metrohm Herisau, modelo E-512 com eletrodo combinado de vidro Metrohm Herisau, modelo AG-9100;
 - b) Orion, modelo 701.
4. Cromatôgrafo de gás Pye Unicam, modelo 64, série 104.
5. Hidrogenador de Brown, Delmar Scientific Laboratories.
6. Banho de água termostatzado ($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) com agitação B. Braun Melsugen.
7. Espectrofotômetro de ressonância magnética nuclear Varian modelo T60.

B. Reagentes

Foram empregados reagentes puros das marcas Baker, Carlo Erba, Fisher Scientific Co., Merck, Pharmacia e Sigma.

IV. MÉTODOS

A. Preparação das melanoidinas

As melanoidinas foram preparadas em frascos de Erlenmeyer aquecidos em banho de água termostatizado empregando diferentes combinações de temperatura, concentrações de frutose e glicina e pH. Os reagentes foram dissolvidos em tampão citrato 0,05 M.

TABELA 1 - Preparação das melanoidinas. Condições experimentais e siglas das melanoidinas obtidas.

Melanoidina	Temperatura (°C)	Concentração (M)		pH
		Frutose	Glicina	
FG-70-3-1	70,0	1,25	0,66	3,0
FG-70-6-1				6,0
FG-70-3-2		2,50	1,32	3,0
FG-70-6-2				6,0
FG-80-3-1	80,0	1,25	0,66	3,0
FG-80-6-1				6,0
FG-80-3-2		2,50	1,32	3,0
FG-80-6-2				6,0
FG-90-3-1	90,0	1,25	0,66	3,0
FG-90-6-1				6,0
FG-90-3-2		2,50	1,32	3,0
FG-90-6-2				6,0

Para cada preparação foi utilizado um frasco controle contendo frutose nas mesmas condições de concentração, temperatura e pH.

Periodicamente foram feitas medidas das absorbâncias das soluções a 450 nm e quando necessário os pH foram corrigidos para os valores iniciais.

As figuras 1 e 2 representam os gráficos das absorbâncias medidas a 450 nm em função do tempo de reação. A tabela 3 relaciona as absorbâncias finais dos frascos controles medidas a 450 nm. As melanoidinas insolúveis em água foram purificadas por filtração e lavagem com água.

As melanoidinas solúveis foram isoladas, após diálise contra água da mistura de reação através de uma membrana de celofane, evaporando a fração não dialisável em evaporador rotatório sob pressão reduzida a 50°C.

Os produtos foram dessecados a vácuo sobre sílica gel.

As tabelas 4 e 5 relacionam os rendimentos das preparações das melanoidinas.

B. Medida dos consumos de frutose no preparo das melanoidinas

1. Isolamento da frutose

A frutose foi isolada da mistura de reação por cromatografia ascendente em papel, usando como sistema de solvente propanol, ácido fórmico e água na proporção 8:1:2. A região correspondente à frutose foi cortada e o açúcar eluído com água.

Da mesma forma foi construída a curva padrão usando soluções padrões de frutose.

2. Dosagem da frutose

A frutose eluída foi dosada segundo o método descrito por SOMOGYI (43) e NELSON (44).

A tabela 6 relaciona os consumos da frutose no preparo das melanoidinas.

C. Propriedades das melanoidinas

1. Avaliação do peso molecular das melanoidinas por filtração em gel de Sephadex

a) Características da coluna:

i. Fase estacionária:

Natureza: Sephadex G-100 fino;

Quantidade: 4,5 g (peso seco).

ii. Dimensões:

Altura: 30,6 cm;

Diâmetro: 1,8 cm.

b) Amostras:

TABELA 2 - Avaliação do peso molecular das melanoidinas por filtração em gel de Sephadex. Quantidade de amostra aplicada na coluna e solvente usado na eluição.

Amostra	Peso (mg)	Solvente
i. Melanoidina		
FG-70-6-1	1,5	Tampão acetato 0,01 M, pH 5,0
FG-70-6-2	1,5	Tampão acetato 0,01 M, pH 5,0
FG-80-6-1	1,5	Tampão acetato 0,01 M, pH 5,0
FG-80-6-2	1,5	Tampão acetato 0,01 M, pH 5,0
FG-90-6-1	1,5	Tampão acetato 0,01 M, pH 5,0
FG-90-6-2	1,5	Tampão acetato 0,01 M, pH 5,0
ii. Padrões		
Pepsina	1,0	Tampão acetato 0,01 M, pH 5,0
Tripsina	1,0	Tampão acetato 0,01 M, pH 5,0
α -quimotripsina	1,0	Tampão acetato 0,01 M, pH 5,0
Azul de dextrana	0,5	Tampão acetato 0,01 M, pH 5,0
Mioglobina	1,0	Tampão TRIS 0,1 M, pH 8,0 contendo NaCl 1 M
Tripsina	1,0	Tampão TRIS 0,1 M, pH 8,0 contendo NaCl 1 M
Albumina	1,0	Tampão TRIS 0,1 M, pH 8,0 contendo NaCl 1M

c) Eluição:

- i. Velocidade de eluição: $3 \text{ ml/cm}^2 \cdot \text{h}$
- ii. Volume dos eluatos: 1 ml
- iii. Detecção da saída das amostras: medida espectrofotométrica das absorbâncias:
 - melanoidinas a 290 nm
 - proteínas e azul de dextrana a 280 nm

A tabela 7 relaciona os valores obtidos para a calibração da coluna de Sephadex e a tabela 8 os pesos moleculares das melanoi-
dinas solúveis.

2. Composição elementar das melanoidinas

a) Nitrogênio:

A porcentagem de nitrogênio das melanoidinas foi determinada empregando o método descrito por KOCH e McMEEKIN (45) (Tabela 9).

b) Carbono e hidrogênio:

Os teores de carbono e hidrogênio foram determinados pelo "Alfred Bernhardt Analytische Laboratorien" (RFA) (Tabela 9).

3. Espectros das melanoidinas

a) Espectros infravermelho das melanoidinas:

Os espectros infravermelho das melanoidinas foram obtidos com as amostras na forma de pastilhas de KBr (Figuras 3 a 15).

b) Espectros visível da melanoidina FG-90-6-1:

Foram obtidos os espectros de soluções da melanoidina FG-90-6-1 a 0,18% em água, NaOH 0,5 N e HCl 0,5 N (Figura 16).

c) Espectros ultravioleta da melanoidina FG-90-6-1:

Foram obtidos os espectros de soluções da melanoidina FG-90-6-1 a 0,05% em água, NaOH 0,8 N e HCl 0,8 N (Figura 17).

4. Reações de caracterização de grupos funcionais das melanoidinas

a) Aminas primárias, secundárias e terciárias com tiocianato de potássio recém fundido, FEIGL (46a).

b) Aminas primárias e secundárias com dissulfeto de carbono, FEIGL (46b).

c) Fenol por formilação, FEIGL (46c).

d) Formação de iodofórmio, SHRINER e FUSON (47a).

e) Metilcetonas por conversão a índigo, FEIGL (46d).

f) Grupos carbonilas:

i. Reação com hidreto de boro e sódio:

Sessenta mililitros de uma solução aquosa alcalinizada (pH 10) contendo 50 mg da melanoidina FG-90-6-1 foram tratados com 3,0 g de hidreto de boro e sódio sob agitação durante 120 horas. Destruído o excesso de reagente com ácido clorídrico diluído, a solução foi dialisada através de uma membrana de celofane contra água. A fração não dialisável foi evaporada sob pressão reduzida a 50°C. Do produto seco foi obtido o espectro infravermelho (Figura 13).

ii. a) Reação com hidrogênio nascente: Zn/H^+

Vinte miligramas da melanoidina FG-90-6-1 em 100

ml de água destilada acidulados com 5 ml de HCl a 37%, foram tratados com 1 g de zinco em pó, com agitação. De tempos em tempos foram medidas as absorbâncias do sobrenadante a 450 nm (Figura 19). Completados 90 minutos de reação, o sobrenadante foi dialisado através de uma membrana de celofane contra água. Do material não dialisável seco foi obtido o espectro infravermelho - (Figura 20).

b) Reação com hidrogênio nascente: Zn/OH^-

Vinte miligramas da melanoidina dissolvidos em 100 ml de água destilada alcalinizada com 6,6 ml de NaOH a 30%, foram tratados com 1 g de zinco em pó, com agitação. Até serem completados 90 minutos de reação, foram feitas medidas das absorbâncias do sobrenadante a 450 nm (Figura 19). Após aquele tempo foram adicionados mais 1 g de zinco e a reação continuada por mais 810 minutos, no fim dos quais foi feita a medida da absorbância do sobrenadante a 450 nm (Figura 19).

g) Hidrogenação catalítica:

Um grama de melanoidina FG-90-6-1, dissolvido em 20 ml de água destilada, foi submetido à hidrogenação catalítica pela sua adição controlada sobre 6 g de catalisador (platina dispersa a 30% em carvão ativo) suspenso em água. O sobrenadante, separado por filtração, foi evaporado sob pressão reduzida e a 40°C. Do material seco foi obtido o espectro infravermelho (Figura 21).

O hidrogênio foi gerado em uma câmara contendo ácido acético glacial sobre o qual foi adicionado automaticamente, à medida que o hidrogênio era consumido, uma solução de hidreto de boro e sódio.

5. Acetilação

a) Com anidrido acético e acetato de sódio:

Quinhentos miligramas da melanoidina FG-90-6-1 foram acetilados segundo o procedimento descrito por SHRINER e FUSON (47b). Foi obtido o espectro infravermelho (Figura 22).

b) Com cloreto de acetila e piridina:

Cinco gramas da melanoidina FG-90-6-1 foram suspensos em 50 ml de piridina e resfriado em banho de gelo. A esta solução foram adicionados 22 ml de cloreto de acetila. Após 12 horas à temperatura ambiente, o excesso de cloreto de acetila foi destruído com uma solução de bicarbonato de sódio. A piridina foi eliminada por lavagem do precipitado com uma solução diluída de ácido clorídrico. O produto foi filtrado e secado sobre pentóxido de fósforo à vácuo. Do produto foram obtidos os espectros infravermelho (Figura 23) e de ressonância magnética nuclear (Figura 24). A solubilidade foi testada em vários solventes e os resultados estão na tabela 10.

Os grupos O-acetilas foram determinados usando o método de Kunz descrito por WHISTLER e WOLFROM (48), porém à temperatura ambiente e após 12 horas de saponificação.

6. Bromação

Uma solução contendo 9,92 mg de melanoidina solúvel foi tratada com 5 ml de água de bromo saturada, na temperatura ambiente em um tubo fechado e na ausência de luz. Após 5 horas de reação, foi determinado o excesso de bromo, tratando uma alíquota de 4 ml da solução remanescente com 5 ml de iodeto de potássio 1 N e 5 ml de tampão acetato (10 g de acetato de sódio tri-hidratado, 10 ml de ácido acético glacial e 80 ml de água). O iodo desenvolvido foi titulado com uma solução padrão de tiosulfato de sódio 0,00753 N.

Foi feito um branco em que a melanoidina foi substituída por água destilada.

As tabelas 12 e 13 relacionam os resultados obtidos. Do produto bromado seco foi obtido o espectro infravermelho (Figura 25).

7. Oxidação com permanganato de potássio em meio alcalino

Cinco gramas da melanoidina FG-90-6-1 e 35 g de permanganato de potássio foram dissolvidos em 200 ml de água e o pH elevado a 10 com hidróxido de sódio. Após uma semana em repouso a 0°C, o excesso de reagente foi destruído com sulfito de sódio e o dióxido de manganês resultante foi separado por filtração. O filtrado foi submetido à seguinte sequência de tratamentos:

- i. Extração com éter etílico;
- ii. acidulação com ácido clorídrico e extração com éter etílico;
- iii. extração com acetato de etila.

Os extratos obtidos em ii. e iii. foram secados sobre sulfato de sódio anidro e os solventes evaporados sob pressão reduzida.

Dos ácidos obtidos foram preparados os ésteres metílicos por reação com diazometano. Os ésteres foram submetidos à cromatografia em fase gasosa nas seguintes condições experimentais:

- i. coluna de adipato de polietileno glicol a 10% em Chromosorb W (HP), 4x1500 mm;
- ii. temperaturas:
 - coluna: inicial - 50°C
 - final - 190°C
 - programação - 4°C/min
 - isoterma a 190°C-50 minutos;
 - detector 215°C;
 - injector 108°C;
- iii. gás de arraste - nitrogênio - 30 ml/min.

Os tempos de retenção foram comparados com padrões de ésteres metílicos e a identificação confirmada cromatografando-se a mistura dos ésteres dos ácidos obtidos contendo o padrão (Figuras 26 a 29).

8. Determinação de aminas primárias por nitrosação

A melanoidina FG-90-6-1 foi tratada com nitrito de sódio e ácido acético e o nitrogênio desenvolvido foi medido segundo o procedimento descrito por VAN SLYKE (49).

V. RESULTADOS

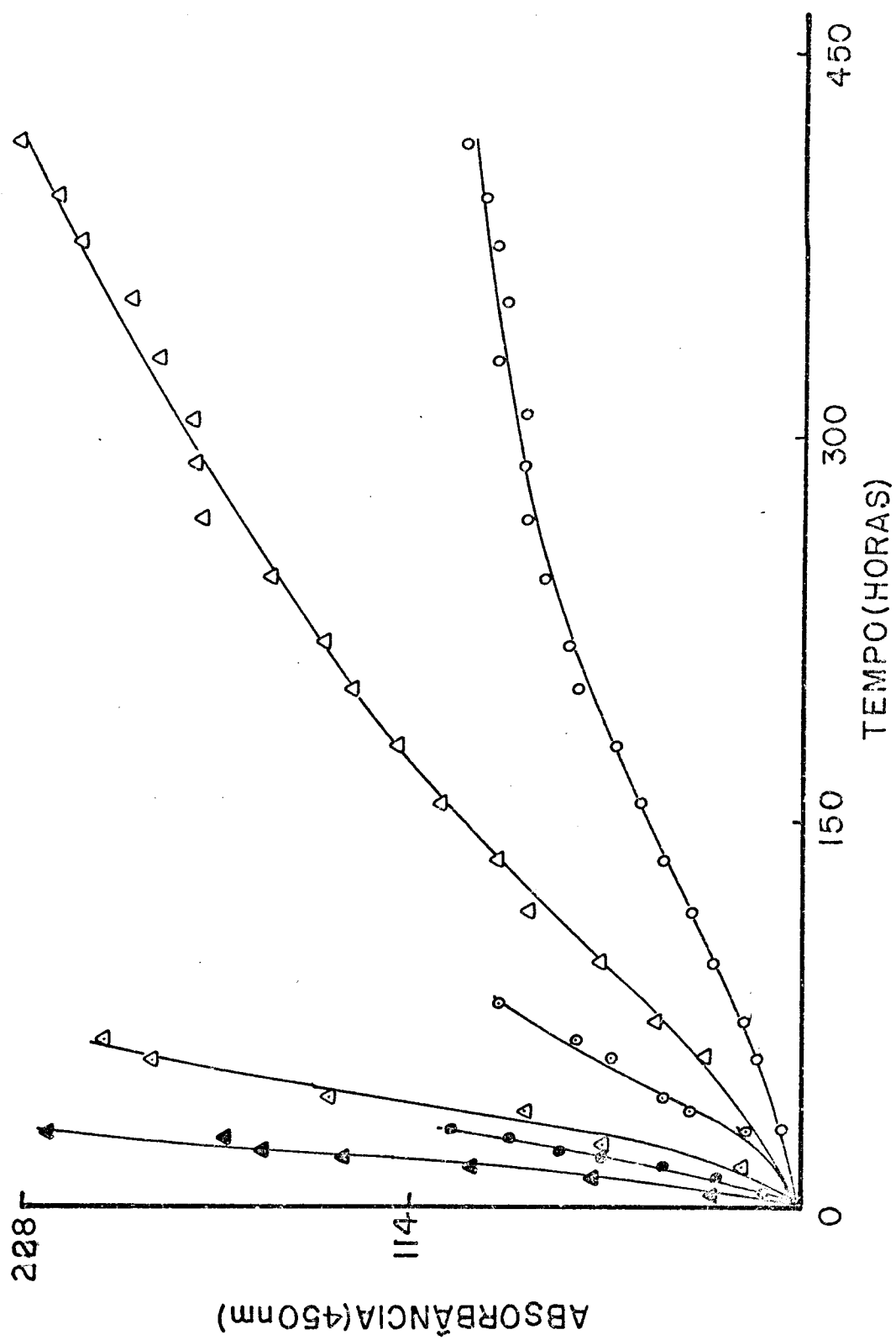
A. Preparação das melanoidinas

FIGURA 1 - Preparação das melanoidinas a pH 6,0. Absorbâncias das misturas de reação medidas a 450 nm em função do tempo de reação.

FG-70-6-1 (○); FG-70-6-2 (△);

FG-80-6-1 (◉); FG-80-6-2 (▲);

FG-90-6-1 (●); FG-90-6-2 (▲).



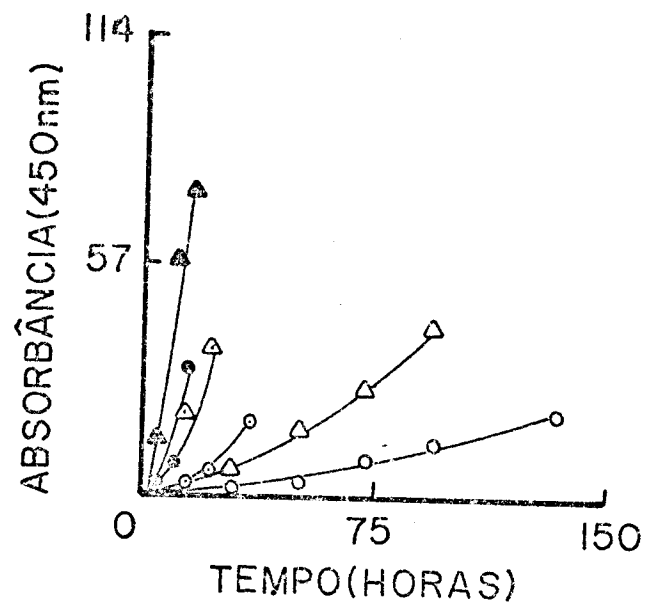


FIGURA 2 - Preparação das melanoidinas a pH 3,0. Absor**u** bâncias das misturas de reação medidas a 450 nm em função do tempo de reação.

FG-70-3-1 (○); FG-70-3-2 (Δ);

FG-80-3-1 (◉); FG-80-3-2 (Δ);

FG-90-3-1 (●); FG-90-3-2 (▲).

TABELA 3 - Preparação das melanoidinas. Absorbâncias finais dos frascos controle, medidas a 450 nm.

Sistema	A(450 nm)
FG-70-6-1	7,60
FG-70-6-2	21,9
FG-80-6-1	8,90
FG-80-6-2	17,0
FG-90-6-1	11,0
FG-90-6-2	19,7
FG-70-3-1	2,76
FG-70-3-2	3,68
FG-80-3-1	0,528
FG-80-3-2	0,670
FG-90-3-1	0,382
FG-90-3-2	0,596

TABELA 4 - Preparação das melanoidinas a pH 6,0. Rendimentos em melanoidina solúvel em água não dialisável através de uma membrana de celofane com relação a quantidade inicial de frutose (n_1), de glicina (n_2) e de frutose mais glicina (n_3).

Melanoidina	%		
	n_1	n_2	n_3
FG-70-6-1	6,4	28,9	5,2
2	3,9	17,8	3,2
FG-80-6-1	4,9	22,2	4,0
2	6,3	28,4	5,1
FG-90-6-1	6,3	28,6	5,2
2	7,4	34,2	6,2

TABELA 5 - Preparação das melanoidinas a pH 3,0. Rendimentos das melanoidinas insolúveis em água com relação a quantidade inicial de frutose (n_1), glicina (n_2) e frutose mais glicina (n_3).

Melanoidina	%		
	n_1	n_2	n_3
FG-70-3-1	2,6	11,9	2,2
2	6,4	28,9	5,2
FG-80-3-1	1,2	5,6	1,0
2	4,5	20,4	3,7
FG-90-3-1	0,88	4,0	0,7
2	3,5	15,8	2,8

B. Medidas dos consumos de frutose no preparo das melanoidinas

TABELA 6 - Medidas dos consumos de frutose no preparo das melanoidinas.

Melanoidina	Consumo (%)
FG-70-3-1	36
2	28
FG-80-3-1	16
2	37
FG-90-3-1	22
2	27
FG-70-6-1	30
2	37
FG-80-6-1	34
2	41
FG-90-6-1	29
2	37

C. Propriedades das melanoidinas

1. Avaliação dos pesos moleculares das melanoidinas por filtração em gel de Sephadex.

a) Calibração da coluna de Sephadex G-100 fino.

TABELA 7 - Calibração da coluna de Sephadex G-100 fino.

Padrão	pH	Peso molecular (PM)	log PM	Vol.eluição (+0,5 ml)
Mioglobina	8,0	16890 ⁽⁵⁰⁾	4,228	57,0
α -Quimotri psina	5,0	21500 ⁽⁵¹⁾	4,332	53,0
Tripsina	5,0	24000 ⁽⁵²⁾	4,380	50,0
Pepsina	8,0	32700 ⁽⁵³⁾	4,515	42,0
Pepsina	5,0	32700 ⁽⁵³⁾	4,515	42,0
Azul de dextrana	5,0	2000000	—	23,0

Conforme os resultados relacionados na tabela 7, foi obtida a seguinte equação para a calibração da coluna:

$$\log PM = -0,475 \frac{V_{\text{eluição}}}{V_{\text{externo}}} + 5,401$$

onde, $V_{\text{externo}} = V_{\text{eluição}}$ (Azul de dextrana).

b) Avaliação dos pesos moleculares das melanoidinas solúveis.

TABELA 8 - Avaliação dos pesos moleculares das melanoidinas solúveis.

Melanoidina	Vol.eluição (ml)	$\frac{\text{Vol.eluição}}{\text{Vol.externo}}$	log PM	PM x 10 ⁻³
FG-70-6-1	64,5 $\pm$ 0,5	2,80	4,071	11,8 $\pm$ 0,3
FG-70-6-2	57,5	2,50	4,214	16,4 $\pm$ 0,4
FG-80-6-1	65,5	2,85	4,047	11,1 $\pm$ 0,3
FG-80-6-2	61,0	2,65	4,142	13,9 $\pm$ 0,3
FG-90-6-1	65,0	2,83	4,057	11,4 $\pm$ 0,3
FG-90-6-2	63,0	2,74	4,100	12,6 $\pm$ 0,3

2. Composição elementar das melanoidinas

TABELA 9 - Composição elementar das melanoidinas.

Melanoidina	Porcentagem			
	Carbono	Hidrogênio	Nitrogênio	Oxigênio
FG-70-6-1	51,11	5,12	6,4	37,3
FG-70-6-2	50,91	4,88	6,7	37,5
FG-80-6-1	50,24	5,38	6,6	37,8
FG-80-6-2	50,19	5,46	6,0	38,3
FG-90-6-1	50,69	5,50	6,0	37,9
FG-90-6-2	50,31	5,43	6,2	38,1
Média	50,58	5,30	6,3	37,8
FG-70-3-1	55,86	4,40	5,8	33,9
FG-70-3-2	57,07	4,70	5,8	32,4
FG-80-3-1	56,76	4,65	6,2	32,3
FG-80-3-2	57,44	4,74	5,7	32,2
FG-90-3-1	57,59	4,80	5,9	31,7
FG-90-3-2	57,62	4,79	5,7	31,9
Média	57,06	4,68	5,9	32,4

3. Espectros das melanoidinas

a) Espectros infravermelho:

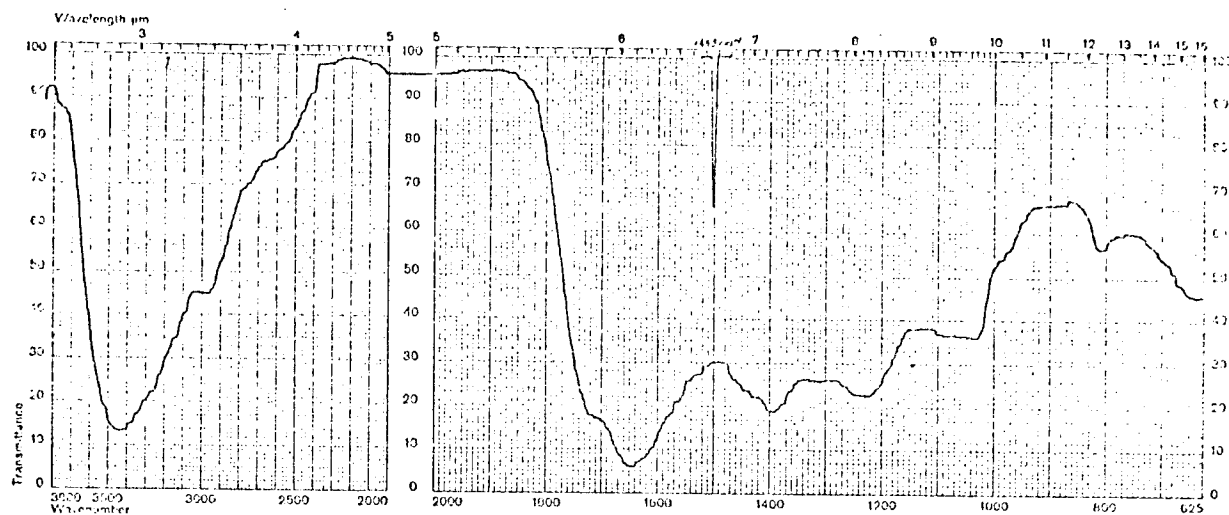


FIGURA 3 - Espectro infravermelho da melanoidina FG-70-3-1 (KBr)

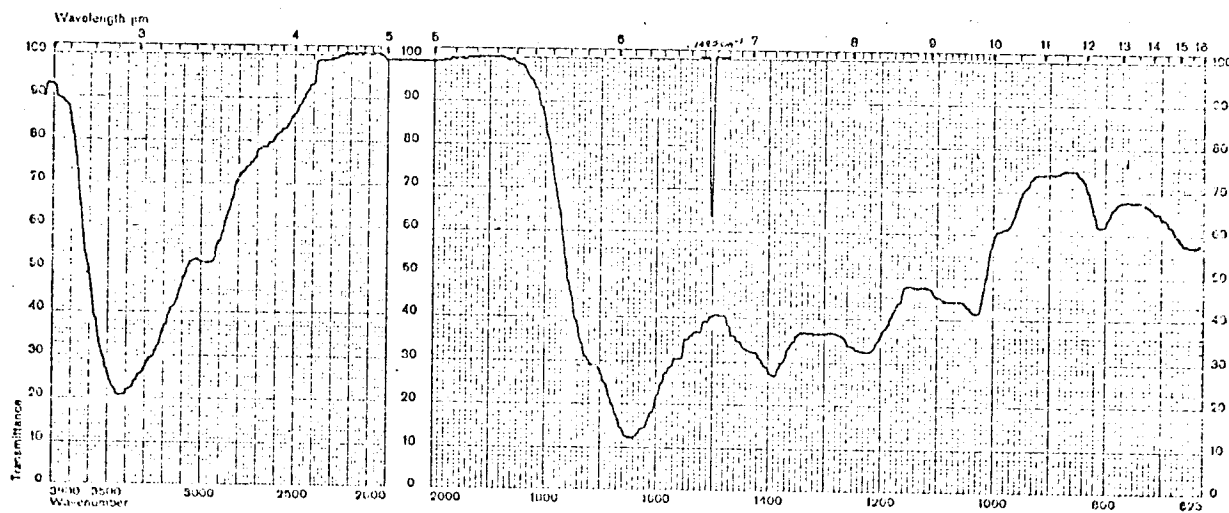


FIGURA 4 - Espectro infravermelho da melanoidina FG-70-3-2 (KBr)

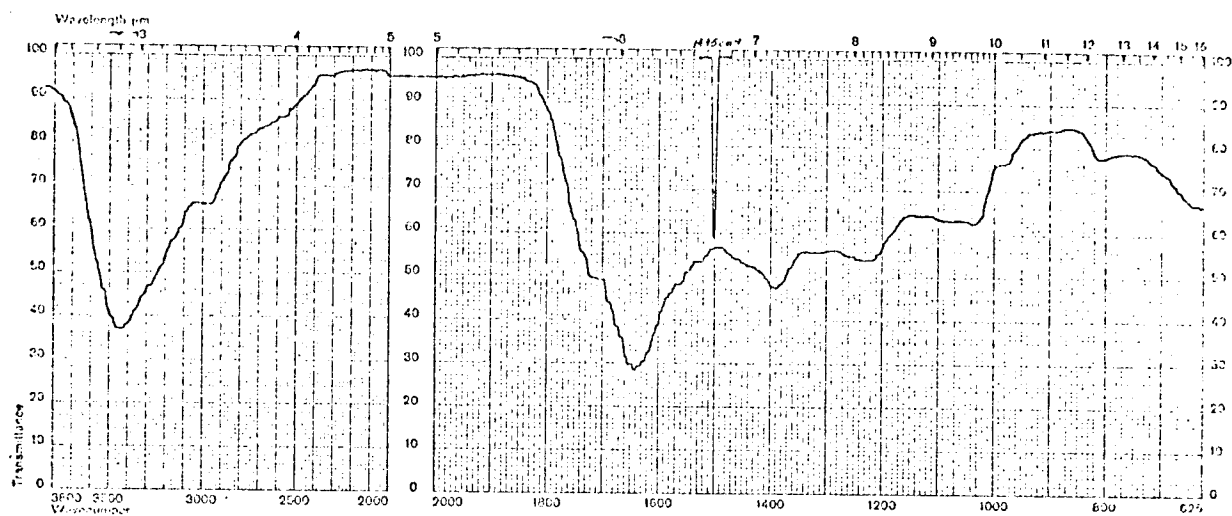


FIGURA 5 - Espectro infravermelho da melanoidina FG-80-3-1 (KBr)

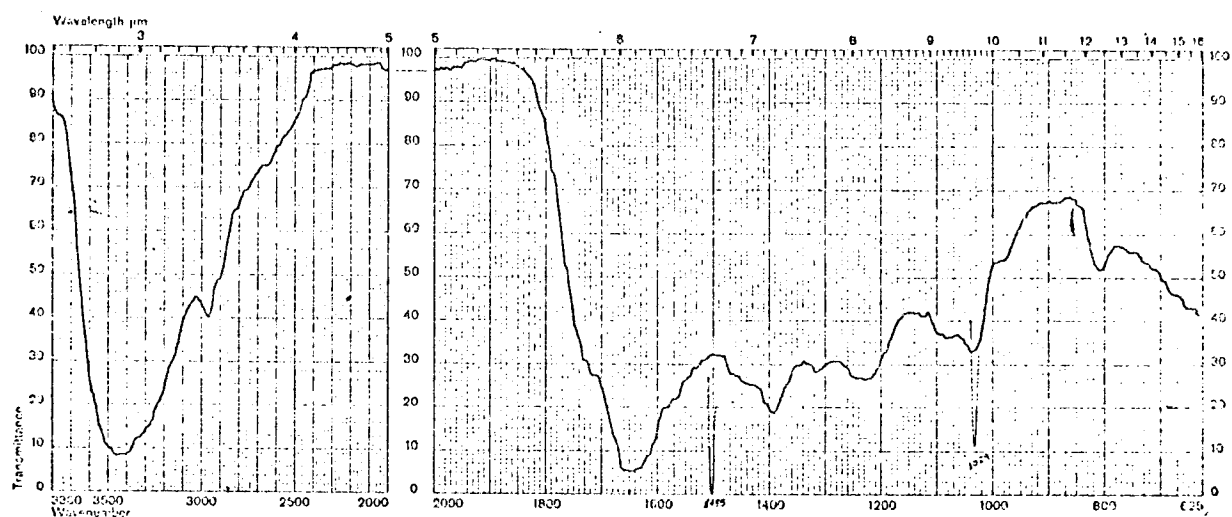


FIGURA 6 - Espectro infravermelho da melanoidina FG-80-3-2 (KBr)

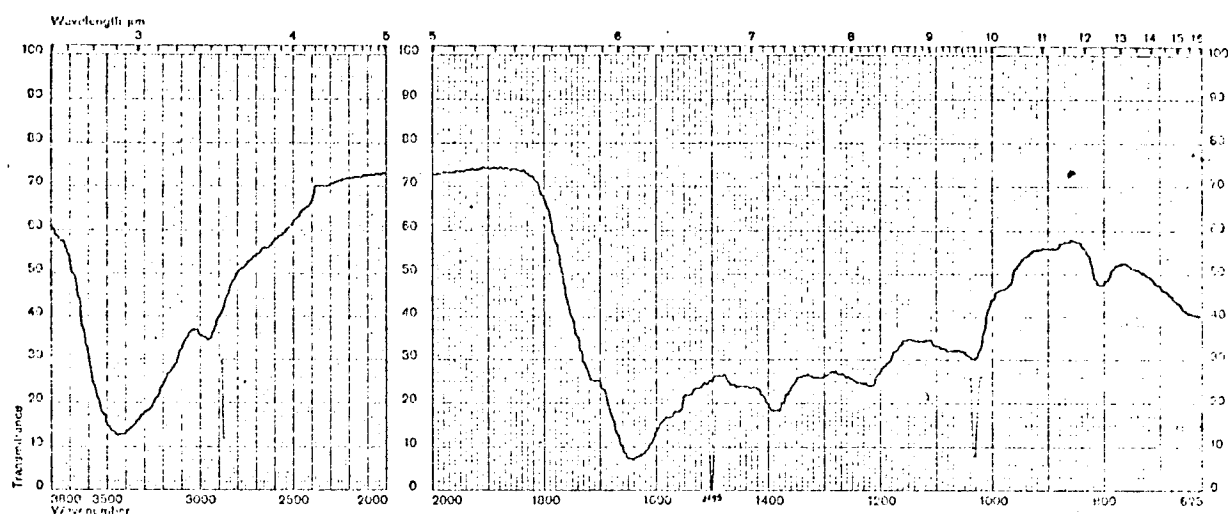


FIGURA 7 - Espectro infravermelho da melanoidina FG-90-3-1 (KBr)

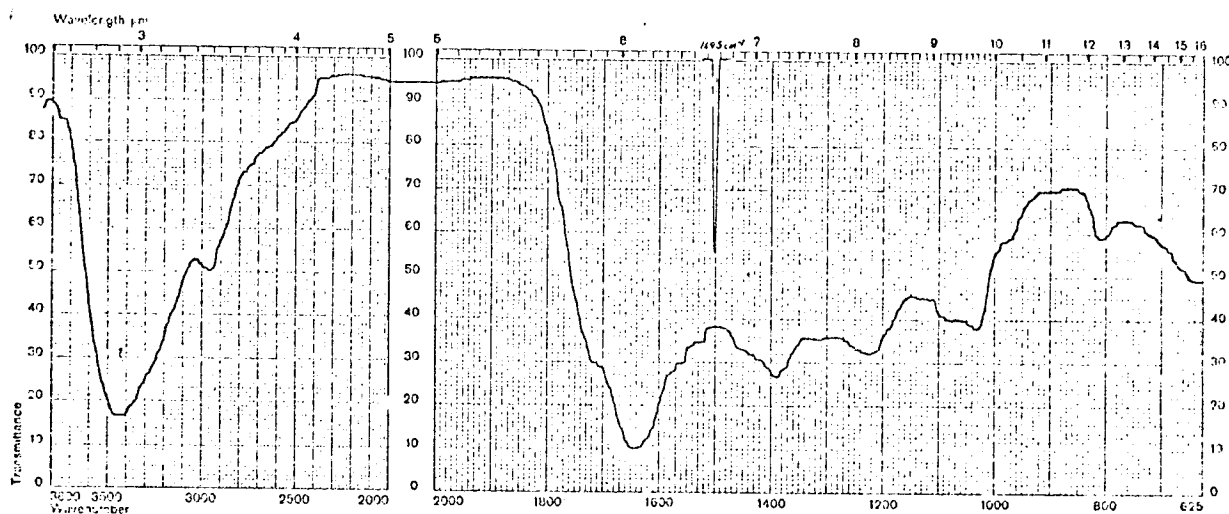


FIGURA 8 - Espectro infravermelho da melanoidina FG-90-3-2 (KBr)

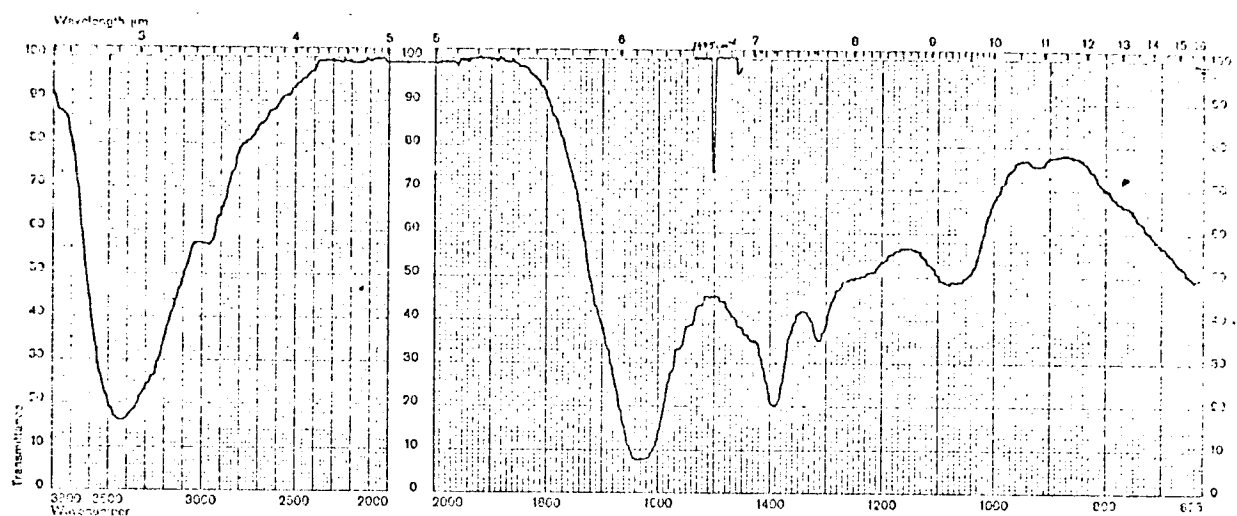


FIGURA 9 - Espectro infravermelho da melanoidina FG-70-6-1 (KBr)

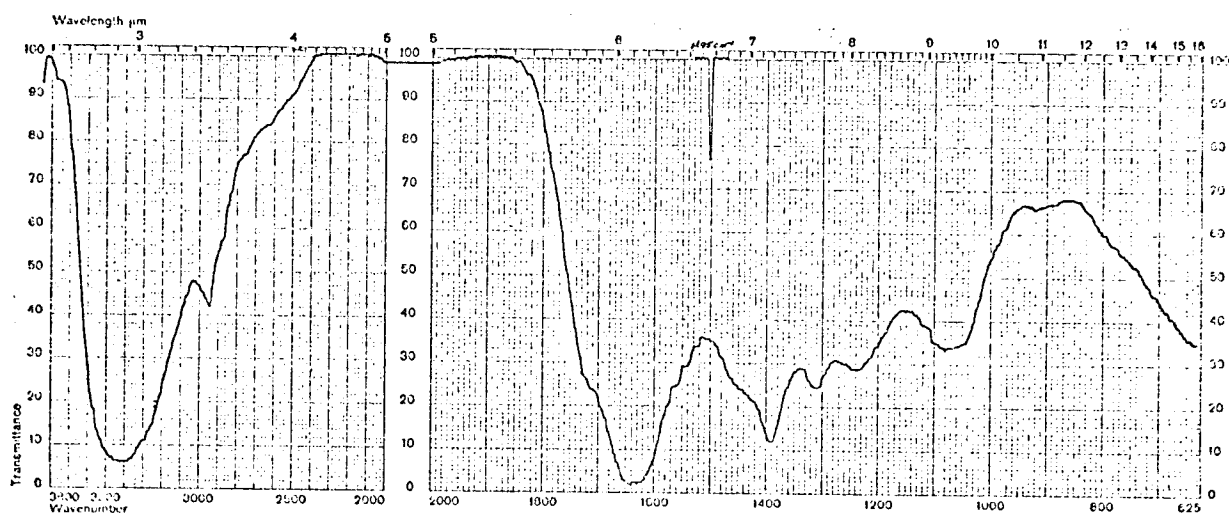


FIGURA 10 - Espectro infravermelho da melanoidina FG-70-6-2 (KBr)

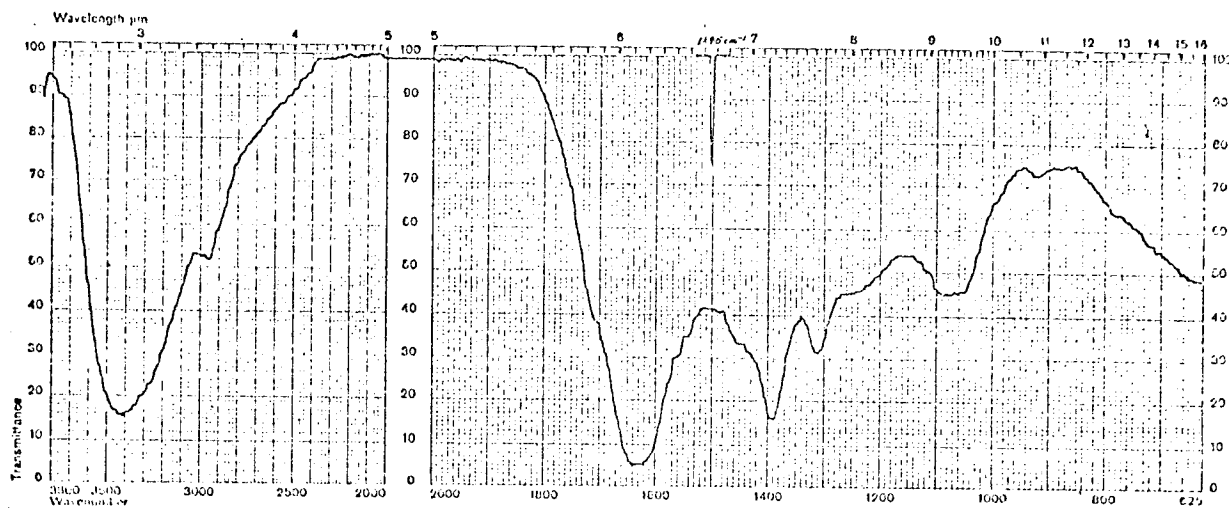


FIGURA 11 - Espectro infravermelho da melanoidina FG-80-6-1 (KBr)

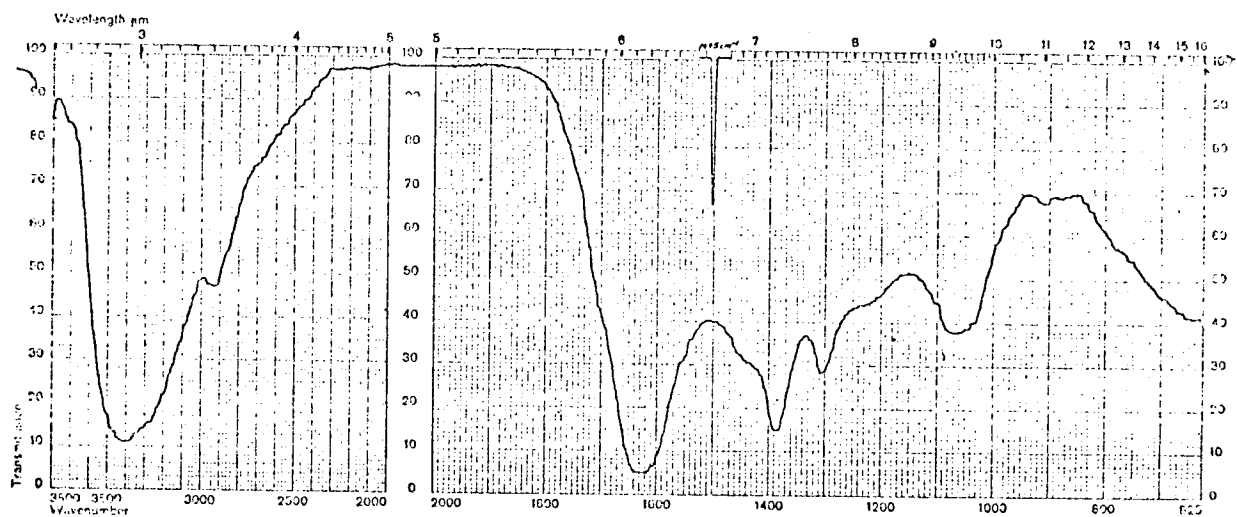


FIGURA 12 - Espectro infravermelho da melanoidina FG-80-6-2 (KBr)

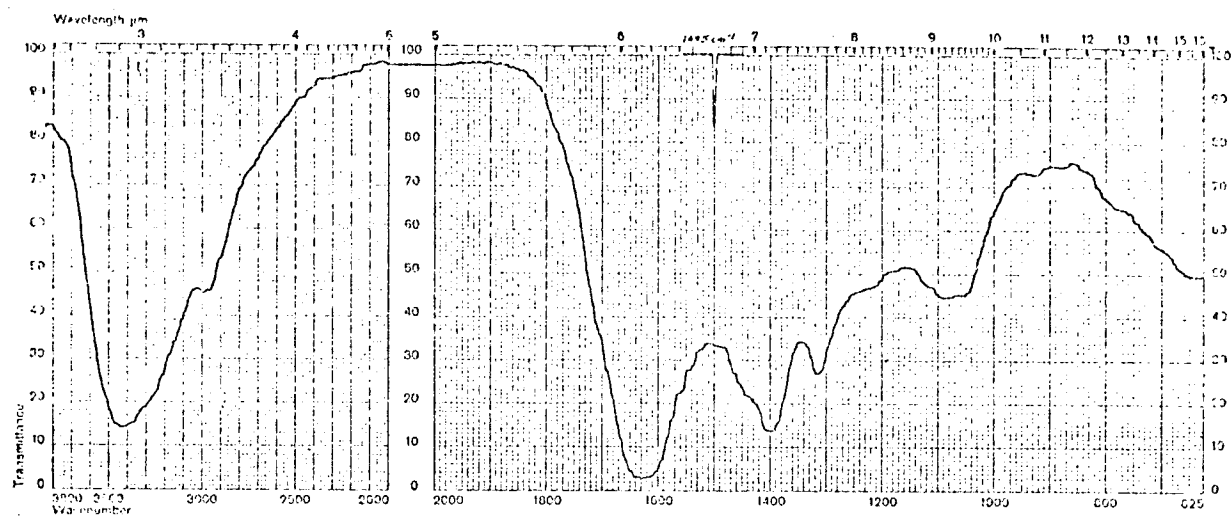


FIGURA 13 - Espectro infravermelho da melanoidina FG-90-6-1 (KBr)

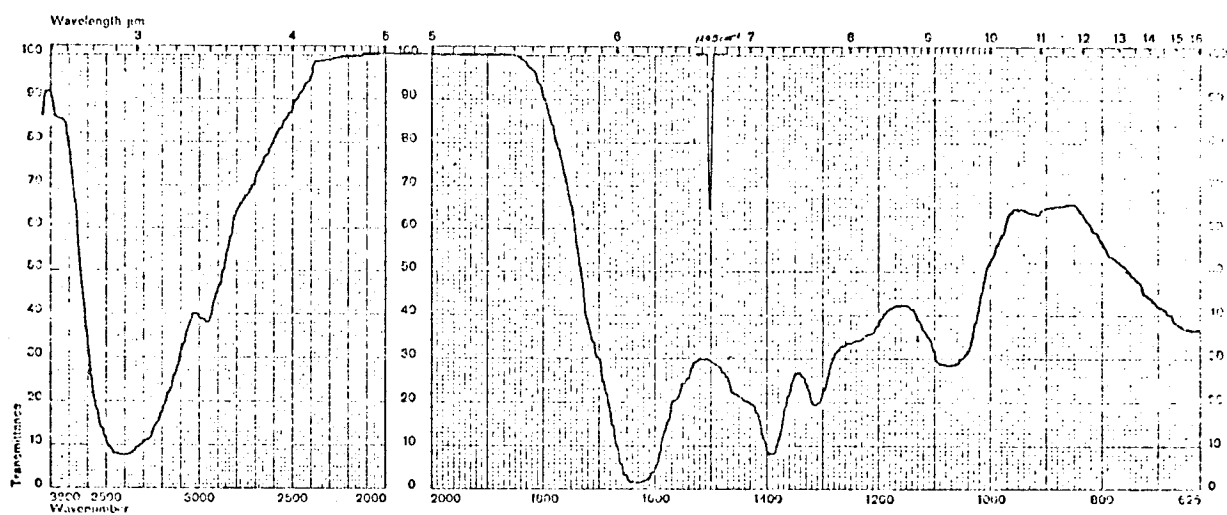


FIGURA 14 - Espectro infravermelho da melanoidina FG-90-6-2 (KBr)

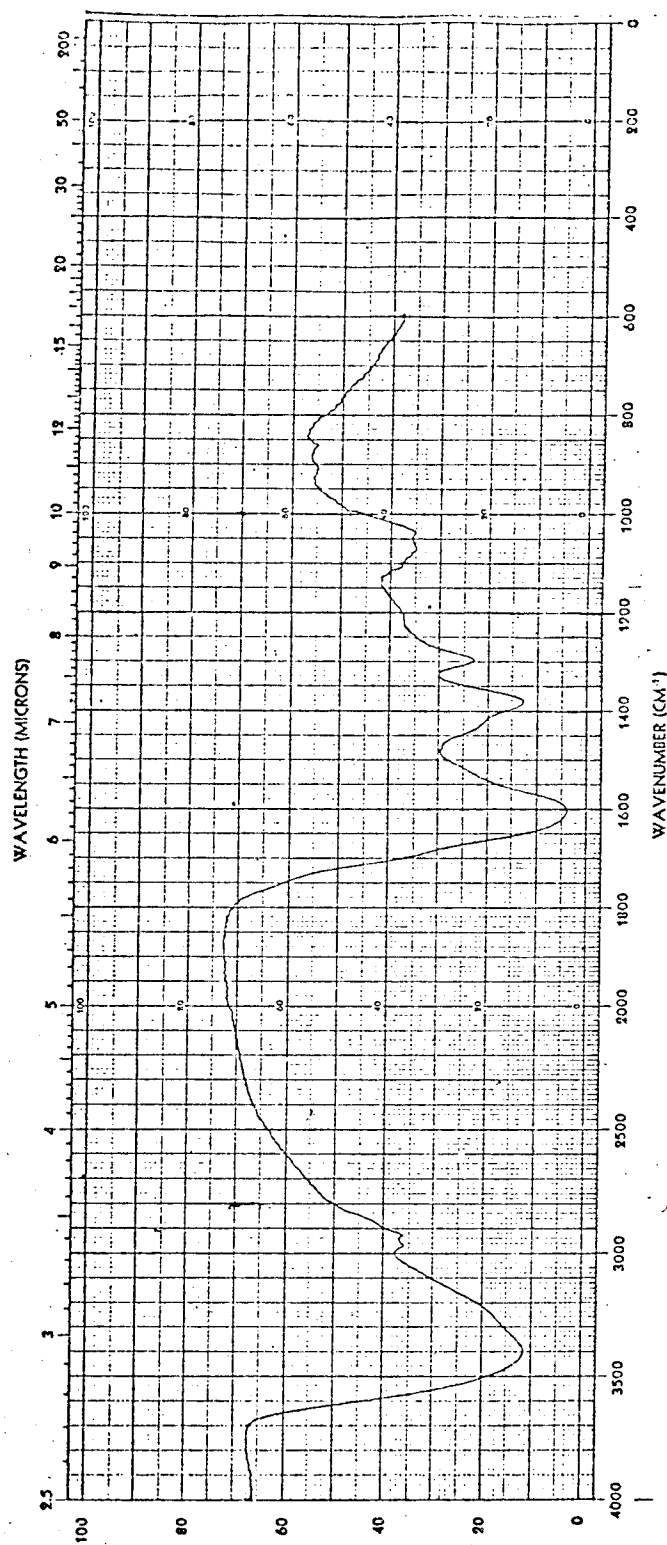


FIGURA 15 - Espectro infravermelho da melanoidina FG-90-6-1 (KBr)

b) Espectros visível da melanoidina FG-90-6-1:

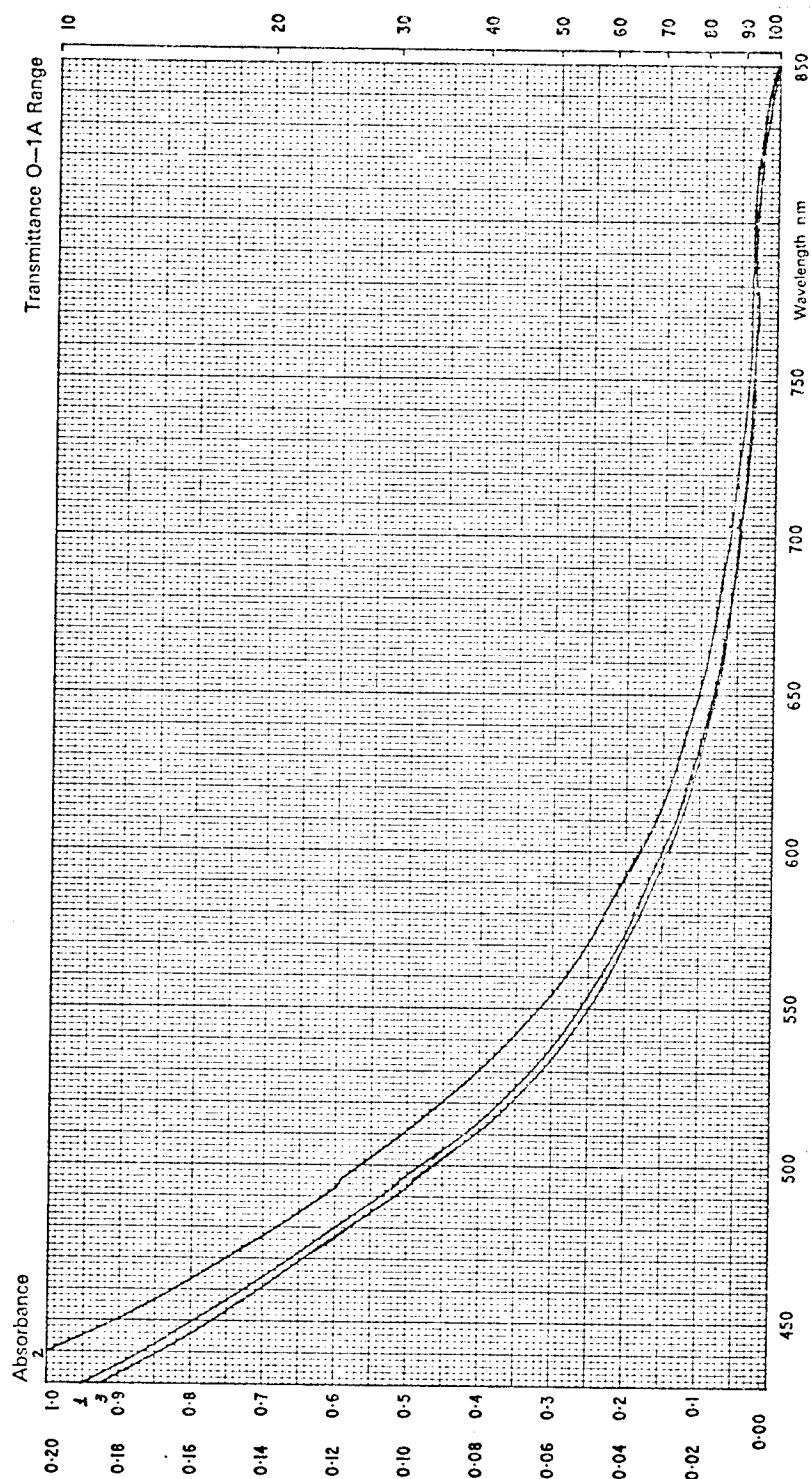


FIGURA 16 - Espectros visível de soluções da melanoidina FG-90-6-1 a 0,18% em:

1. H₂O, 2. NaOH 0,5 N e 3. HCl 0,5 N.

-c) Espectros ultravioleta da melanoidina FG-90-6-1:

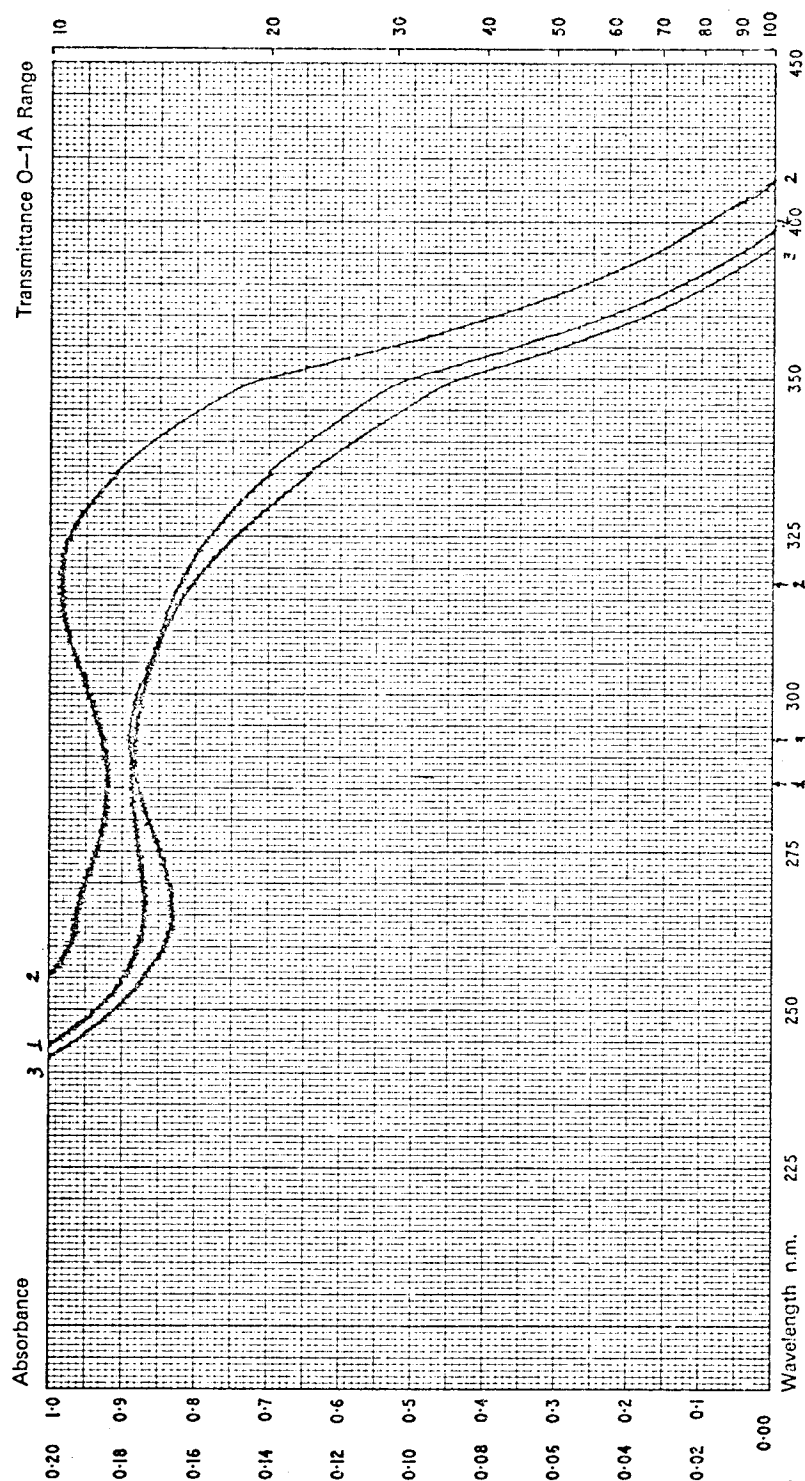


FIGURA 17 - Espectros ultravioleta de soluções da melanoidina FG-90-6-1 a 0,05% em: 1. H₂O, 2. NaOH 0,8 N e 3. HCl 0,8 N.

4. Reações de caracterização de grupos funcionais

- a) Aminas primárias, secundárias, terciárias
com tiocianato de potássio:

O escurecimento do papel com acetato de chumbo indicou desenvolvimento de H_2S . Portanto o teste foi positivo.

- b) Aminas primárias e secundárias com dissulfeto de carbono:

Houve desenvolvimento de N_2 , sendo, portanto, o teste positivo.

- c) Fenol por formilação:

O produto da reação não apresentou fluorescência quando irradiado com radiações ultravioleta indicando ser o teste negativo.

- d) Formação de iodofórmio:

O iodofórmio foi caracterizado pelo seu cheiro característico e pelo ponto de fusão que foi $119-120^{\circ}C$.

- e) Metilcetonas pela conversão a índigo:

Não houve formação de índigo indicando ser o teste negativo.

- f) Grupos carbonilas:

- i. Reação com hidreto de boro e sódio

O tratamento da melanoidina FG-90-6-1 com hidreto de boro e sódio provocou somente um clareamento parcial da solução, porém, não se observou nenhuma alteração de relevância no espectro infravermelho do produto, figura 18, em relação ao da melanoidina, figura 13 e 16.

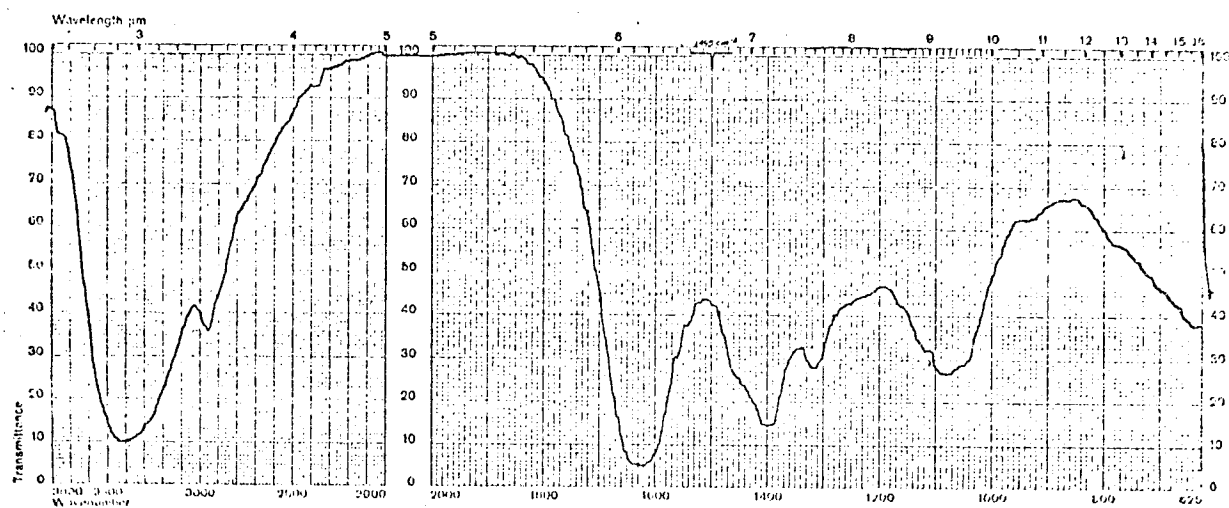


FIGURA 18 - Espectro infravermelho da melanoidina FG-90-6-1 tratada com boridreto de sódio (KBr).

ii. Reação com hidrogênio nascente

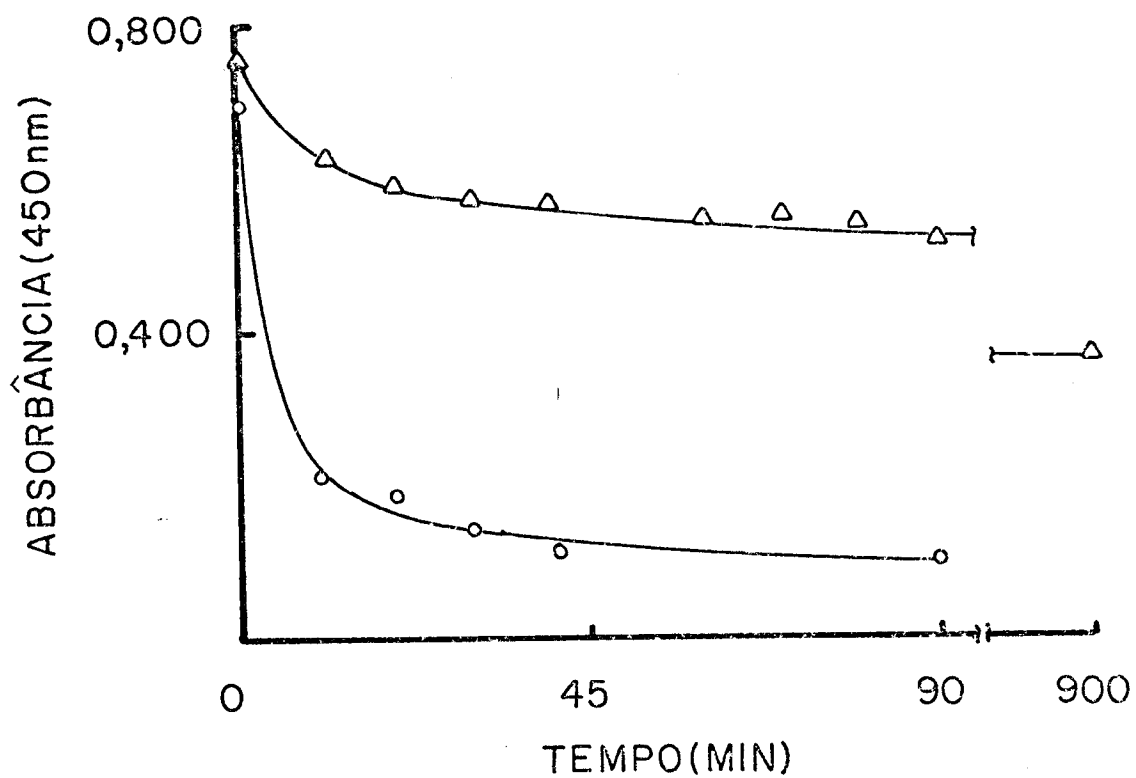


FIGURA 19 - Reação com hidrogênio nascente. Absorbância do sobrenadante lida a 450 nm em função do tempo de reação.

$\circ$ Zn/H^+ ; Δ Zn/OH^-

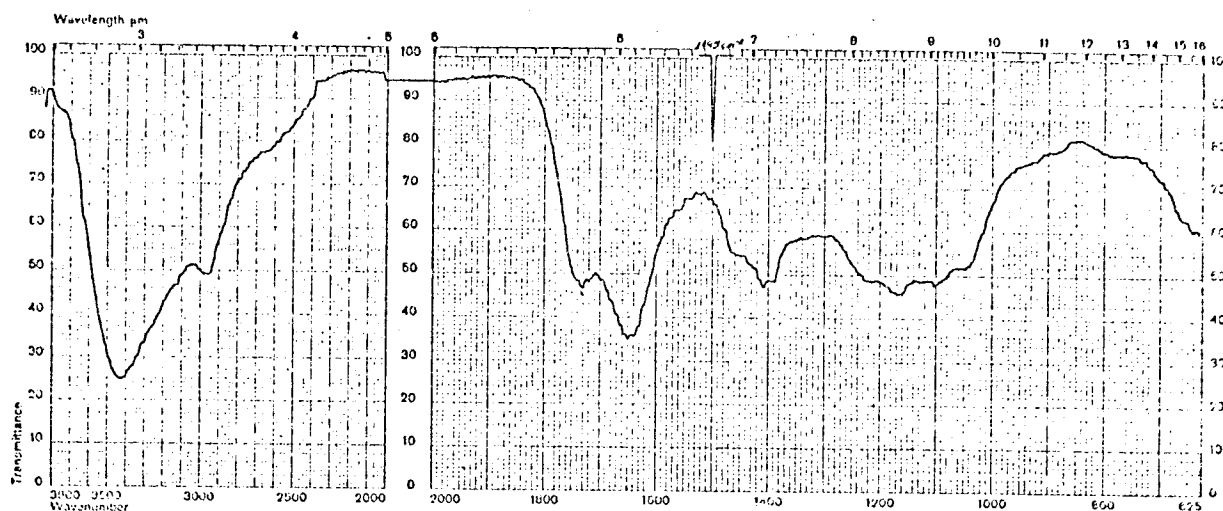


FIGURA 20 - Reação com hidrogênio nascente Zn/H^+ . Espectro infravermelho da melanoidina FG-90-6-1 reduzida com hidrogênio nascente (KBr).

g) Hidrogenação catalítica:

O material seco obtido do filtrado incolor era branco.

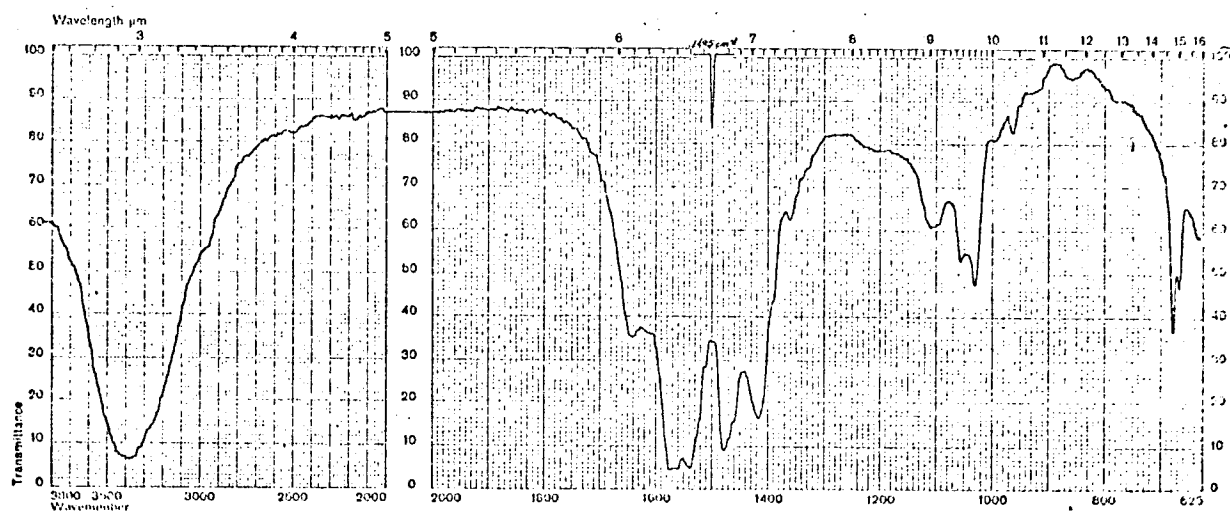


FIGURA 21 - Espectro infravermelho da melanoidina FG-90-6-1 reduzida por hidrogenação catalítica.

5. Acetilação

a) Com anidrido acético e acetato de sódio:

Foi obtido um produto escuro insolúvel em água, parcialmente solúvel em clorofórmio e solúvel em sulfóxido de dimetila.

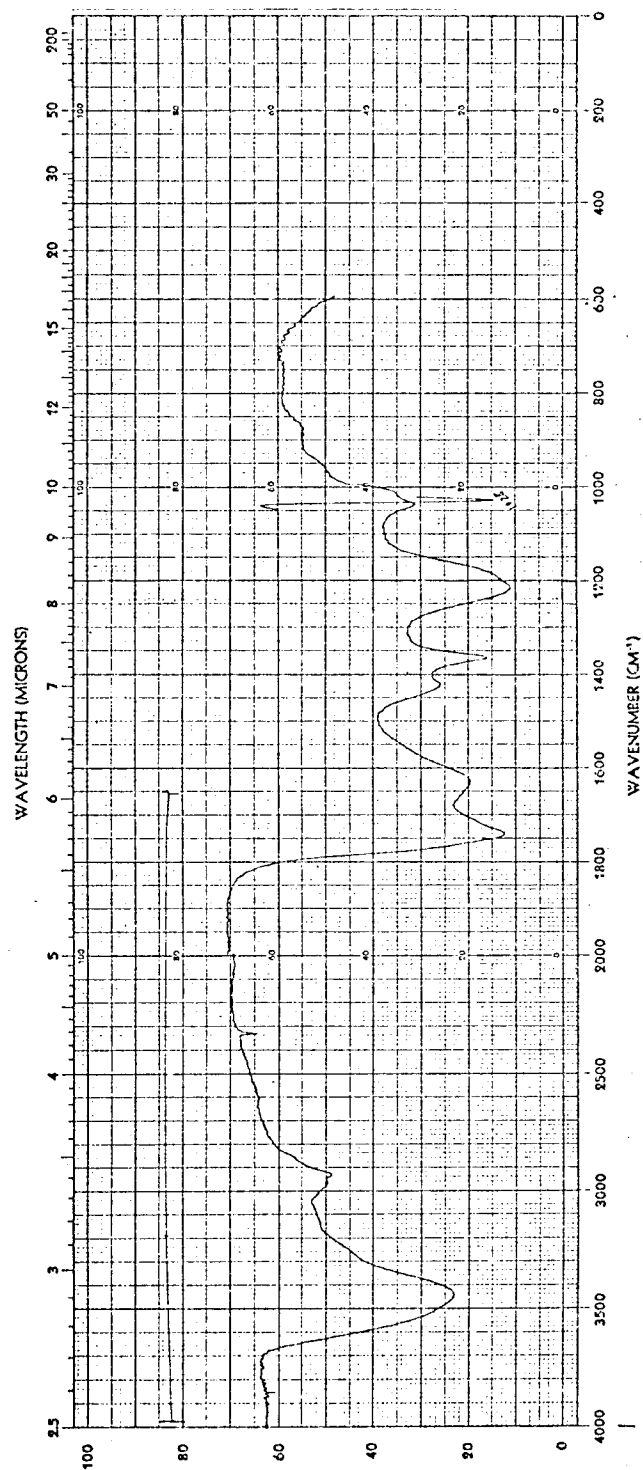


FIGURA 22 - Espectro infravermelho da melanoidina FG-90-6-1 acetilada com anidri-
do acético e acetato de sódio (KBr).

b) Acetilação com cloreto de acetila e piridina:

Na acetilação da melanoidina FG-90-6-1 com cloreto de acetila e piridina foi obtido um produto marrom claro. O seu espectro de ressonância magnética nuclear não apresentou nenhuma banda acima de 500 Hz.

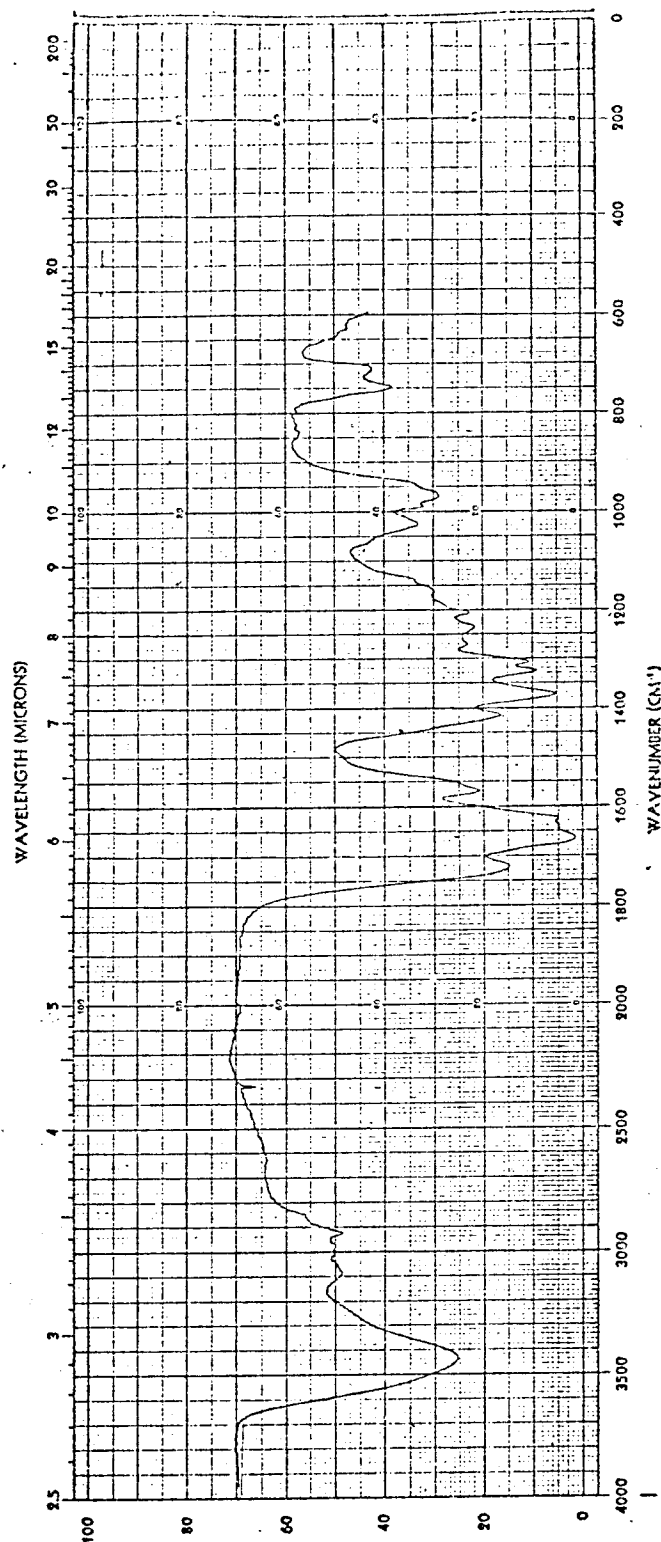


FIGURA 23 - Espectro infravermelho da melanoidina FG-90-6-1 acetilada com cloreto de acetila e piridina (KBr).

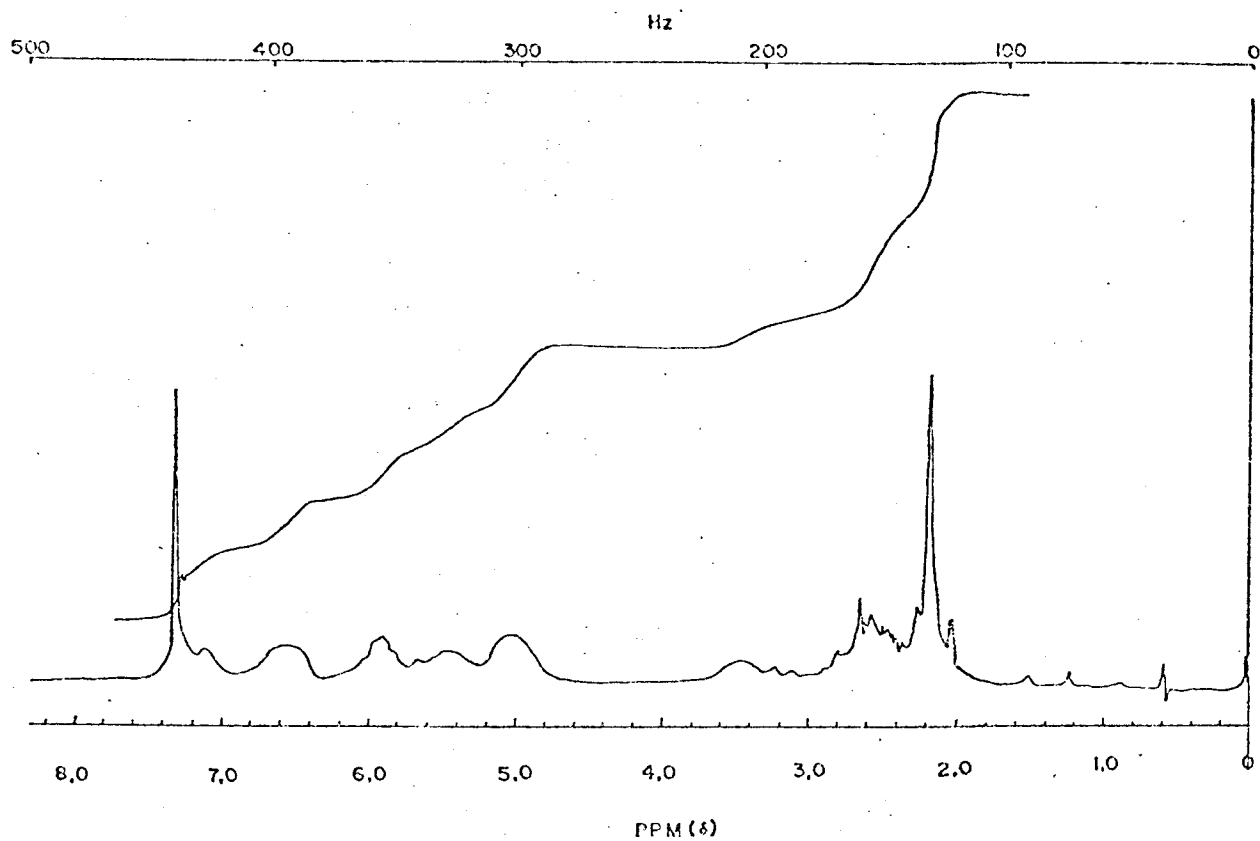


FIGURA 24 - Espectro de ressonância magnética nuclear da mela -
noidina FG-90-6-1 acetilada com cloreto de acetila
e piridina. Padrão tetrametilssilano. Solvente deu-
tero clorofórmio.

TABELA 10 - Solubilidade da melanoidina FG-90-6-1 acetilada com cloreto de acetila e piridina.

Solubilidade	Solvente
Solúvel	Metanol
	Piridina
	Clorofórmio
	Sulfóxido de dimetila
Parcialmente solúvel	Acetona
	Acetato de etila
	Benzeno
	Tetraidrofurano
Insolúvel	Água
	Éter dietílico

TABELA 11 - Determinação dos grupos O-acetilas na melanoidina FG-90-6-1 acetilada com cloreto de acetila e piridina. Resultados das titulações.

NaOH 0,1 N (ml)	FG-90-6-1 (mg)	FG-90-6-1 acetilada (mg)	HCl 0,108 N (ml)
25,00	-	-	23,20
25,00	-	-	23,20
25,00	133	-	21,75
25,00	133	-	21,70
25,00	-	500	9,30
25,00	-	500	9,30

6. Bromação

TABELA 12 - Relaciona os resultados da titulação com tiossulfato e as massas das melanoidinas.

	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,00753N (ml)	Melanoidina (mg)
Branco	65,7	—
F-70-1	30,6	15,5
3	39,5	12,4
F-80-1	36,6	12,9
3	34,3	11,8
F-90-1	37,9	12,5
3	47,8	8,6

TABELA 13 - Grau de insaturação tendo como base 100 g de melanoidina.

Melanoidina	Nº moles de bromo adicionados
F-70-1	0,855
3	0,940
F-80-1	0,940
3	0,940
F-90-1	0,945
3	0,935

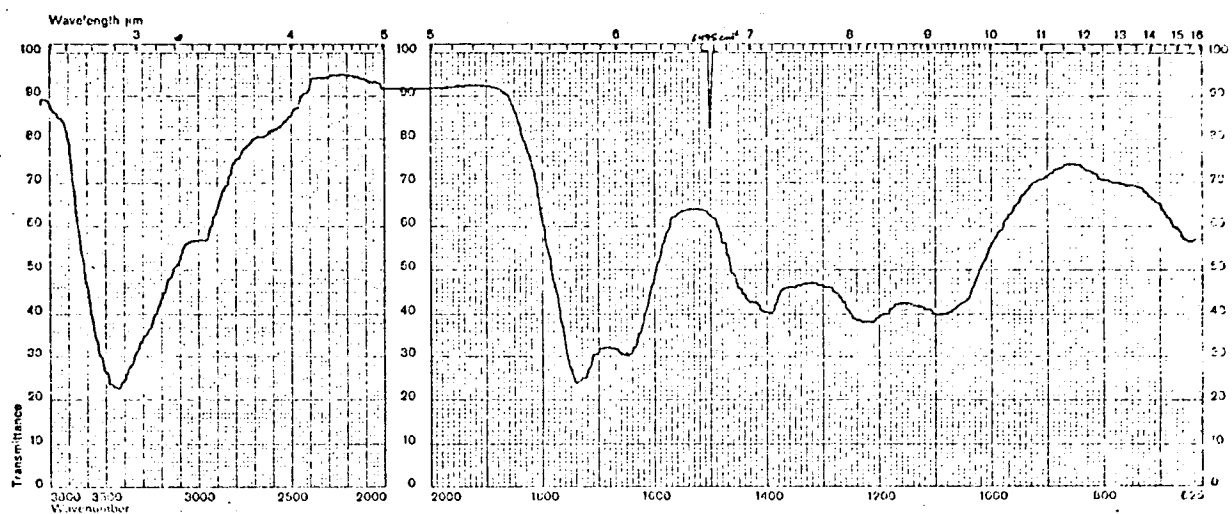


FIGURA 25 - Espectro infravermelho da melanoidina FG-90-6-1 bromada (KBr).

7. Oxidação com permanganato de potássio em meio alcalino

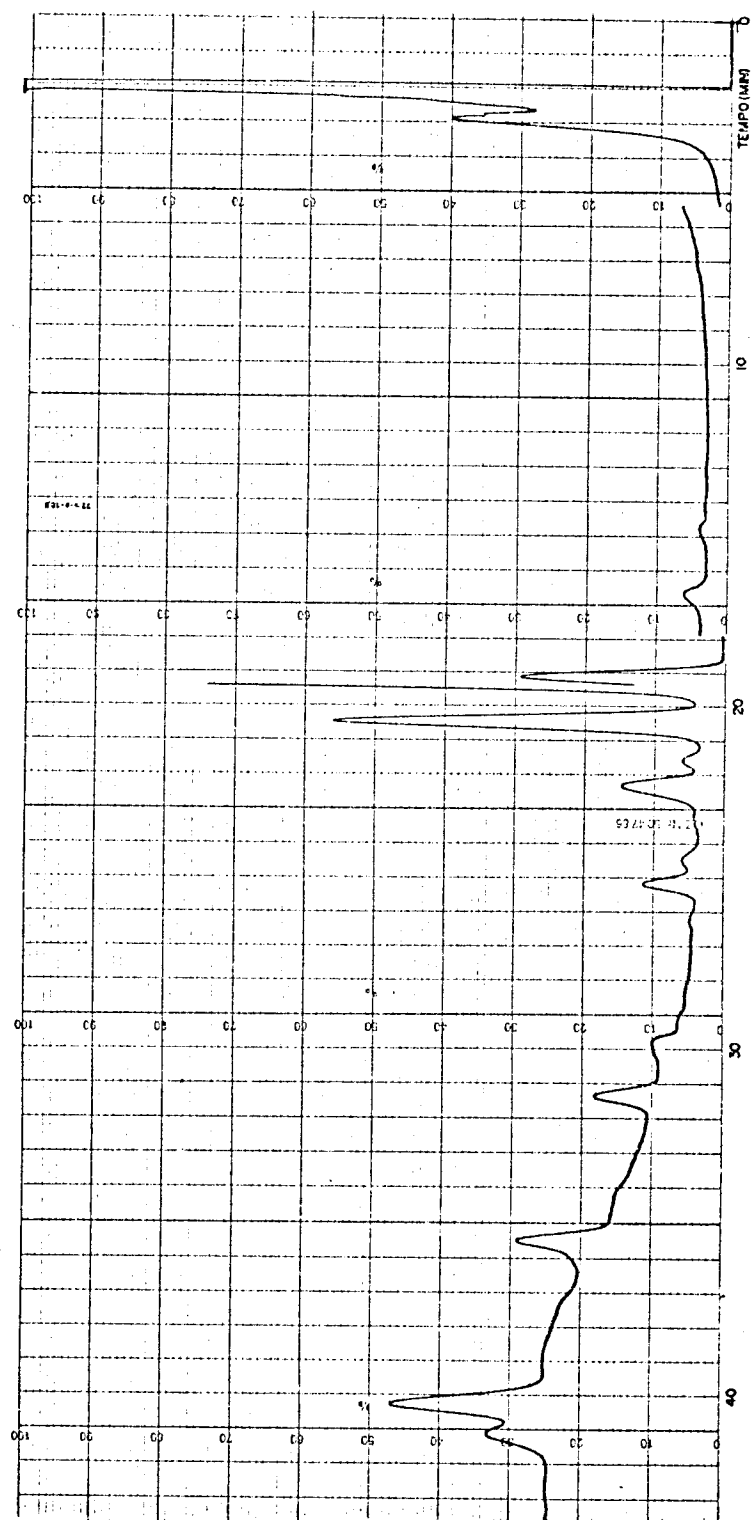


FIGURA 26 - Oxidação com $\text{KMnO}_4/\text{OH}^-$. Cromatografia na fase gasosa dos ésteres metílicos dos ácidos obtidos na oxidação da melanoidina na FG-90-6-1.

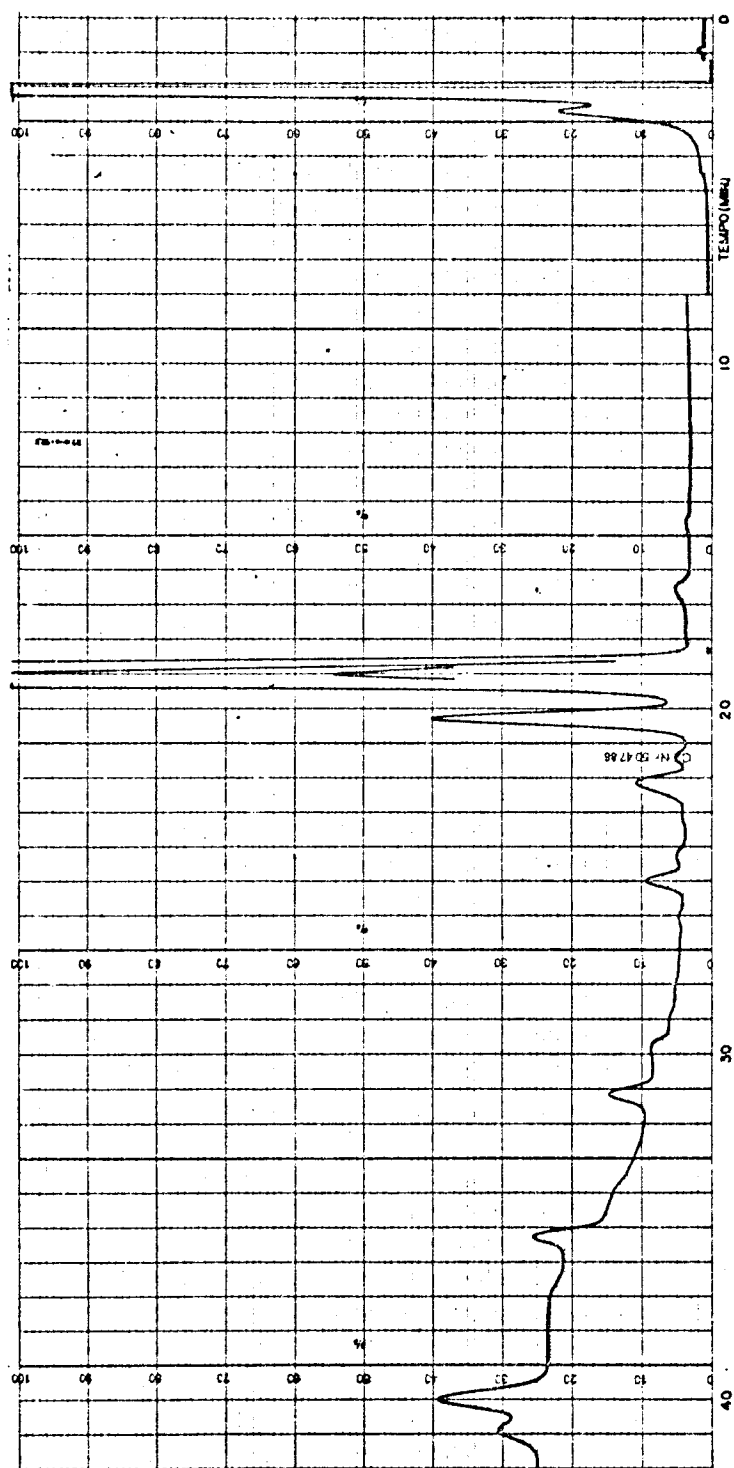


FIGURA 27 - Oxidação com $\text{KMnO}_4/\text{OH}^-$. Cromatografia na fase gasosa dos ésteres metílicos dos ácidos obtidos na oxidação da melanoidina na FG-90-6-1, juntamente com o padrão oxalato de dimetila.

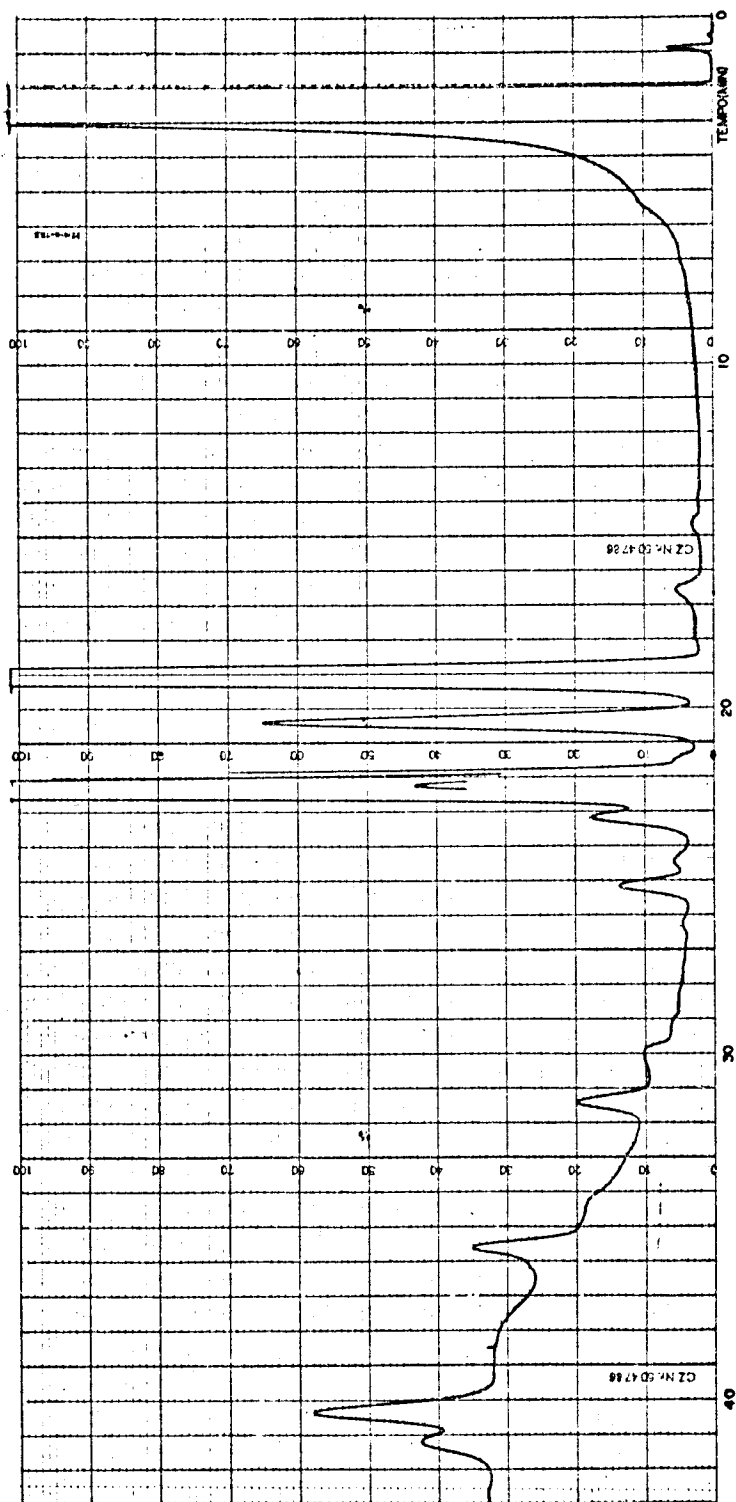


FIGURA 28 - Oxidação com $\text{KMnO}_4/\text{OH}^-$. Cromatografia na fase gasosa dos ésteres metílicos dos ácidos obtidos na oxidação da melanoidina FG-90-6-1, juntamente com o padrão malonato de dimetila.

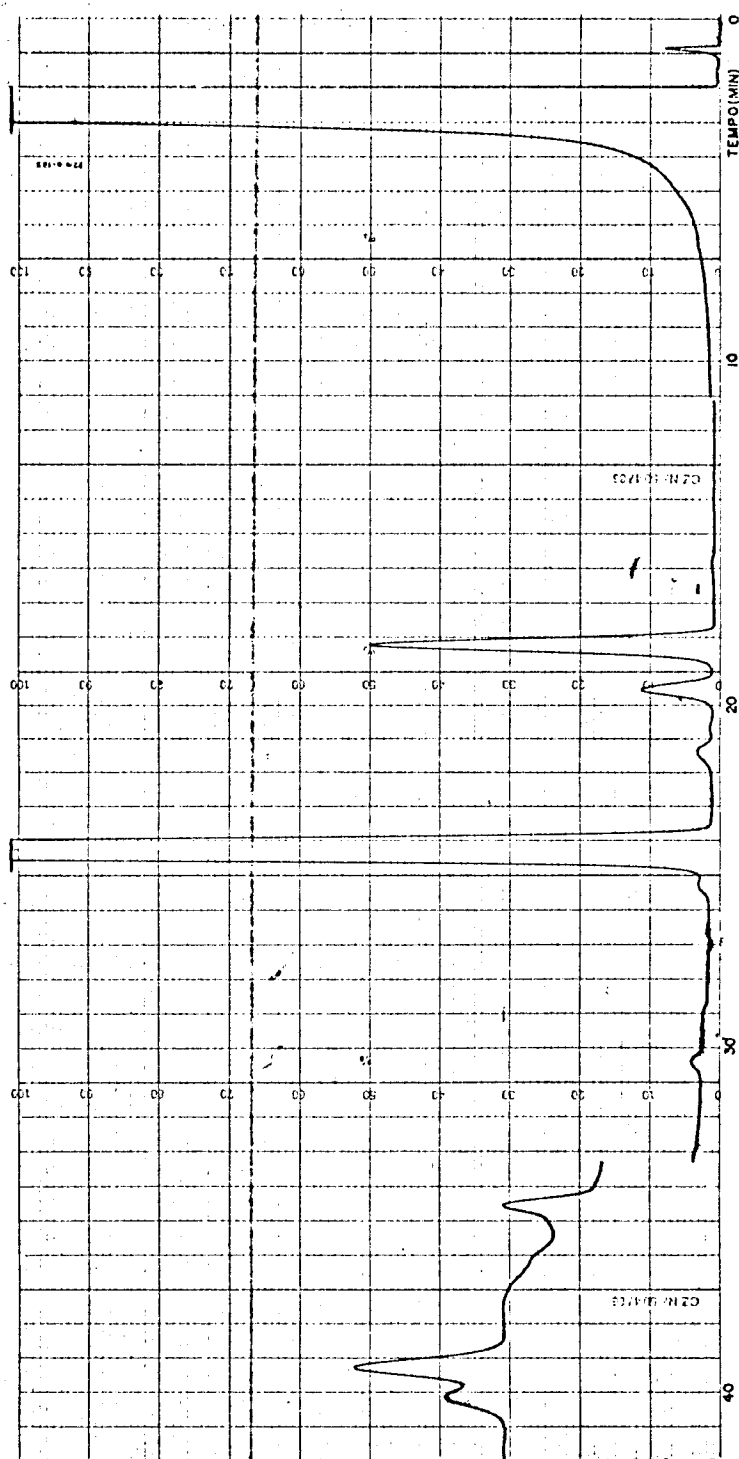


FIGURA 29 - Oxidação com $\text{KMnO}_4/\text{OH}^-$. Cromatografia na fase gasosa dos ésteres metílicos dos ácidos obtidos na oxidação da melanoidina FG-90-6-1, juntamente com o padrão succinato de dimetila.

8. Determinação de amins primárias por nitrosação

No tratamento da melanoidina com ácido nitroso houve desenvolvimento de nitrogênio. A medida do nitrogênio desenvolvido indicou que 0,42% do peso da melanoidina FG-90-6-1 correspondem ao nitrogênio de amins primárias.

VI. DISCUSSÃO

As melanoidinas foram preparadas sob condições experimentais (Tabela 1), semelhantes às usadas em trabalhos anteriores para o estudo da reação de Maillard (54), de modo a permitir o relacionamento dos resultados. O aumento da concentração da frutose e da glicina teve por finalidade principal o aumento da quantidade da melanoidina produzida, já que o rendimento do processo poderia ser afetado pela atividade da água. Efetivamente os dados das tabelas 4 e 5 indicam um aumento pequeno no rendimento a pH 6,0, porém considerável a pH 3,0. Em qualquer caso, mesmo com um consumo de até 41% da frutose (Tabela 6), o rendimento das preparações foi baixo, indicando consideráveis perdas de carboidratos no processo. Ainda pelos resultados das tabelas 4 e 5, verifica-se que enquanto a pH 6,0 o efeito da temperatura se aproxima do efeito da concentração sobre o rendimento, que é crescente exceto a 70°C, a pH 3,0 o aumento da temperatura produziu efeitos contrários, diminuindo o rendimento.

Comparando-se as figuras 1 e 2 com os valores da tabela 3, verifica-se que o efeito da caramelização sobre a absorbância final é muito baixo, podendo ser considerados desprezíveis os efeitos destes produtos sobre a composição da melanoidina.

O pH empregado na preparação das melanoidinas é um parâmetro de relevância para a solubilidade das mesmas. As melanoidinas preparadas a pH 6,0 são todas solúveis em água, enquanto aquelas

obtidas a pH 3,0 são todas insolúveis. Em outros solventes não aquosos, exceto o sulfóxido de dimetila, nenhuma melanoidina se mostrou solúvel. O efeito do pH sobre o tipo da melanoidina obtida, pode ser verificado na diferença entre a composição elementar dos produtos obtidos a pH 6,0 e 3,0 (Tabela 9). Enquanto entre as melanoidinas preparadas a pH 6,0 e entre as preparadas a pH 3,0, os espectros infravermelho não indicam diferenças significativas, a comparação entre as melanoidinas obtidas nos dois pH mostra diferenças na região do espectro entre 1220 a 800 cm^{-1} .

A insolubilidade em água das melanoidinas obtidas a pH 3,0 impediu um melhor estudo destes compostos, que se limitou à obtenção dos seus espectros infravermelho e à determinação da composição elementar. Para as melanoidinas preparadas a pH 6,0, uma vez comprovada a semelhança em suas composições elementares e espectros infravermelho, outras determinações foram feitas escolhendo-se como representativa do grupo a melanoidina FG-90-6-1.

Os pesos moleculares das melanoidinas foram determinados por filtração em gel de Sephadex, obtendo-se valores entre $11,1 \times 10^3$ e $11,8 \times 10^3$ para as melanoidinas preparadas na concentração mais baixa dos reagentes e entre $12,6 \times 10^3$ e $16,4 \times 10^3$ para as concentrações maiores. A elevação da temperatura de reação produziu uma melanoidina de menor peso molecular nas preparações feitas na concentração maior dos reagentes. As figuras 1 e 2 mostram que a taxa de aumento da absorbância aumentou consideravelmente tanto com a temperatura como também com a concentração dos rea-

gentes indicando que pode ter havido formação de um maior número de moléculas de menor peso molecular.

Para uma melhor caracterização da estrutura e dos grupos funcionais presentes nas melanoidinas, as mesmas foram submetidas a diversas provas químicas e os resultados, sempre que possível, foram comparados com os respectivos espectros infravermelho ou ultravioleta.

Examinando-se os espectros infravermelho das melanoidinas observam-se absorções a 3420 cm^{-1} e a 1620 cm^{-1} indicativas da presença de amins. O desenvolvimento de H_2S pelo aquecimento da melanoidina com tiocianato de potássio indica a existência de amins primárias, secundárias e terciárias. O desenvolvimento de nitrogênio na presença de azida de sódio e iodo indica que houve a formação de ditiocarbamatos na reação da melanoidina com dissulfeto de carbono, o que caracteriza a presença de amins primárias e secundárias. A presença das amins primárias foi confirmada pela formação de nitrogênio quando a melanoidina foi tratada com ácido nitroso e a medida do nitrogênio desenvolvido permitiu determinar a existência de 0,030 mols de grupos amínicos primários por 100 g de melanoidina. Este valor corresponde a 0,42% de nitrogênio que é um valor baixo tendo em vista que a melanoidina contém 6,0% de nitrogênio e consequentemente o restante do nitrogênio na melanoidina poderá estar sob forma de amins secundárias e terciárias.

A banda larga a 1620 cm^{-1} poderá ainda incluir absorções de grupos carbonílicos e duplas $\text{C}=\text{C}$ de cetonas α , β -insaturadas. De

fato esta hipótese é fortalecida pela sua diminuição e o aparecimento de uma banda a 1735 cm^{-1} , característica de carbonila - de cetona saturada, na melanoidina bromada. Na hidrogenação da melanoidina com zinco em meio ácido houve o aparecimento da banda a 1735 cm^{-1} no espectro do seu produto. Neste caso a menor intensidade de absorção dessa banda comparada com a banda a 1620 cm^{-1} pode ser justificada pelo fato de que as cetonas α , β -insaturadas sofrem em uma primeira etapa a redução da dupla ligação C=C e posteriormente a redução da carbonila pela reação de Clemmensen (55). O grupo carbonila com insaturação em α é facilmente enolisável em meio alcalino o que justifica a sua baixa reatividade com hidreto de boro e sódio e com zinco em meio alcalino que mesmo após 900 minutos de reação provocou uma diminuição na absorbância da solução, medida a 450 nm, de 52%, enquanto com zinco em meio ácido a diminuição foi de 86% em 90 minutos de reação.

A existência de grupos carbonilas α , β -insaturados é também sugerida pelo espectro ultravioleta da melanoidina (Figura 17) que apresentou uma banda larga com máximo em 286 nm deslocado para 293 nm e 318 nm pela acidificação e alcalinização, respectivamente. Com a enolização em maior extensão no meio alcalino, são produzidos intermediários em que o caráter de dupla ligação no grupo C=O é diminuído, diminuindo a energia da ligação.

A ausência de metilcetonas (R-CO-CH_3) foi verificada pela reação da melanoidina com o-nitrobenzaldeído em meio alcalino. Não houve a formação de índigo.

As bandas a 3420, 1400, 1315 e aquela que se estende entre 1040 e 1100 cm^{-1} , podem ser atribuídas aos álcoois, sendo que a última é característica de álcoois α , β -insaturados. Seu desaparecimento e o surgimento de uma banda a 1100 cm^{-1} no produto da hidrogenação catalítica indica a existência de álcool secundário α , β -insaturado.

A melanoidina foi acetilada com o objetivo de se obter um produto mais solúvel em solventes orgânicos e na tentativa de se avaliar o número de grupos acetiláveis. A acetilação foi tentada por dois métodos: com anidrido acético e acetato de sódio e com cloreto de acetila e piridina. Pelos dois métodos foram obtidos produtos insolúveis em água, sendo que com o cloreto de acetila foi obtido um produto mais claro e mais solúvel em solventes orgânicos do que aquele obtido com anidrido acético. O espectro infravermelho do produto da acetilação com anidrido acético não apresentou bandas características de amidas, presentes no espectro do produto de acetilação com cloreto de acetila, a 3420, 1675, 1635 e 1580 cm^{-1} . A melanoidina acetilada com anidrido acético apresentou um espectro infravermelho onde a banda larga a 1225 pode ser atribuída a acetato enólico ou fenólico. A não formação da melanoidina quando tratada com clorofórmio e sulfato de hidrazina em meio de ácido clorídrico, elimina a possibilidade da presença de fenóis na melanoidina.

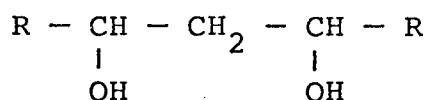
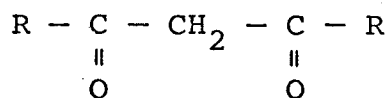
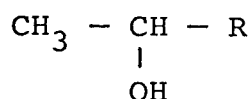
O número de O-acetilas foi determinado, pelo método de Kunz (48), na melanoidina acetilada com cloreto de acetila e piridina. O resultado indicou a presença de 0,300 mols de grupos O-

acetilas em 100 g da melanoidina acetilada, o que equivale a 0,343 mols de grupos hidroxilas por 100 g de melanoidina.

Os resultados da tabela 11 mostram que cem gramas da melanoidina neutralizam 0,120 equivalentes de NaOH, o que indica a presença de grupos ácidos na molécula. A ausência de bandas acima de 500 Hz no espectro de ressonância magnética nuclear da melanoidina acetilada com cloreto de acetila, em CDCl_3 , infere a ausência de grupos carboxilas, o que leva a admitir o caráter enólico dos grupos ácidos.

O número de duplas ligações pode ser determinado pelo bromo absorvido pela melanoidina. Os resultados da tabela 14 mostram que em 100 g de melanoidina existe pelo menos 1% de duplas ligações carbono-carbono que podem adicionar bromo.

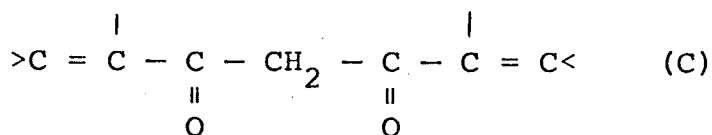
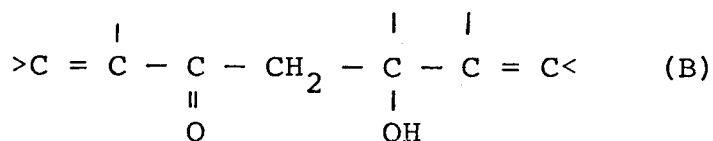
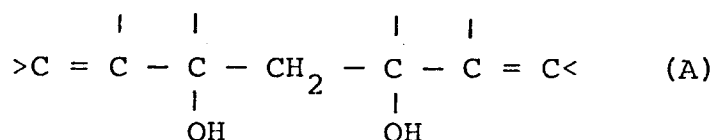
A precipitação de iodoformio quando a melanoidina foi tratada com hipiodito de sódio, sugeriu a presença das seguintes estruturas:



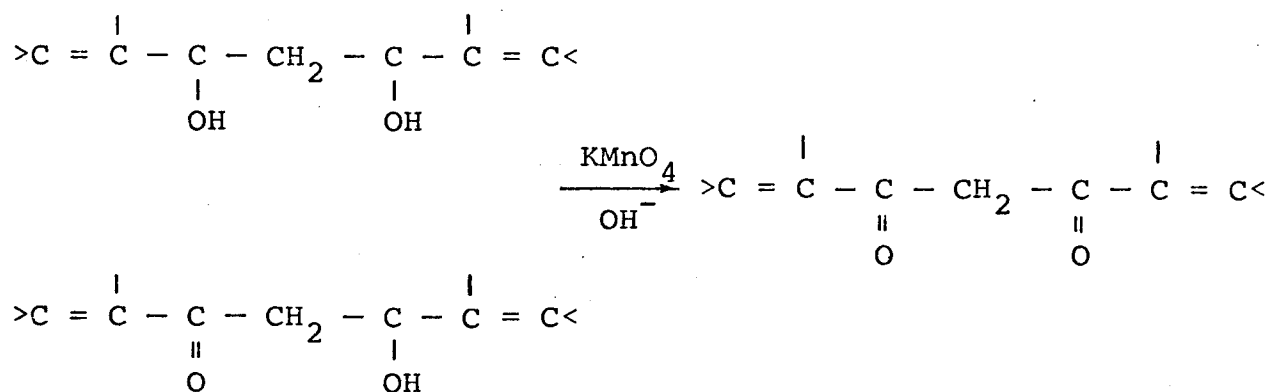
O permanganato em meio alcalino pode oxidar álcoois primários e secundários a aldeídos e cetonas, os quais quando enolisáveis

podem ser oxidados a ácidos carboxílicos (56). Foi possível identificar por cromatografia na fase gasosa os ésteres metílicos dos ácidos oxálico, malônico e succínico resultantes da oxidação da melanoidina com permanganato em meio alcalino.

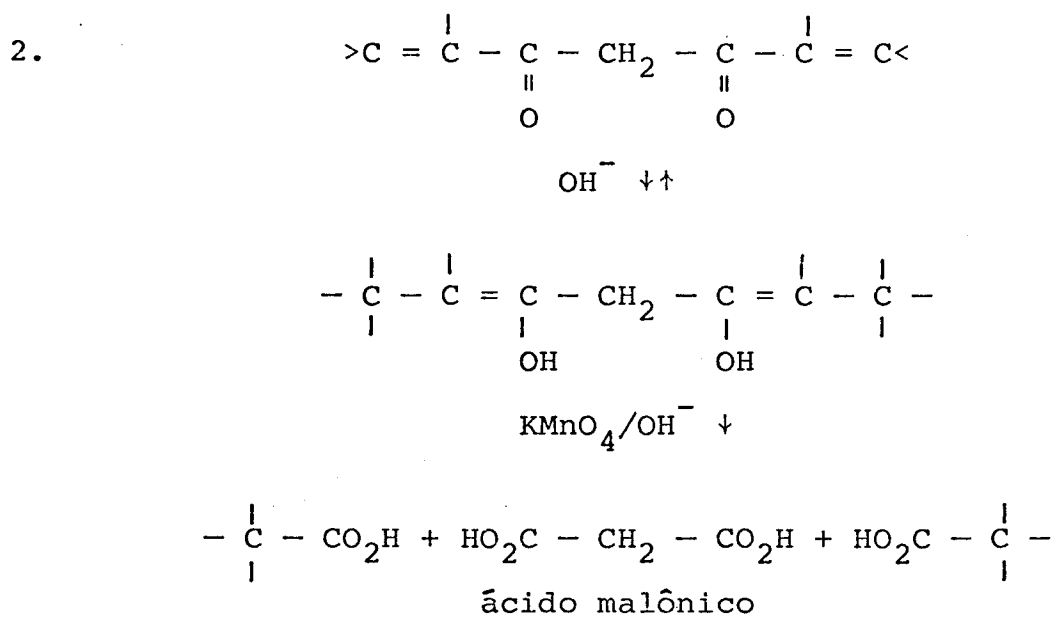
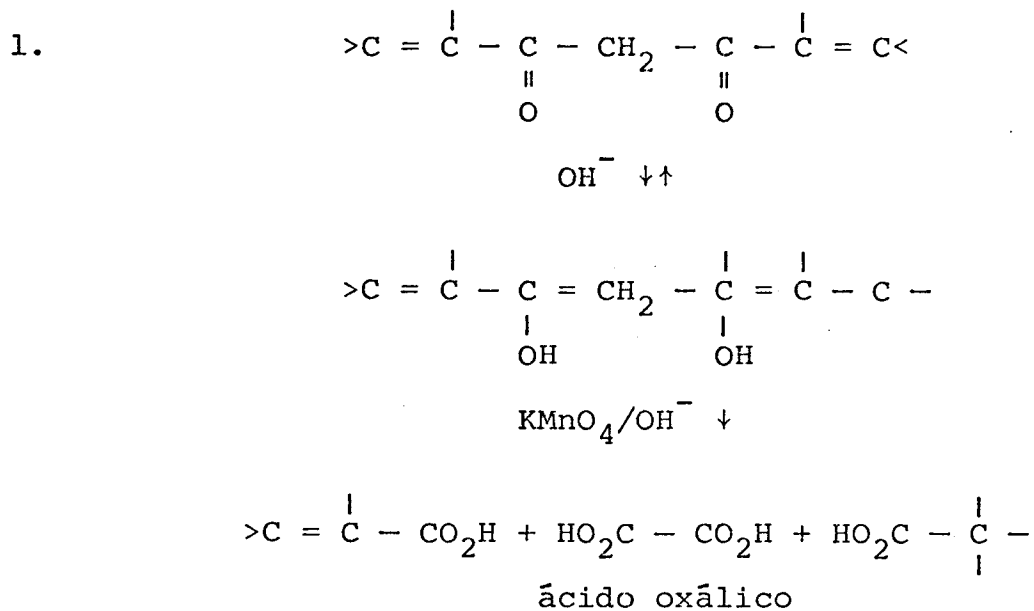
Tendo por base os ácidos identificados bem como a existência de grupos carbonila e hidroxila α , β -insaturados na melanoidina e considerando também o resultado da reação com hipiodito, poderiam estar presentes na molécula da melanoidina as seguintes estruturas:



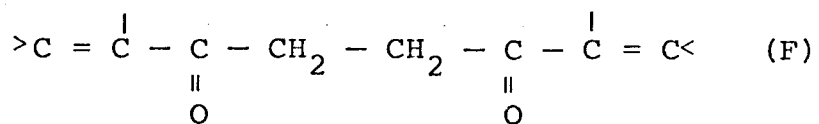
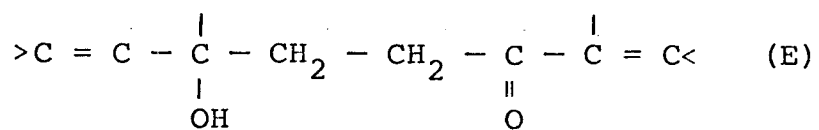
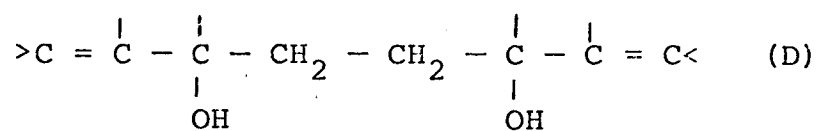
As estruturas A e B por oxidação com permanganato em meio alcalino poderão resultar na estrutura C:



A estrutura C por sua vez poderá sofrer diferentes transformações:

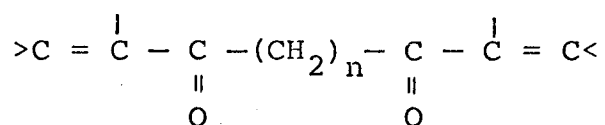
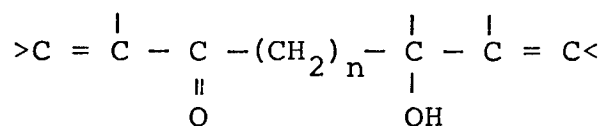
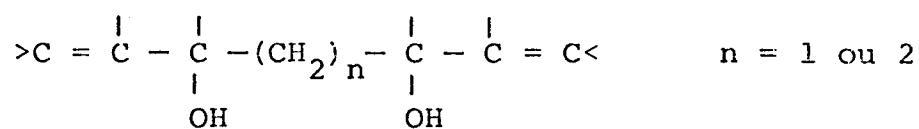


A identificação do ácido succínico na oxidação da melanoidina com permanganato sugere a possibilidade das seguintes estruturas na melanoidina:



VII. CONCLUSÕES

- A) A composição e estrutura das melanoidinas preparadas a partir de frutose e glicina, foram determinadas pelo pH do meio de reação. Num mesmo pH a concentração dos reagentes e a temperatura da reação não tiveram efeito significativo na molécula.
- B) Na formação das melanoidinas solúveis o aumento da concentração dos reagentes e da temperatura de reação podem provocar a formação de mais moléculas de melanoidina de menor peso molecular.
- C) A alta absortividade das melanoidinas na região visível do espectro, está na dependência direta de estruturas carbonílicas α , β -insaturadas, provavelmente formando sistemas com extensa deslocalização dos elétrons π .
- D) As moléculas das melanoidinas contêm os seguintes grupos funcionais: hidroxila, amina, carbonila e insaturação olefínica.
- E) As melanoidinas solúveis contêm pelo menos 3 mols de grupos amínicos primários, 39 mols de grupos hidroxilas acetiláveis e duplas ligações carbono, carbono capazes de adicionar 107 mols de bromo por mol de melanoidina (PM = 114000).
- F) As moléculas das melanoidinas solúveis podem conter as seguintes estruturas:



G) Os grupos ácidos tituláveis presentes nas melanoidinas solúveis são representados por hidroxilas enólicas.

H) Nas melanoidinas solúveis existem pelo menos 14 mols de grupos enólicos tituláveis por mol de melanoidina (PM = 11400).

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SCHMIEDEBERG, O. - In: DANEHY, J.P. e PIGMAN, W.W. - "Reactions between sugars and nitrogenous compounds and their relationship to certain food problems". Advances in Food Research 3: 241-290, 1951.
2. SAMUELY, F. - In: DANEHY, J.P. e PIGMAN, W.W. - "Reactions between sugars and nitrogenous compounds and their relationship to certain food problems". Advances in Food Research 3: 241-290, 1951.
3. MAILLARD, M.L.C. - "Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoidines par voie méthodique. Compt. rend. 154: 66-68, 1912."
4. MAILLARD, M.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.
5. MAILLARD, M.L.C. - "Formation des matières humiques par action de polypeptides sur les sucres". Compt. redn. 156: 1159-1160, 1913.
6. STOLTZENBERG, H. - "Die farbstoffe der melasse und entzuckerungsschlempe I". Ber. 49: 2021-2023, 1916.

7. MAILLARD, M.L.C. - "Identité des matières humiques de synthèse avec les matières humiques naturelles". Ann. Chim. 7: 113-152, 1917.
8. RIPP, B. - In: DANEHY, J.P. e PIGMAN, W.W. - "Reactions between sugars and nitrogenous compounds and their relationship to certain food problems". Advances in Food Research 3: 241-290, 1951.
9. AMBLER, J.A. - In: DANEHY, J.P. e PIGMAN, W.W. - "Reactions between sugars and nitrogenous compounds and their relationship to certain food problems". Advances in Food Research 3: 241-290, 1951.
10. DU TOIT, M.M.S. & PAGE, H.J. - In: DANEHY, J.P. e PIGMAN, W.W. - "Reactions between sugars and nitrogenous compounds and their relationship to certain food problems". Advances in Food Research 3: 241-290, 1951.
11. ENDERS, C. & FRIES, G. - In: DANEHY, J.P. e PIGMAN, W.W. "Reactions between sugars and nitrogenous compounds and their relationship to certain food problems". Advances in Food Research 3: 241-290, 1951.
12. ENDERS, C. & THEIS, K. - In: DANEHY, J.P. e PIGMAN, W.W. "Reactions between sugars and nitrogenous compounds and their relationship to certain food problems". Advances in Food Research 3: 241-290, 1951.

13. ENDERS, C. - In: DANEHY, J.P. e PIGMAN, W.W. - "Reactions between sugars and nitrogenous compounds and their relationship to certain food problems". Advances in Food Research 3: 241-290, 1951.
14. SHALYGIN, A.F. - In: DANEHY, J.P. e PIGMAN, W.W. - "Reactions between sugars and nitrogenous compounds and their relationship to certain food problems". Advances in Food Research 3: 241-290, 1951.
15. WEAST, C.A. & MACKNNEY, G. - "Nonenzymatic darkening of fruits and fruit products". Ind. Eng. Chem. 33: 1408, 1941.
16. ENDERS, C. - "Über den chemismus der huminsäurebildung unter physiologischen bedingugen. III. Die abhängigkeit von verschiedenen faktoren bildungsgeschwindigkeit, eigenschaften und zusammensetzung der aus methylglyoxal und glykokoll gebildeten huminsäuren. Biochem. Z. 313 , 352-371, 1943.
17. ENDERS, C. & FUHLROTT, R. - In: DANEHY, J.P. e PIGMAN, W.W. - "Reactions between sugars and nitrogenous compounds and their relationship to certain food problems". Advances in Food Research 3: 241-290, 1951.
18. KRETOVICH, V.L. & TOKAREVA, R. - "Interação de aminoácidos e açúcares a altas temperaturas". Biokhimiya 13, 508 515, 1948.

19. 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.
20. 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.
21. CARSON, J.F. & OLCOTT, H.S. - "Brown condensation products from acetaldehyde and aliphatic amines". J. Am. Chem. Soc. 76: 2257-2259, 1954.
22. 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.
23. BINKLEY, W.W. - "Action of bromine on the dialysed browning product from cane final molasses". Intern. Sugar J. 60: 62-64, 1958.
24. 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.
25. 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.

26. BINKLEY, W.W. - "The isolation by membrane diffusion of certain browning products from cane final molasses". In tern. Sugar J. 62: 187-189, 1960.
27. 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.
28. ADRIAN, J. - "La reaction de Maillard. II. Étude du comportement de six acides aminés purs". Ann. Nutr. Aliment. 17 (2): 1-35, 1963.
29. REINEFELD, E. & MUSSAWI-BARAB, M.H. - "Molasses coloring materials". Zucker 16: 322-329, 1963. In: Chem. Abs. - 64: 5282b, 1966.
30. CLARK, A.V. & TANNENBAUM, S.R. - "Isolation and characterization of pigments from protein-carbonyl browning systems". J. Agr. Food Chem. 18 (5): 891-894, 1970.
31. KHARIN, S.E.; KOLSHEVA, R.A. & SAPRONOV, A.R. - "Análise da polidispersão de melanoidinas". Izv. Vyssh. Ucheb. Zaved., Pishch. Tekhnol. 1971 (3): 161-165. In: Chem. Abs. 75: 108699x, 1972.
32. SELEMENEV, V.F.; CHIKIN, G.A.; VEISSENBERG, N.V.; ZAV'YALOVA, T.A.; UGLYANSKAYA, V.A. & SHAMRITSKAYA, I.P. - "Estrutura de melanoidinas e dos produtos da decomposição

- alcalina do açúcar invertido". Sakh. Prom. 46 (2): 7-11, 1972. In: Chem. Abs. 76: 129152z, 1972.
33. 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.
34. BINKLEY, W.W. - "Studies on the browning products of cane final molasses". Abstracts of papers, American Chemical Society 168, CARB 14, 1974.
35. YOUNG, D.K.; SPRANG, S.R. & YEN, T.F. - "Studies of the precursors of naturally-occurring organic components in sediment". Prepr., Div. Pet. Chem., Am. Chem. Soc. 19 (4): 769-775, 1974. In: Chem. Abst.: 167587t, 1976.
36. 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.
37. 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.

38. MOTAI, H. - "Viscosity of melanoidins formed by oxidative browning. Validity of the equation for a relationship between color intensity and molecular weight of melanoidin". Agr. Biol. Chem. 40 (1): 1-7, 1976.
39. BARBETTI, P. & CHIAPPINI, I. - "Fractionation and spectroscopic characterization of melanoidic pigments from a glucose-glycine non-enzymatic browning system". Ann. Chim. (Roma) 66 (5-6): 293-304, 1976.
40. 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.
41. GOMYO, T. & HORIKOSHI, M. - "On the interaction of melanoidin with metallic ions". Agr. Biol. Chem. 40 (1): 33-40, 1976.
42. MEYBECK, A. - "A spectroscopic study of the reaction products of dihydroxyacetone with aminoacids". J. Soc. Cosmet. Chem. 28: 25-35, 1977.
43. LEITE, S.R.A. - "Propriedades de melanoidinas obtidas por reação entre glucose e glicina. 114 pp. Campinas, 1979 (Tese - Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola - Universidade Estadual de Campinas).

44. SOMOGYI, M. - "A new reagent for the determination of sugars". J. Biol. Chem. 160: 61-68, 1945.-
45. NELSON, N. - "A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose". J. Biol. Chem. 153: 375-380, 1944.
46. KOCH, F.C. & MCMEEKIN, T.L. - "A new nesslerization micro kjeldahl method and a modification of the Nessler-Folin reagent for ammonia". J. Am. Chem. Soc. 46: 2066-2069 , 1924.
47. FEIGL, F. - "Spot tests in organic analysis". Amsterdã , Elsevier Publishing Co., 1966.
- a) p. 241
 - b) p. 244
 - c) p. 210
 - d) p. 182
48. SHRINER, R.L. & FUSON, R.C. - "The identification of organic compounds - A laboratory manual". 3^a edição. Nova Iorque, John Wiley & Sons, Inc., 1948.
- a) p. 138
 - b) p. 165
49. THEORELL, H. - "Sedimentationskonstante und moleculargewicht des myoglobins". Biochem. Z. 268: 46-54, 1934.

50. SCHWERT, G.W. & KAUFMAN, S. - "The molecular size and shape of the pancreatic proteases". J. Biol. Chem. 190 (1): 807-816, 1951.
51. 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.
52. WILLIAMS, R.C.Jr. & RAJAGOPALAN, T.G. - "Ultracentrifugal characterization of pepsin and pepsinogen". J. Biol. Chem. 241 (21): 4951-4954, 1966.
53. LOEB, G.I. & SCHERAGA, H.A. - "Hydrodynamics and thermodynamic properties of bovine serum albumin at low pH". J. Phys. Chem. 60 (7): 1633-1644, 1956.
54. SMITH, M. - "Dissolving metal reductions". In: AUGUSTINE, R.L. - "Reduction - Techniques and applications in organic synthesis". Nova Iorque, Marcel Dekker, Inc., 1968, p.155.
55. STEWART, R. - "Oxidation by permanganate". In: WIBERG, K.B. - "Oxidation in Organic Chemistry - Part A". Nova Iorque, Academic Press, 1965. p. 47 e p. 52.
56. SPARK, A.A. - "Role of amino acids in non-enzymic browning". J. Sci. Fd. Agric. 20: 308-316, 1969.

RESUMO

Foram preparadas melanoidinas usando-se frutose nas concentrações 1,25 e 2,50 M e glicina 0,66 e 1,32 M, nos pH 3,0 e 6,0 e nas temperaturas 70,0, 80,0 e 90,0°C. As melanoidinas obtidas a pH 3,0, insolúveis em água, foram isoladas por filtração e aquelas a pH 6,0, solúveis, por diálise através de uma membrana de celofane. Dos produtos purificados foram feitas as análises elementares e obtido os espectros infravermelho.

Nas melanoidinas solúveis foram determinados os pesos moleculares e os grupos presentes na molécula. Esses dados aliados à identificação de alguns produtos da degradação oxidativa permitiram sugerir algumas estruturas características, a saber: cetona e álcool α,β -insaturados, β -e γ -dicetonas e diálcoois e β -e γ -hidroxicetona.

ABSTRACT

Melanoidins were prepared using 1.25 and 2.50 M fructose, and 0.66 and 1.32 M glycine at pH's of 3.0, and 6.0 and at temperatures of 70.0, 80.0, and 90.0°C. The melanoidins obtained at pH 3.0 were insoluble in water and were isolated by filtration. Those obtained at pH 6.0 were water soluble and were purified by dialysis using a cellophane membrane. Infrared spectra and elementary analysis were obtained for the isolated melanoidins.

The functional groups and the molecular weights of the soluble melanoidins were determined. These collected data, together with the products identified from oxidative degradation led to suggestions of some possible structures for soluble melanoidins. The structures proposed are: α , β -unsaturated ketone and alcohol, β - and γ -diketones and dialcohols, and β - and γ -hydroxyketones.

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 sua dedicação na orientação deste trabalho.

A Sra. Maria Pio Bueno Birolli e Sra. Alice Cavalcante Bresane, funcionárias responsáveis pela limpeza do laboratório e ao Sr. João Carlos Tosello, técnico do laboratório.

Aos colegas do laboratório.

Ao Sr. José Pedro Toledo Leite pelo serviço de datilografia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa.