

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

REAÇÃO DE MAILLARD: ESTUDO EM
SISTEMAS-MODELO CONTENDO
DIFERENTES AMINOÁCIDOS

Maria Cecília de Figueiredo Toledo
Engenheira de Alimentos

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 Doutor em Ciências de Alimentos.

1979

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A meus pais e
a meu marido

ÍNDICE

	<u>Página</u>
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
III. MATERIAIS	
A. Reagentes	39
B. Aparelhos	39
IV. MÉTODOS	
A. Métodos de Análise	
1. Medida do escurecimento	41
2. Determinação da glicose	41
3. Determinação de nitrogênio amínico primário ..	41
4. Determinação da lisina	42
5. Dosagem de nitrogênio nas melanoidinas	42
6. Espectros infravermelho das melanoidinas	43
B. Preparação dos sistemas-modelo	43
C. Preparação das melanoidinas	45
V. RESULTADOS	
A. Medida do escurecimento	46
B. Medida do pH	67
C. Consumo de glicose e de nitrogênio amínico primário (-NH ₂)	71
D. Medida da lisina	80
E. Teor de nitrogênio das melanoidinas	86
F. Espectros infravermelho das melanoidinas	87
VI. DISCUSSÃO	
A. Materiais e Métodos	89
B. Resultados	
1. Tratamento cinético do escurecimento	92
2. Comportamento dos aminoácidos, efeito do pH e	

	<u>Página</u>
do íon Cu^{2+}	95
VII. CONCLUSÕES	104
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
RESUMO	122
SUMMARY	123
AGRADECIMENTOS	124

ÍNDICE DE TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
1 - Sistemas-modelo para a reação de Maillard entre glicose (1,25 M) e diferentes aminoácidos a 50°C .	44
2 - Absorbância a 450 nm dos sistemas lys6 e lys6Cu ..	47
3 - Absorbância a 450 nm dos sistemas lys3 e lys3Cu ..	48
4 - Absorbância a 450 nm dos sistemas glu6 e glu6Cu ..	49
5 - Absorbância a 450 nm dos sistemas glu3 e glu3Cu ..	50
6 - Absorbância a 450 nm dos sistemas gly6 e gly6Cu ..	51
7 - Absorbância a 450 nm dos sistemas gly3 e gly3Cu ..	52
8 - Valores dos coeficientes m e n das retas correspondentes à 1. ^a e 2. ^a fase do escurecimento nos vários sistemas	53
9 - Tempo de reação correspondente à intersecção das retas relativas à 1. ^a e 2. ^a fase do escurecimento nos diferentes sistemas	54
10 - Valores das acelerações da 1. ^a e 2. ^a fase do escurecimento (a_1 e a_2) e do tempo de indução (t_1) calculados para os diferentes sistemas	55
11 - Consumo de glicose e de $-NH_2$ e razão molar entre glicose consumida e $-NH_2$ consumido ($G/-NH_2$) nos diferentes sistemas, decorridas 240 horas de reação	79
12 - Consumo de lisina nos diferentes sistemas, decorridas 240 horas de reação	80
13 - Teor de nitrogênio das melanoidinas obtidas a partir de soluções de glicose (1,25 M) e aminoácido - (0,66 M), pH inicial 6,2	86

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1 - Logaritmo da absorbância dos sistemas contendo lisina em relação ao tempo	56
2 - Logaritmo da absorbância dos sistemas contendo ácido glutâmico em relação ao tempo	57
3 - Logaritmo da absorbância dos sistemas contendo glicina em relação ao tempo	58
4 - Absorbância (450 nm) dos sistemas lys6 e lys6Cu em relação ao quadrado do tempo	59
5 - Absorbância (450 nm) do sistema lys3 em relação ao quadrado do tempo	60
6 - Absorbância (450 nm) do sistema lys3Cu em relação ao quadrado do tempo	61
7 - Absorbância (450 nm) dos sistemas glu6 e glu6Cu em relação ao quadrado do tempo	62
8 - Absorbância (450 nm) do sistema glu3Cu em relação ao quadrado do tempo	63
9 - Absorbância (450 nm) dos sistemas gly6 e gly6Cu em relação ao quadrado do tempo	64
10 - Absorbância (450 nm) do sistema gly3 em relação ao quadrado do tempo	65
11 - Absorbância (450 nm) do sistema gly3Cu em relação ao quadrado do tempo	66
12 - Valores do pH dos sistemas lys6 e lys6Cu em relação ao tempo	68
13 - Valores do pH dos sistemas glu6 e glu6Cu em relação ao tempo	69

14	- Valores do pH dos sistemas gly6 e gly6Cu em relação ao tempo	70
15	- Consumo de glicose em relação ao tempo nos sistemas lys6 e lys6Cu	72
16	- Consumo de nitrogênio amínico primário (-NH ₂) em relação ao tempo nos sistemas lys6 e lys6Cu	73
17	- Consumo de glicose em relação ao tempo nos sistemas lys3 e lys3Cu	74
18	- Consumo de nitrogênio amínico primário (-NH ₂) em relação ao tempo nos sistemas lys3 e lys3Cu	74
19	- Consumo de glicose em relação ao tempo nos sistemas glu6, glu6Cu e glu3Cu	75
20	- Consumo de nitrogênio amínico primário (-NH ₂) em relação ao tempo nos sistemas glu6 e glu6Cu	76
21	- Consumo de glicose em relação ao tempo nos sistemas gly6 e gly6Cu	77
22	- Consumo de nitrogênio amínico primário (-NH ₂) em relação ao tempo nos sistemas gly6 e gly6Cu	77
23	- Consumo de glicose em relação ao tempo nos sistemas gly3 e gly3Cu	78
24	- Consumo de nitrogênio amínico primário (-NH ₂) em relação ao tempo nos sistemas gly3 e gly3Cu	78
25	- Cromatograma correspondente ao padrão lisina	81
26	- Cromatograma correspondente à determinação de <u>lisi</u> na no sistema lys6	82
27	- Cromatograma correspondente à determinação de <u>lisi</u> na no sistema lys6Cu	83
28	- Cromatograma correspondente à determinação de <u>lisi</u> na no sistema lys3	84
29	- Cromatograma correspondente à determinação de <u>lisi</u>	

Figura

Página

	na no sistema lys3Cu	85
30	- Espectro infravermelho da melanoidina solúvel do sistema glicose (1,25 M) e lisina (0,66 M), pH 6,2	87
31	- Espectro infravermelho da melanoidina do sistema glicose (1,25 M) e ácido glutâmico (0,66 M), - pH 6,2	87
32	- Espectro infravermelho da melanoidina do sistema glicose (1,25 M) e glicina (0,66 M), pH 6,2 (99) .	88

INTRODUÇÃO

O mecanismo da reação de escurecimento que envolve compostos amina dos, livres ou em proteínas, e açúcares redutores tem sido investi gado desde as observações originais publicadas por L. C. Maillard em 1912.

Os possíveis efeitos fisiológicos e nutricionais da reação de Maillard, como também a sua participação no desenvolvimento de cor e na formação de aromas em alimentos, têm estimulado novas pesqui sas nesse campo.

Grande parte da literatura que trata do mecanismo e da velocidade dessa reação é controvertida, situação esta decorrente da utiliza ção, por diferentes autores, de condições de reações diversas. Na maioria das vezes, a reação entre o aminoácido e o açúcar é enco berta por reações secundárias, induzidas em um dos reagentes pelo emprego de temperaturas elevadas e/ou condições de pH distantes da neutralidade.

Apesar de já haverem sido elucidadas algumas fases da reação de Maillard e identificados alguns intermediários que participam des ta reação, não se pode afirmar hoje que se conhece o seu mecanismo e muito menos a composição e estrutura das melanoidinas formadas.

O objetivo deste trabalho foi o estudo da reação de Maillard en tre glicose e aminoácidos representativos das classes básica, aci da e neutra, a diferentes pH, na presença ou não de íons Cu^{2+} .

O aspecto cinético da reação foi também considerado, principalmente no que diz respeito à velocidade de escurecimento.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

LOUIS CAMILLE MAILLARD foi o primeiro pesquisador a estudar a reação que mais tarde seria conhecida por seu nome. Em 1912, MAILLARD (1) verificou que aquecendo soluções que continham glicina e glicose, as mesmas se tornavam amareladas após determinado intervalo de tempo. Repetindo a experiência com outros aminoácidos e açúcares, o mesmo autor, baseando-se na observação da cor produzida nas soluções, sugeriu para os açúcares a seguinte ordem decrescente de reatividade: aldopentoses, ceto-hexoses, aldohexoses, dissacarídeos redutores, dissacarídeos não redutores. Entre os aminoácidos estudados, o mais reativo foi a alanina, seguido por valina, glicina, ácido glutâmico, leucina, sarcosina e tirosina. As temperaturas empregadas pelo autor variaram entre 34° e 150°C e o pH entre 3,2 e 6,1. Na faixa de temperatura utilizada, a velocidade da reação aumentou com o aumento da temperatura.

BORSOOK e WASTENEYS (2), em 1925, utilizaram potenciometria e o método de Van Slike em investigações relativas à influência do pH na reação de Maillard entre glicose e glicina a 37°C. O pH inicial das soluções variou entre 7,8 e 11,0 e as reações foram feitas em presença de tampão fosfato, sendo que a maior perda de nitrogênio amínico primário ocorreu para o sistema a pH 11,0. Na ausência de glicose não houve perda de glicina em qualquer dos sistemas.

Em 1926, VON EULER e JOSEPHSON (3) mantiveram à temperatura ambiente soluções contendo glicose e glicina a pH entre 5,9 e 9,6 e mediram a rotação ótica das soluções em diferentes intervalos de tempo

durante aproximadamente 30 horas. Foi observado pelos autores que o decréscimo da rotação ótica das soluções aumentava com a alcalinidade do meio de reação, sendo que na ausência de glicina, alcalinidades até pH 10 não tiveram efeito na rotação ótica das soluções de glicose.

WATANABE (4), em 1932, realizou uma pesquisa detalhada relacionada à interação entre vários aminoácidos e açúcares em diferentes relações molares, em meio alcalino. A reação foi acompanhada através do consumo de carboidrato e de nitrogênio amínico primário. No sistema contendo glicose 0,05 M e alanina 0,03 M em tampão fosfato pH 11,9, após 2 horas a 50°C, 92,3% da glicose e 15,8% do aminoácido haviam sido transformados. A pH 10,4 as perdas de açúcar e aminoácido depois de 7 horas de reação foram, respectivamente, 76,1% e 39,9%. Nesse mesmo intervalo de tempo, no sistema a pH 9,2 houve um consumo de 25,6% de glicose e 25,5% de alanina. Soluções puras de glicose e de alanina nas mesmas condições sofreram, respectivamente, as seguintes perdas: 97,9% e 11,3% a pH 11,9; 77,8% e 12,7% a pH 10,4 e 25,7% e 4,9% a pH 9,2. O autor considerou que existiu um efeito catalítico do açúcar ou de seus produtos de degradação na reação de desaminação do aminoácido e que os açúcares mais susceptíveis à degradação alcalina eram os catalisadores mais efetivos para a desaminação dos aminoácidos. Com relação à glicose, a ordem decrescente de aceleração da reação para os aminoácidos estudados foi: ácido glutâmico, glicina, alanina, leucina e lisina.

WEBB (5), em 1935, observou que o escurecimento de uma solução a 5% de lactose aquecida a 120°C durante 20 minutos era catalisada

por íons Cu^{2+} e Fe^{2+} e retardada por íons Sn^{2+} . O mesmo autor verificou também que a presença de fosfato, oxigênio, aminoácidos e sais de amônio na solução de lactose acelerava o escurecimento.

FRANKEL e KATCHALSKY (6), em 1937, usando potenciometria no estudo da reação de Maillard, verificaram que glicina e alanina não reagiam com frutose, sacarose ou rafinose e concluíram que um grupo aldeídico seria necessário para a reação. Pelos dados obtidos, foi sugerida a seguinte ordem decrescente de reatividade para os diferentes açúcares estudados: carboidratos acíclicos, monossacarídeos cíclicos, dissacarídeos redutores. Os mesmos autores ainda observaram que em pH 11,0 ocorria uma inibição da reação de Maillard e consideraram a possibilidade de que em pH alcalino, mesmo à temperatura ambiente, seria favorecida a decomposição do açúcar, podendo os produtos desta decomposição reagir com os amino-grupos dos aminoácidos, diminuindo o nitrogênio livre e levando ao aparecimento de coloração escura.

Posteriormente, FRANKEL e KATCHALSKY (7) pesquisaram a influência do tempo de reação na queda do pH em sistemas contendo aminoácido e açúcar a 20°C . Não foi observada variação dos valores iniciais do pH nos sistemas que continham açúcares não redutores, enquanto que para os sistemas contendo açúcares redutores o pH decresceu rapidamente, atingindo um valor constante após cerca de 30 minutos de reação.

Em 1940, CANTOR e PENISTON (8) estimaram a quantidade da forma aldeídica de 4 hexoses e 4 pentoses em soluções aquosas a diferentes pH e concentrações. Os autores demonstraram que o equilíbrio

do açúcar em solução era muito sensível a mudanças de pH, temperatura e concentração. Para a glicose 0,25 M, a 25°C e a pH 7,0, a porcentagem da forma aldeídica em solução foi 0,024%.

Em 1941, KATCHALSKY (9) calculou através de medidas potenciométricas as constantes de equilíbrio da reação da glicose com glicina, alanina, leucina e peptídeos destes aminoácidos, na faixa de pH entre 7 e 9, supondo que a reação que ocorria era bimolecular e envolvia a glicose e o ânion do composto aminado. Os sistemas-modelo usados foram soluções de aminoácido ou de peptídeo e glicose, nas proporções de 1:9, 3:7, 5:5, 7:3 e 9:1, respectivamente, mantidas a 23°C por 5 a 6 dias. Pelos resultados obtidos, o autor concluiu que para peptídios alifáticos simples as constantes de equilíbrio da reação destes compostos com glicose dependiam principalmente do aminoácido terminal do peptídeo.

Nesse mesmo ano, FRANKEL e KATCHALSKY (10) verificaram que a porcentagem de aminoácido que reagia em sistemas contendo aminoácido e açúcar, era menor quando o pH do sistema estava abaixo do ponto isoelétrico do aminoácido.

Ainda os mesmos autores (11), em 1941, estudaram a reação entre glicose e glicina em soluções 0,1 M de aminoácido e 1,0 M de açúcar, a pH 7,0, 8,0, 8,5, 9,0 e 9,2, à temperatura ambiente. O pH das soluções foi medido em intervalos de tempo pré-estabelecidos durante 48 horas. Por titulação, foi determinada a quantidade de álcali necessária para manter o pH inicial das soluções. Com os resultados obtidos, os autores calcularam a porcentagem de glicina combinada com glicose no decorrer da reação, tendo sido verifi

cado que a quantidade total de álcali adicionada quando a reação atingia o equilíbrio era máxima em pH próximo de 9,0.

RICE et al (12), em 1947, pesquisando a formação de cor em sistemas contendo furfural e diferentes aminoácidos, verificaram que ácido aspártico e arginina exerciam um efeito acelerador no escurecimento de soluções de furfural e que este efeito era crescente com o aumento do pH no intervalo de 3,3 a 6,8. Foi também observado pelos referidos autores que a duplicação da concentração de furfural dobrava praticamente a velocidade de desenvolvimento de cor.

Em 1947, WOLFROM et al (13), através do emprego de derivados apropriadamente metilados, demonstraram que:

- a) a enolização do açúcar era importante na reação que resultava na formação de substâncias coloridas, quando se aquecia soluções de glicose contendo glicina ou ácido glutâmico em meio alcalino;
- b) o hidrogênio do amino-grupo e o hidrogênio do carbono adjacente ao grupo carboxílico da glicina eram envolvidos simultaneamente naquela reação em pH ao redor de 5,5;
- c) o amino-grupo livre somente era necessário para a referida reação em meio levemente alcalino, em torno de pH 7,5.

LEWIS et al (14) estudaram, em 1949, o escurecimento de sistemas contendo glicose e sais de ácido acético ou oxálico, fumárico, cítrico, tartárico e lático, mantidos sob nitrogênio a 100°C por 72 horas. Foram também preparadas misturas contendo glicina e glicose nas mesmas condições, tendo os referidos autores constatado

que embora o desenvolvimento de cor ocorresse em todos os sistemas, o escurecimento era mais rápido na presença de citrato do que de glicina.

Estudando o efeito da adição de glicina no escurecimento de sistemas contendo xilose ou glicose, WOLFROM et al (15), em 1949, observaram que tanto o furfural como o HMF podiam formar produtos altamente coloridos com glicina.

Em 1949, LEA e HANNAN (16) estudaram o escurecimento e a perda de nitrogênio amínico livre da caseína na presença de glicose, em função da atividade da água, do pH e da temperatura dos sistemas. Utilizando pH entre 3,0 e 8,0 e temperaturas variáveis entre 25°C e 70°C, os autores verificaram que a perda de nitrogênio amínico da caseína era crescente com o aumento do pH e da temperatura, sendo maior quando a umidade relativa era 70%.

Em 1950, LEA (17) verificou que durante o estágio inicial da interação entre caseína e glicose, a combinação da glicose com amino-grupos livres da proteína ocorria numa relação de praticamente 1:1 e predominava sobre as outras reações. As técnicas utilizadas pelo autor nesse trabalho incluíram o método de Van Slike e a dosagem de glicose com glicose oxidase.

Posteriormente, LEA e HANNAN (18) observaram que a reação de escurecimento em soluções contendo caseína e glicose era limitada pelo teor de água do sistema. Segundo os autores, durante a reação entre caseína e glicose ocorriam perdas de nitrogênio amínico e tanto o ϵ -amino-grupo como o α -amino-grupo da lisina tinham a mesma reatividade. A quantidade de glicose consumida quando o escure

cimento era máximo foi da ordem de 3 equivalentes de glicose por amino-grupo.

Dando seqüência a suas pesquisas, LEA e HANNAN (19) mostraram que os aminoácidos básicos lisina, arginina e histidina participavam da reação entre caseína e glicose. Os autores observaram que após 5 dias a 37°C, a pH 6,3 e em umidade relativa de 70%, aproximadamente 2/3 da lisina combinavam-se com o açúcar. Depois de 30 dias nas mesmas condições, mais de 90% da lisina haviam reagido com a glicose presente e cerca de 70% da arginina, 60% da metionina, 40% da tirosina, bem como 30% da histidina, haviam se comportado da mesma maneira. Foi também demonstrado pelos mesmos autores que, de toda a lisina que se combinava com a glicose, cerca de 30% eram irreversivelmente perdidos.

Em 1950, THOMPSON (20) observou que proteínas em geral tinham grande afinidade por íons Cu^{2+} e verificou que o complexo proteína-cobre reagia com compostos contendo duplas ligações em estruturas cíclicas, ocasionando uma reação de escurecimento não enzimático.

GOTTSHALK e PARTRIDGE (21), em 1950, estudaram a formação dos produtos da reação entre glicose e lisina em soluções a pH 8,5, aquecidas a 37°C durante 5 dias. Foi verificada a presença de lisina e a presença de um novo composto ainda reativo com ninidrina, presumivelmente um N-glicosídeo. Quando os sistemas de reação foram mantidos por 14 dias nas mesmas condições, os autores verificaram a presença de um terceiro produto, cujo R_f era idêntico ao de um composto detectado após interação da lisina com HMF a pH

8 e a 45°C por 4 dias.

Em 1951, HAUGAARD et al (22) estudaram a reação de Maillard baseada nas mudanças de concentração de nitrogênio solúvel em soluções de glicose saturadas de aminoácido, na presença de um excesso deste composto. Os autores desenvolveram equações cinéticas e propuseram um mecanismo de reação envolvendo as seguintes constantes de velocidade: K_1 , para a formação da base de Schiff; K_2 , para a decomposição da base de Schiff reversível em relação ao aminoácido e K_3 , para a decomposição irreversível da base de Schiff. Os valores encontrados para K_1 foram aproximadamente mil vezes inferiores aos valores de K_2 , enquanto que os valores de K_3 foram cerca de cem vezes superiores aos de K_1 . Embora admitindo uma perda total de açúcar da ordem de 10%, os autores consideraram a concentração do mesmo como constante nos cálculos cinéticos. Através da avaliação simultânea das mudanças de concentração de nitrogênio e carboidrato, ainda os mesmos autores verificaram que os reagentes se combinavam numa relação equimolar. Utilizando também sistemas contendo glicose e glicina em diferentes relações molares e submetidos a refluxo por 5 horas, HAUGAARD et al (22) observaram uma velocidade baixa de escurecimento no início da reação e atribuíram este fato à ausência de intermediários neste estágio da reação. A absorvância desses sistemas a 490 nm variou linearmente com o quadrado do tempo, sendo a inclinação da reta obtida proporcional à concentração inicial do açúcar e ao quadrado da concentração inicial do aminoácido.

BEACHAM e DULL (23), em 1951, realizaram pesquisas envolvendo reações de uma série de aminas primárias e aminas aromáticas com de-

rivados simples de carboidratos. Pelos resultados obtidos, os autores associaram ao aumento da basicidade das aminas uma maior efetividade na promoção do escurecimento. Para os açúcares estudados, a ordem crescente de reatividade foi: glicose, aldeído glicérico, glicolaldeído. Tetrametilglicose e os éteres do glicolaldeído mostraram-se resistentes ao escurecimento, na mesma proporção da sua resistência à hidrólise. Os autores concluíram que a reação de Maillard não envolvia condensação real da amina com o grupo carbonila do carboidrato e que a formação de derivados furânicos não era essencial para o escurecimento. Por outro lado, segundo os mesmos autores, a existência de uma hidroxila em posição α ao grupo aldeídico seria necessária para a ocorrência da reação.

Investigações relativas aos produtos formados pela reação entre glicose e glicina foram realizados por CHICHESTER et al (24) em 1952. Os autores, utilizando técnicas cromatográficas e radiográficas para a separação dos produtos da reação, detectaram a presença de vários intermediários, entre eles o HMF, o qual, em estudos paralelos, não havia produzido escurecimento com glicina.

HANNAN e LEA (25), em 1952, estudaram a reatividade dos amino-grupos terminais da lisina em sistemas que continham glicose com α -N-acetil-lisina ou polilisina. Segundo os autores, muitas das alterações que ocorriam em misturas de glicose e proteína seca a 37°C poderiam ser atribuídas à reação entre glicose e o ϵ -amino-grupo da lisina, sem a participação de outros grupos reativos polares. Foi também observado que até o aparecimento de cor no sistema de reação ocorria uma perda equimolar de glicose e de amino-grupos; o escurecimento que se seguia era então acompanhado por

uma perda de glicose superior à de aminoácido e por uma queda de pH. Os dados obtidos também mostraram que o amino-grupo continuava básico após sua reação com a glicose.

Em 1953, WOLFROM et al (26) realizaram um estudo quantitativo da dependência da reação entre aminoácido e açúcar quanto ao pH do sistema. Foram utilizadas soluções equimolares de xilose e glicina aquecidas a 65°C e 100°C. O desenvolvimento de cor foi acompanhado pela medida da absorvância das soluções a 490 nm. Para as reações a 65°C os valores da constante de velocidade específica para reação de 1.^a ordem, encontrados pelos autores para a reação de escurecimento, foram: 0,02700 hr⁻¹, 0,01040 hr⁻¹ e 0,00076 hr⁻¹ em sistemas com pH iniciais 7,48, 6,65 e 0,70, respectivamente. De acordo com os pesquisadores, entre pH 6,5 e 8,5 teria ocorrido uma catálise básica forte e, no intervalo de pH de 3,0 a 5,0, um efeito catalítico fraco. Abaixo de pH 3,0 a reação foi inibida por ácidos. Os mesmos autores encontraram quantidades altas de furfural em pH inferior a 2,0 e atribuíram a este composto o escurecimento que se verificara em tal sistema, sem que houvesse participação do aminoácido.

HODGE e RIST (27), em 1953, conduziram estudos envolvendo compostos de Amadori e demonstraram a sua participação real na reação de Maillard. Com os resultados obtidos neste trabalho, os autores propuseram as seguintes fases para a reação de Maillard:

- a) condensação entre açúcares redutores e compostos aminados formando N-glicosídeos;
- b) rearranjo espontâneo de N-glicosídeos para desoxiaminocetoses (DAA);

- c) desidratação espontânea de DAA dando redutonas nitrogenadas;
- d) degradação de Strecker dos aminoácidos, provocada pela presença de produtos de cisão e desidratação de DAA;
- e) reação lenta de polimerização das redutonas nitrogenadas, na presença de oxigênio;
- f) reação rápida das redutonas nitrogenadas com aminoácidos, formando pigmentos escuros;
- g) condensação dos aldeídos produzidos pela degradação de Strecker com aldíminas, aminas, aminoácidos e proteínas, e também entre os próprios aldeídos, formando polímeros escuros.

Nesse mesmo ano, GIRI et al (28), utilizando a técnica de cromatografia circular em papel, detectaram a destruição de arginina, lisina e histidina durante autoclavagem de glicose em presença de cada uma das seguintes proteínas: caseína, gelatina, albumina do ovo e fibrina. Os resultados obtidos mostraram perdas de lisina e histidina da ordem de 50%.

SCHWIMMER e OLCOTT (29), em 1953, constataram que a esterificação do grupo aldeídico da glicose resultava numa inibição total do escurecimento e que a presença de um grupo fosfato esterificado com o grupo alcoólico primário do açúcar aumentava a velocidade de formação de cor.

Em 1953, WOLFROM e ROONEY (30) investigaram a influência do conteúdo de água em sistemas contendo xilose e glicina, na relação molar de 1:5, submetidos à temperatura de 65°C sob atmosfera de

nitrogênio. Os autores observaram que o escurecimento era máximo para concentrações de água em torno de 30%, não se verificando escurecimento na ausência de água ou quando seu teor era superior a 90%.

Em 1955, SHROEDER et al (31) estudaram o efeito do pH no escurecimento de sistemas contendo glicose e um dos aminoácidos: lisina, glicina e ácido glutâmico em diferentes relações molares. Além das misturas de aminoácido e açúcar foram preparadas soluções contendo somente glicose ou o composto aminado. Os pH das soluções foram ajustados a valores correspondentes aos pontos isoelétricos dos aminoácidos estudados e também a pH 2,0, 8,0 e 11,0 e os sistemas foram aquecidos em autoclave a 120°C durante 30 minutos. Segundo os autores, os resultados obtidos mostraram que a interação entre aminoácidos e açúcares redutores estava limitada a soluções alcalinas e concluíram que a reação de Maillard e o escurecimento eram reações distintas, podendo ocorrer independentemente, de acordo com o pH e a temperatura do sistema de reação.

O efeito do pH na reação entre açúcar redutor e aminoácido na relação molar de 1:2 foi estudado por KATO (32) em 1956. Os sistemas de reação sofreram aquecimento a 100°C por 60 minutos, após o que foi medida a absorvância das soluções a 450 nm. Os açúcares utilizados neste experimento foram glicose, xilose, frutose e lactose e os aminoácidos foram glicina, alanina e lisina. O comportamento de aminas alifáticas primárias e secundárias e aminas aromáticas foi também avaliado. Com os resultados obtidos, o autor concluiu que o escurecimento ocorrera nos seguintes casos:

- a) em soluções aquosas ácidas, pH de 2 a 5, entre aldoses e

- aminas aromáticas;
- b) em soluções ácidas ou neutras, pH de 3 a 8, entre aldoses e aminoácidos ou aminas alifáticas;
 - c) em soluções alcalinas, pH acima de 8, entre aldoses ou cetoses e aminoácidos ou aminas alifáticas.

O referido autor ainda verificou que ao se duplicar a concentração da aldose e a do composto aminado, a formação de substâncias coloridas aumentava mais de quatro vezes.

Em 1956, PETIT (33) aqueceu a 90°C durante 24 horas soluções equimolares de glicose e glicina e estudou o desaparecimento do aminoácido através da formação do complexo entre os íons Cu^{2+} e glicina. Foi constatado pelo autor que os íons Cu^{2+} reagem não somente com a glicina, mas também eram complexados por um produto intermediário formado durante a reação de Maillard e que Petit considerou como sendo um N-glicosídeo.

A importância dos N-glicosídeos nas reações de escurecimento foi pesquisada por KATO (34) nesse mesmo ano, tendo o autor concluído que tais compostos estavam relacionados à reação de escurecimento em condições de catálise ácida. O autor ainda verificou que a pH 3,2, N-D-xilosil-PABA produzia um escurecimento bem maior do que uma mistura de xilose e PABA e, dessa forma, N-D-xilosil-PABA poderia ser precursor de substâncias coloridas.

Em 1957, LEWIN (35), investigando a interação entre glicose e vários aminoácidos em intervalos de pH de 6,5 a 9,0 e acima de 10,3, observou que na faixa de pH mais baixo, em concentrações de aminoácido acima de 0,015 M, existia uma série de estados de equilíbrio

de pH, enquanto que em faixa mais alta ocorria uma depressão contínua do mesmo.

DUBOURG e DEVILLERS (36), em 1957, fizeram reagir glicina com açúcares redutores em soluções concentradas a 95°C e isolaram e caracterizaram os N-osídios resultantes dessa reação. Tais compostos foram obtidos no início da reação em quantidades significativas e continham praticamente todo o aminoácido que reagira.

ANET (37), nesse mesmo ano, isolou e purificou alguns produtos da reação entre glicose e glicina e glicose e alanina. O autor verificou que tais produtos, quando aquecidos em meio ácido, decompunham-se lentamente formando HMF e outros produtos não identificados, não tendo sido detectada a presença de glicose.

Em 1958, WILLITS et al (38) verificaram que quando ácido glutâmico, alanina ou lisina estavam presentes em soluções de glicose aquecidas a 114°C, somente a lisina causava um aumento significativo no escurecimento. Esse efeito da lisina se tornou mais pronunciado com o aumento da alcalinidade da solução do açúcar, enquanto que o ácido glutâmico e a alanina, como também os aminoácidos básicos arginina e histidina, não mostraram o mesmo efeito acelerador. Com base nos resultados obtidos, os autores consideraram que o número e a posição dos amino-grupos na molécula do aminoácido determinavam sua atividade no mecanismo de escurecimento.

LENTO et al (39), em 1958, estudaram o efeito de diferentes aminoácidos no escurecimento de soluções de glicose a pH 8,0, aquecidas a 114°C. Foram utilizados aminoácidos homólogos de ácidos graxos com cadeias de 2, 3, 4, 5 ou 6 átomos de carbono, contendo

amino-grupos nos carbonos alfa ou ômega ou em ambos. Os resultados obtidos mostraram que os diaminoácidos causavam um escurecimento maior, sendo a lisina o mais efetivo, enquanto que os monoaminoácidos com amino-grupo na posição alfa não tinham praticamente efeito no desenvolvimento de cor da solução de glicose, independentemente do comprimento da cadeia. Os monoaminoácidos com amino-grupo terminal mostraram, por sua vez, comportamento variável, sendo que o aumento do comprimento da cadeia de 2 para 4 átomos de carbono aumentou o escurecimento e o aumento posterior para 5 e 6 átomos de carbono causou um decréscimo do mesmo.

Nesse mesmo ano, NORDIN e KIN (40) verificaram que em soluções diluídas a velocidade de escurecimento de sistemas contendo glicose e aminoácido era limitada, possivelmente pela velocidade de formação de produtos intermediários, entre os quais compostos incolores estáveis.

A mutarrotação, hidrólise e reações de rearranjo de glicosilaminas, manosilaminas e xilosilaminas foram pesquisadas por ISBELL e FRUSH (41) em 1958. Os autores admitiram a participação de um íon amônio acíclico intermediário durante a formação de diglicosilaminas, que ocorreria, por sua vez, através de um mecanismo do tipo transaminação. Foram ainda sugeridos mecanismos intramoleculares para explicar a efetividade de ácidos carboxílicos e compostos metilênicos na promoção do rearranjo de Amadori.

Em 1959, UNDERWOOD et al (42) estudaram o efeito do pH no desenvolvimento de cor em soluções diluídas de glicose, aquecidas a 114°C, contendo um aminoácido com comprimento de cadeia variando de 2 a 6

carbonos e com um α -amino-grupo ou ω -amino-grupo, ou ambos. Os resultados obtidos mostraram que:

- a) a pH 5,0 não ocorria escurecimento;
- b) a pH 6,0 somente os α , ω -diaminoácidos produziam cor;
- c) a pH 6,5 ocorria escurecimento para os ω -aminoácidos com 4 átomos de carbono e para os α , ω -diaminoácidos;
- d) a pH 6,8 a produção de cor se verificava para os α , ω -diaminoácidos e para os ω -aminoácidos com até 4 átomos de carbono na cadeia;
- e) a pH de 7,0 a 9,0 o desenvolvimento de cor se verificava com todos os aminoácidos.

REYNOLDS (43), em 1959, estudou o efeito de alguns sais na reação entre glicose e glicina e observou que a adição de fosfato a pH 3,5 aumentava a velocidade da reação, aumento este proporcional à raiz quadrada da concentração dos íons dihidrogênio fosfato e hidrogênio malato.

ANET (44), em 1959, acompanhou a formação de difrutoseglicina (DFG) em sistemas contendo glicina e glicose aquecidos a diferentes temperaturas e pH e verificou que a formação de DFG aumentava com o aumento do pH e que a sua decomposição era mais lenta em soluções levemente alcalinas. Segundo o autor, a molécula de DFG resultava de um duplo rearranjo de Amadori e diferia da frutoseglicina - quanto à sua maior labilidade, sendo a primeira decomposta espontaneamente em solução dando um rendimento quantitativo de frutoseglicina e compostos carbonílicos não identificados.

Em trabalho subsequente, ANET (45) constatou que DFG era bastante

efetiva no desenvolvimento de cor e considerou que tal comportamento poderia ser devido à presença de seus produtos de decomposição não nitrogenados. Os tempos para 50% de decomposição da DFG a pH 5,5, a 25^o, 40^o, 50^o, 75^o e 100^oC foram 6 dias, 16 horas, 6 horas, 22 minutos e 2 minutos, respectivamente. A velocidade de decomposição da DFG a pH 3,5 foi de 2 a 5 vezes mais lenta e a pH 8,0, de 6 a 10 vezes mais lenta.

Em 1962, POMERANZ et al (46) estudaram o comportamento de diferentes açúcares quando aquecidos em presença de glicina ou lisina na faixa de pH entre 4,6 e 8,9 à temperatura de 114^oC. Com os dados obtidos, os autores sugeriram a seguinte ordem decrescente de reatividade para pentoses: ribose, xilose, arabinose. Entre as hexoses, a galactose foi a mais reativa e a ramnose a menos reativa. Dos dissacarídeos redutores o mais reativo foi a melibiose.

CAMPAGNE (47), em 1962, estudou o comportamento de 24 aminoácidos e de um aminoálcool quanto ao desenvolvimento de cor em presença de glicina. Os resultados apresentados pelo autor mostraram que após 5 dias a 25^oC, a quantidade de aminoácido fixada pela glicose variava conforme o aminoácido estudado e que os aminoácidos ácidos praticamente não reagiam, enquanto que glicina, serina, valina, leucina e treonina eram consumidas em porcentagens que variavam entre 30% e 14%. As perdas em aminoácidos após 24 horas de aquecimento a 105^oC foram, em geral, mais elevadas quanto mais básico o aminoácido.

No ano seguinte, CAMPAGNE (48) investigou a ação da glicose sobre 10 aminoácidos e etanolamina, em relações de 1:2 a 7:1 de glicose

para substâncias aminada. No decorrer das reações foram feitas - análises eletroforéticas e cromatográficas e dosagens de açúcar, sendo que os resultados obtidos mostraram que a reação entre a glicose e a substância aminada dependia da proporção inicial entre os reagentes e que se essa razão fosse inferior a 4, a quantidade de glicose perdida diminuía com o ponto isoeletrico do aminoácido. O consumo dos aminoácidos não apresentou qualquer regularidade com o decréscimo do ponto isoeletrico dos mesmos e variou bastante conforme a concentração dos reagentes presentes no início da reação. Para a etanolamina e para a maioria dos aminoácidos as perdas de glicose aumentaram bastante com o tempo de reação e as de aminoácido se estabilizaram.

Em 1963, BURTON e MACWEENY (49), estudando comparativamente a reatividade de diferentes açúcares aquecidos em soluções aquosas contendo glicina, verificaram que a manose produzia material cromofórico numa velocidade maior que a glicose e atribuíram este comportamento à presença de hidroxilas cis nos carbonos 2 e 3. Segundo os referidos pesquisadores, a reação entre aldose e glicina dependeria inicialmente da estabilidade conformacional da molécula do açúcar, e o efeito acelerador observado em experimentos em que os autores usaram soluções contendo íons fosfato estaria associado a um decréscimo da estabilidade inicial da aldose.

BURTON et al (50) observaram nesse mesmo ano que a velocidade de formação de cromóforos em sistemas contendo glicose ou sacarose com glicina, aquecidos a 40° e 50°C, dependia mais da concentração do aminoácido do que da concentração do açúcar. Foi também verificado que a presença de sulfito diminuía a velocidade de forma

ção de compostos carbonílicos e de compostos fluorescentes, enquanto que na presença de pirofosfato suas velocidades de formação aumentavam. De acordo com os autores, o escurecimento ocorreria após um período de queda rápida de pH e decréscimo de α -amino-nitrogênio, com desenvolvimento e aumento no nível de compostos carbonílicos insaturados, os quais reagiriam rapidamente em presença de glicina, dando finalmente as melanoidinas. BURTON et al concluíram que moléculas grandes de polímeros carbonílicos contendo nitrogênio eram formadas a partir de compostos carbonílicos menores durante o escurecimento de misturas de aminoácido e açúcar.

Em 1963, MARKUZE (51) investigou o efeito da adição de diferentes metais no escurecimento de soluções 0,4 M de glicose e 0,01 M ou 0,02 M de lisina, a pH 6,5 ou 7,0, aquecidas a 60°C. Foi observado que os íons Fe^{3+} e Cu^{2+} tinham um efeito acelerador, enquanto que os íons Sn^{4+} , Sn^{2+} e Mn^{2+} retardavam o escurecimento naqueles sistemas de reação.

ADRIAN (52), em 1963, estudou o comportamento de 6 aminoácidos quando aquecidos a 120°C em soluções contendo glicose e investigou a influência da proporção entre o aminoácido e o açúcar, do tempo e temperatura de aquecimento e do pH na estabilidade e perda do aminoácido durante a reação de Maillard. Os resultados obtidos permitiram ao autor concluir que a estabilidade dos aminoácidos estudados dependia do pH da solução, não se verificando correlação entre destruição de aminoácidos e desenvolvimento de cor, o que significaria, de acordo com o mesmo autor, a ocorrência de diferentes reações durante a reação de Maillard e também mecanismos de reação bastante distintos, conforme o meio fosse ácido ou básico.

Em 1965, MONTGOMERY e DAY (53) verificaram que não havia incorporação de nitrogênio ao polímero formado a partir de n-heptanal e glicina e sugeriram um mecanismo para a formação destes pigmentos poliméricos insaturados. Tal mecanismo envolvia hidrólise de uma imina intermediária, com regeneração do aminoácido, seguido de condensações aldólicas catalisadas pela glicina.

Em 1966, SAUNDERS e JERVIS (54) investigaram o efeito de citrato e de fosfato na reação entre glicose e glicina em soluções aquecidas a 120°C durante 2 horas. Pelos resultados obtidos, os autores concluíram que fosfato e citrato tinham um efeito catalítico aditivo e pronunciado no escurecimento das soluções, sendo ambos ativos em pH ácido e básico.

HOLTERMAND (55), em 1966, preparou soluções contendo diferentes aminoácidos com frutose ou glicose e submeteu os sistemas à temperatura de 80°C por um tempo que variou entre 100 e 200 horas. O isolamento e a análise dos produtos de reação em meio ácido mostraram que após a formação do produto inicial, que envolvia uma relação de 1:1 entre o aminoácido e o açúcar, a polimerização continuava com diferentes proporções entre os dois compostos. As relações entre aminoácido e açúcar encontradas pelo autor durante a polimerização nos diferentes sistemas foram: para glicina, 1:2; para alanina 1:3 e para os ácidos aspártico e glutâmico, 1:4.

Em 1966, SONG et al (56) publicaram dados cinéticos relativos à reação de Maillard em soluções 1 M de glicose e 0,25 M de glicina aquecidas a diferentes temperaturas a pH próximo de 5,5. Os resultados obtidos mostraram que a constante de velocidade para o período

do de indução da reação era independente da concentração de glicina quando se considerava a reação como sendo de pseudo 1.^a ordem. Os autores, em seus estudos cinéticos, consideraram que alguns intermediários de reações paralelas contribuiriam para o escurecimento e que α , β -aldíminas insaturadas seriam formadas até que se atingisse uma concentração de equilíbrio. Foram calculadas também as constantes de velocidade aparente para o período de indução e para a fase de equilíbrio durante o período de formação de melanoidinas. Os referidos autores verificaram ainda que:

- a) HMF era acumulado durante a reação;
- b) a adição de HMF à mistura de reação não eliminava o período de indução;
- c) derivados furânicos não poderiam se formar a partir de trioses e tetroses;
- d) a reação de Maillard era extremamente lenta em condições ácidas que favoreciam a formação de HMF.

À luz de tais observações, os mesmos autores concluíram que HMF não era um intermediário importante para a reação de Maillard e que intermediários enólicos α , β -insaturados participavam efetivamente dessa reação.

Em trabalho subsequente, SONG e CHICHESTER (57) investigaram o mecanismo da fase inicial da reação de Maillard através de estudos auto-radiográficos e espectroscópicos em sistemas de reação contendo glicose e glicina aquecidos a temperaturas diversas. Com os dados obtidos, os autores concluíram que a reação de Maillard em sua fase inicial envolvia a formação de glicosilamina, seguida por sua conversão a aldimina α , β -insaturada, que por sua vez

acumular-se-ia durante o período de indução, sofrendo posteriormente transformações que levariam à formação de melanoidinas. Nesse artigo os autores propuseram também um mecanismo para a formação de melanoidinas.

Em 1967, HEYNS et al (58) estudaram a reação entre hexoses e aminoácidos em metanol a 65°C e acompanharam a formação e decomposição do composto de adição no estágio inicial da reação, através de análises cromatográficas em analisadores de aminoácidos. A reação entre glicose e glicina formou frutoseglicina e difrutoseglicina, sendo que a quantidade máxima destes compostos foi detectado após 6 e 12 horas de reação, respectivamente. Após cerca de 20 horas, foi detectada ainda a presença de glicoseglicina. A reação entre ácido glutâmico e frutose ocorreu rapidamente quando um dos grupos carboxílicos do aminoácido era neutralizado com quantidade equivalente de NaOMe. Nos experimentos com glutamato de sódio os autores observaram a formação de manose-ácido glutâmico em quantidade bastante superior à de glicose-ácido glutâmico. O composto frutose-ácido glutâmico apareceu logo no início da reação e sua quantidade era equivalente a 1/4 dos derivados açúcar-ácido glutâmico formados. Quanto ao sistema que continha lisina e glicose foi observada inicialmente a presença de ϵ -frutose-lisina, seguida pela formação de α -frutose-lisina, sendo que a razão entre os derivados ϵ e α após cerca de 4 horas de reação foi 2,5. Posteriormente foi identificada α , ϵ -difrutose-lisina que, após atingir um máximo de concentração correspondente a 12 horas de reação, passou a formar melanoidinas. A mesma reação feita em presença de frutose mostrou a formação de 6 derivados de lisina monosubstituída, sendo

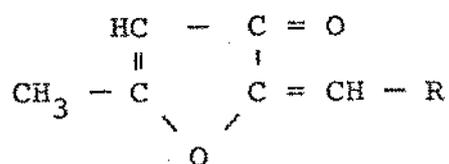
que neste caso a razão entre as lisinas ϵ e α substituídas foi 0,63.

KOEHLER et al (59) pesquisaram, em 1969, o mecanismo de formação de pirazinas alquiladas em sistemas-modelo contendo açúcar e aminoácido refluxados a 120°C por 24 horas. Estudos rádio-isotópicos indicaram que, na formação de pirazina, os açúcares eram a principal fonte de átomos de carbonos, enquanto os aminoácidos forneciam apenas o nitrogênio. Os autores sugeriram possíveis mecanismos para a fragmentação de hexoses em unidades de dois e três átomos de carbono, como também propuseram caminhos para a incorporação dessas unidades menores nas moléculas de pirazinas.

Em 1969, KATO et al (60) pesquisaram os mecanismos de degradação de frutose e glicose pela interação com aminoácidos ou ácidos orgânicos, em soluções aquosas à temperatura de 100°C. As concentrações de açúcar e de glicina nas soluções variaram entre 0,05 M e 2,00 M e o pH inicial foi ajustado na faixa de 2 a 8. Os resultados obtidos mostraram que a frutose escurecia mais rapidamente que a glicose em concentrações baixas de aminoácido e/ou nos estágios iniciais da reação. A glicose foi mais reativa em concentrações altas de aminoácido e/ou após longo período de reação. Em concentrações acima de 0,25 M de cada reagente a absorbância das soluções aumentou linearmente com a concentração dos mesmos, sendo que, para a glicose, a velocidade de escurecimento foi aproximadamente proporcional ao cubo de sua concentração e, para a frutose, a velocidade foi proporcional ao quadrado de sua concentração. Segundo os referidos autores, a formação de glicose-aminoácido ou frutose-aminoácido dependia das concentrações do açúcar e

do aminoácido e a presença de ambos era necessária para a produção de melanoidinas. Para a frutose os autores consideraram que a interação inicial com o aminoácido não era necessária para o escurecimento e que a própria frutose sofreria decomposição, dando compostos carbonílicos reativos que reagiriam a seguir com aminoácidos, formando as melanoidinas. A interação dos açúcares com ácidos orgânicos ou ácido fosfórico mostrou que íons carboxilato e ânion fosfato eram catalizadores da reação de escurecimento, especialmente para a frutose.

Em 1969, FREIMUTH e TRÜBSBACH (61) detectaram a presença de um composto revelável por ninidrina em sistemas contendo proteína e lactose, aquecidos a 96°C. Os autores concluíram que se tratava de um produto secundário da reação de Maillard e propuseram a seguinte fórmula estrutural para seu grupo cromofórico:



SPARK (62), em 1969, investigou as perdas de nitrogênio amínico - livre em soluções 0,66 M de glicina e 1,25 M de açúcar redutor, incubadas a 50°C por tempos variáveis até 2000 horas. O escurecimento foi acompanhado pela leitura da absorbância das soluções a 450 nm e as perdas de nitrogênio amínico primário e o consumo de glicina foram avaliados pelo método de Van Slike e por cromatografia em papel, respectivamente. Para glicose, manose e galactose, a perda de nitrogênio amínico foi linear com respeito ao tempo, sendo que a maior perda verificou-se com o sistema que continha xilose, se-

guida por manose, galactose, glicose, sorbose e frutose. Quanto ao escurecimento, a ordem de reatividade foi a mesma. Os resultados obtidos pelo autor mostraram que existiam poucos intermediários contendo amino-grupos primários nas misturas de reação e que os mesmos eram bastante reativos.

REYNOLDS (63), em 1969, estudou a reação de Maillard em sistemas-modelo contendo glicose, glicina e citrato, na relação molar de 8:1:1, a pH 3,6 e 6,1. Após 10 dias de reação a 50°C, o autor observou no sistema a pH 3,6 perdas de glicina e de glicose na relação molar de 1:2,5; a pH 6,1, a perda de glicose, após 15 dias de reação, foi de 4,5 moles. O mesmo autor detectou ainda a presença de dicetoseamina nas misturas de reação, tendo concluído que a velocidade de decomposição desse composto a pH 3,6 era próxima da sua velocidade de formação.

UMEMOTO et al (64), estudando em 1970 o efeito de traços de íons Fe^{+3} no escurecimento de sistemas-modelo formados por glicose e β -alanina, observaram que estes íons tinham um efeito acelerador, principalmente quando adicionados em estágios mais adiantados da reação. Foi também observado que na presença de íons Fe^{+3} ocorria uma diminuição considerável na formação de frutose-amina e um aumento da formação de 3-desoxi-glicosulose. Segundo os mesmos autores, frutose-amina seria o principal intermediário formado durante a reação de Maillard.

Em trabalho subsequente, UMEMOTO et al (65) pesquisaram o efeito de íons Fe^{+3} na reação de Maillard, utilizando como produto inicial a 1-desoxi-1- β -alanino-D-frutose. Foi verificado que a

adição de íons Fe^{+3} causava um escurecimento imediato da solução com degradação da 1-desoxi-1- β -alanino-D-frutose e um aumento - considerável na formação de 3-desoxi-glicosulose, além do aparecimento de vários compostos contendo carbonilas.

HEYDENREICH (66), em 1971, aqueceu a 40°C soluções de: açúcares, aminoácidos, ácido ascórbico, amins de diferentes graus de alquilação, ácidos orgânicos e sais de vários cátions e misturas destas soluções, verificando que o escurecimento das soluções não dependia do tipo de açúcar nem do aminoácido envolvido. Por outro lado, a concentração desses reagentes afetou a velocidade e a extensão do escurecimento, tendo o autor concluído que o efeito acelerador estava associado à presença de grupos hidroxilas, especialmente quando em estruturas dienólicas.

Em 1971, FLEMING et al (67) verificaram que durante a reação de Maillard entre glicose 0,11 M e lisina 0,01 M a incorporação de nitrogênio nas melanoidinas era progressiva e acompanhava a formação de cor. De acordo com os autores, o maior escurecimento verificado na presença de lisina representaria uma maior conversão da glicose a produtos coloridos de degradação, ao invés de um produto mais intensamente colorido.

JANIČEK e POKORNÝ(68) publicaram, em 1971, os resultados de suas pesquisas mostrando que derivados carbonílicos produzidos pela oxidação de lipídios reagiam com amino-grupos livres com formação de vários produtos de condensação coloridos. Os autores consideraram que em meios onde aldeídos estivessem presentes, particular - mente em meio ácido, a aldolização de produtos primários de rea-

ção formaria compostos com dois ou mais radicais aldeídicos para cada amino-grupo. No caso de hidroxicetonas, nenhuma reação análoga à aldolização ocorreu, pelo contrário, um grupo hidroxicetônico combinou-se com dois amino-derivados.

Em 1972, POWEL e SPARK (69) estudaram o efeito de íons zircônio e íons alumínio no escurecimento de soluções 2,5 M de glicose e 1,0 M de glicina, aquecidas a 50° e 60°C, em pH na faixa de 2,0 a 8,0. A adição de sulfato de alumínio ou zircônio na concentração de 200 ppm mostrou um pequeno efeito inibidor independente da queda do pH, efeito este que, segundo os autores, era bem menos importante que a ação dos sais desses compostos sobre o pH do meio, afetando estágios da reação que dependiam do pH.

EICHNER e KAREL (70), em 1972, pesquisaram a influência do conteúdo de água no escurecimento de sistemas contendo açúcares redutores, glicina, glicerol e polímeros hidrofílicos. Foi observado que a velocidade de escurecimento aumentava com a diminuição do conteúdo de água, exceto em sistemas nos quais a mobilidade dos reagentes se tornava limitada pela viscosidade alta de soluções com atividade de água baixa. Segundo o autor, o efeito inibitório do alto conteúdo de água seria devido ao fato da água ser um dos produtos de várias reações de condensação durante o escurecimento. Os autores consideraram também que as condições ótimas para o escurecimento seriam determinadas pela quantidade de água presente e pelo estado em que a mesma se encontrasse ligada aos diferentes componentes dos sistemas de reação.

MOTAI e INOUE (71), em 1972, prepararam melanoidinas através do

aquecimento de soluções aquosas de glicina e xilose a 100°C por 2 horas. Foram obtidos 8 componentes responsáveis pela cor, os quais, segundo os autores, teriam sido formados através de oxidações sucessivas e eram bastante similares em estrutura química, diferindo apenas no grau de polimerização.

Em 1973, MOTAI (72) investigou a cor de várias melanoidinas produzidas em soluções contendo aminoácido com açúcar ou peptídeo e verificou que a tonalidade da cor das melanoidinas variava com a mudança da razão entre as concentrações dos reagentes. O autor concluiu que os aminoácidos e os peptídios eram os responsáveis pela tonalidade da cor das melanoidinas e que o tipo de açúcar usado não tinha influência neste aspecto. Entre os aminoácidos estudados, a lisina foi o que apresentou absorvância maior a 450 nm, seguida pelo ácido glutâmico e pela glicina.

Nesse mesmo ano, NAMIKI et al (73), estudando a formação de radicais livres em misturas aquosas de arabinose e alanina aquecidas em banho maria, observaram que os radicais livres se formavam num estágio preliminar da reação, antes do aparecimento de cor. Em sistemas que continham somente aminoácido ou açúcar não foi detectada a presença de radicais livres.

BOBBIO et al (74) investigaram, em 1973, o efeito catalítico de citrato, ftalato e fosfato em soluções 1,25 M de glicose, frutose ou xilose e 0,66 M de glicina, aquecidas a 47°C, a pH 6,2 e 2,2. Dos ânions estudados, o fosfato foi o catalisador mais ativo do escurecimento, sendo que o menor efeito catalítico verificou-se para cetoses a pH 6,2.

Em 1974, OMURA et al (75) fizeram reagir triose redutonas (TR) com vários compostos nitrogenados e verificaram que a reação era dependente do pH e que alguns compostos contendo grupos $\overset{|}{-N-OH}$ podiam se combinar com TR.

Nesse mesmo ano, SHINOHARA et al (76) acompanharam o escurecimento de soluções $2,5 \times 10^{-2} M$ de TR e de aminoácido ou peptídeo aquecidas a $90^{\circ}C$ por 4 horas e constataram que nas soluções que continham glicina, histidina, cisteína, arginina, fenilalanina, triptofano ou glicilglicina, o desenvolvimento de cor havia sido marcante. Os autores observaram ainda que o poder redutor das soluções decrescia como decorrer da reação e que compostos redutores reveláveis por ninidrina eram produzidos pela condensação entre TR e alguns aminoácidos.

Em trabalho subsequente, SHINOHARA et al (77) verificaram que íons Cu^{2+} promoviam de modo acentuado o escurecimento em sistemas contendo aminoácido e TR, especialmente quando a proporção entre o aminoácido e a TR estava na relação de 2:1.

KOLKA e SOKOLOWSKY (78), em 1974, estudaram a cinética do rearranjo de Amadori de N-D-glicosídeos de anilina, p-toluidina e p-anisidina, em dioxano, nas temperaturas de $80^{\circ}C$, $90^{\circ}C$ e $100^{\circ}C$. Foi também investigado o efeito catalítico dos ácidos acético e oxálico e do cloreto de zinco na reação. Os autores verificaram que em todos os sistemas o rearranjo de Amadori seguia uma cinética de 1.^a ordem e que a velocidade da reação aumentava com a basicidade do amino-grupo do N-D-glicosídeo. A efetividade dos catalisadores no rearranjo de Amadori, em ordem crescente, foi a seguinte: ácido a

cético, ácido oxálico, cloreto de zinco.

WOLFROM et al (79), em 1974, examinaram o desenvolvimento de cor em soluções contendo açúcar e aminoácido, armazenadas a 65°C, e avaliaram a influência de vários fatores na velocidade e extensão da reação de escurecimento. Pelos resultados obtidos, o autor verificou que:

- a) a reação dependia da proporção relativa entre o aminoácido e o açúcar;
- b) o escurecimento aumentava com o decréscimo da quantidade de água de 80 para 65%, em sistemas contendo glicose e glicina na relação de 1:5;
- c) citrato de potássio acelerava acentuadamente a reação, enquanto que os ácidos cítrico e ascórbico tinham um efeito inibidor;
- d) frutose reagia mais rapidamente que glicose no início da reação;
- e) bissulfito de sódio e várias hidrazinas inibiam de modo marcante o escurecimento de soluções 1:1 de glicose e arginina.

Foram também preparadas pelos mesmos autores soluções de glicose e ácido 4-amino-butírico na proporção de 1:0,105, às quais foram adicionados ácido cítrico, citrato de potássio e ácido ascórbico, a fim de se obter sistemas simulando suco de laranja desidratado. Os sistemas de reação foram liofilizados e então aquecidos a 100°C, tendo sido avaliadas por cromatografia gás-líquido as perdas de glicose e aminoácido nos estágios iniciais da reação. Foi verificado que o conteúdo de aminoácido caía para zero após 10 mi

nutos de aquecimento e que neste mesmo tempo de reação o decréscimo de glicose era de 20%. Com a retirada do aminoácido do sistema não se observou perda de glicose após 40 minutos de reação. Os autores, usando ainda sistemas-modelo, concluíram que dos aminoácidos livres no suco de laranja, o ácido 4-amino-butírico e a histidina eram os mais reativos.

YU et al (80), em 1974, investigando a reação entre ácido ascórbico e vinte aminoácidos, verificaram que o progresso e a extensão do desenvolvimento de cor em sistemas não tamponados dependiam da temperatura, do tempo de incubação, do tipo de aminoácido e da presença de sais. Com exceção da cisteína, todos os aminoácidos reagiram com o ácido ascórbico, sendo que após aquecimento a 44°C por 10 dias, os sistemas que continham glicina, ácido glutâmico ou lisina, apresentaram perdas de ácido ascórbico de 62%, 68% e 74%, respectivamente. Estudando o efeito de sais e de ácidos orgânicos na reação, YU verificou que o fosfato de sódio dibásico acelerava o escurecimento, enquanto que os ácidos fumárico, tartárico e succínico reduziam a formação de cor a 72°C, em sistemas contendo ácido ascórbico e triptofano.

Em 1975, HASHIBA (81) constatou que soluções aquosas de 1-desoxi-1-diglicina-D-frutose (FGG) escureciam mais rapidamente que uma mistura de glicose e diglicina na presença de oxigênio, a 50°C. O escurecimento oxidativo da FGG aumentou de 30 a 40 vezes pela adição de Fe^{2+} enquanto que para a mistura de glicose e diglicina não foi detectado efeito deste metal.

NAMIKI e HAYASHI (82), estudando em 1975 o efeito de oxigênio, temperatura, pH, relação molar dos reagentes e aditivos no desenvol-

vimento de radicais livres durante reações do tipo amino-carbonílica, concluíram que uma estrutura α -hidroxi-carbonílica era necessária para a formação de radicais livres e propôs a seguinte estrutura principal para tais radicais:



CIUSA e MAZZARACCHIO (83) publicaram, em 1975, os resultados de seus estudos sobre a reatividade de vinte aminoácidos com glicose, galactose, arabinose, ribose, maltose ou lactose, em metanol anidro a 80°C. Os resultados obtidos mostraram que a velocidade da reação era maior para pentoses do que para hexoses ou dissacarídeos e que os diferentes aminoácidos se comportavam de maneiras diversas quanto às suas reatividades com os mesmos açúcares. Pela observação da perda de aminoácido livre e da formação correspondente do N-amino-desoxi-ceto-derivado, os autores fizeram uma classificação dos aminoácidos estudados quanto às suas reatividades com monossacarídeos. Dessa forma, arginina, leucina, valina, fenilalanina, histidina, triptofano, metionina, isoleucina e glicina foram classificados como aminoácidos de alta velocidade; alanina, lisina, prolina, treonina, serina e cisteína foram considerados como de média velocidade e, finalmente, ácido glutâmico, tirosina, glutamina, ácido aspártico e cistina foram caracterizados como aminoácidos de baixa velocidade.

Em 1976, WARMBIER et al (84) verificaram que em sistemas-modelo contendo caseína, glicose, glicerol, óleo, celulose microcristalina e água, armazenados a 45°C, a velocidade de escurecimento se-

guia uma cinética de ordem zero após curto período de indução, aumentando linearmente com o aumento de 0,5 para 3,0 da razão molar inicial entre glicose e lisina disponível, enquanto que as velocidades iniciais de utilização de glicose e de perda de lisina obedeciam a uma cinética de 1ª ordem. Os autores ainda observaram que uma perda de 50% da glicose presente não afetava a velocidade do desenvolvimento de cor e que uma quantidade superior a um mol de glicose era utilizada por mol de lisina, o que os levou a concluir que as reações de polimerização eram as controladoras da velocidade de escurecimento e que reações com outros amino-grupos - disponíveis ou regeneração da amina ocorriam nos estágios iniciais da reação.

BARBETTI (85), em 1976, submeteu à temperatura de ebulição soluções 0,01 M de lactose e de glicina a pH 10, 8, 6 e 4 e acompanhou a reação através da absorbância dos sistemas a 285 e 490 nm e pelo decréscimo de pH. Foi observado que as variações das velocidades de escurecimento eram coerentes com o maior e menor abaixamento de pH, exceto para os sistemas a pH 8 e pH 6, onde se verificou uma velocidade maior para pH 6 nas primeiras 39 horas de reação, embora o decréscimo de pH tivesse sido maior para o sistema a pH 8 neste mesmo tempo. Este comportamento, segundo o autor, teria sido devido a um processo inerente não aos estágios iniciais da reação de Maillard, mas a estágios intermediários de produção de compostos heteroaromáticos que influenciavam diretamente os estágios finais do processo de escurecimento. A pH 8 teria sido favorecida a produção de compostos voláteis, não precursores das melanoidinas, que se perdiam da mistura de reação.

Ainda nesse ano, BARBETTI (86) estudou o comportamento de sistemas liofilizados contendo açúcares redutores ou não redutores e aminoácido a pH 6,7, à temperatura de 60°C e umidade relativa de 70%. O autor não observou nas misturas estudadas paralelismo entre escurecimento e decréscimo de pH e concluiu que a variação de pH era devido a um estágio da reação de Maillard que não tinha consequência direta sobre a produção de melanoidinas e seus supostos precursores.

HEYNS e HEUKESHOVEN (87), em 1976, investigaram o mecanismo da reação de hexuloses e hexuloses parcialmente metiladas com aminoácidos, em soluções metanólicas tamponadas a 53°C. Pelos resultados obtidos, os autores verificaram que a velocidade da reação aumentava linearmente com o logaritmo da concentração do tampão acetato/ácido acético e atingia um valor máximo a pH 8,2. Os aminoácidos empregados tiveram uma pequena influência na velocidade total da reação; em contraste, as hexuloses: D-frutose, L-sorbose, 5-O-metil-D-frutose e 5,6-O-dimetil-L-sorbose mostraram uma influência marcante. Foi também encontrada uma relação linear entre reatividade do açúcar e porcentagem de grupo cetônico livre presente no equilíbrio. Os referidos autores concluíram que a velocidade da reação era determinada pelo ataque nucleofílico do amino-grupo do aminoácido ao grupo carbonila da hexulose, sendo que as cetosilaminas assim formadas sofreriam um rearranjo rápido dando os produtos de Amadori correspondentes.

Em 1976, ADRIAN (88) estudou as consequências da reação de Maillard entre xilose e proteínas intactas ou proteínas hidrolizadas. O autor concluiu que para proteínas hidrolizadas a perda to-

tal de nitrogênio amínico era maior, porém os aminoácidos eram destruídos de maneira uniforme, permanecendo inalterado o balanço dos mesmos.

Em 1977, CARDENAS et al (89) acompanharam a reação de escurecimento em sistemas contendo alanina, ácido glutâmico ou ácido aspártico com glicose ou gliceraldeído. O desenvolvimento de cor foi proporcional à concentração do aminoácido e foi maior para a alanina, enquanto que o gliceraldeído mostrou-se mais ativo que a glicose, não apresentando período de indução na formação de cor.

DWORSCHÁK e ÖRSI (90), em 1977, estudaram a reação de Maillard entre glicose e os aminoácidos metionina e triptofano, em soluções aquosas contendo ambos os reagentes em diferentes relações molares. Os sistemas foram tamponados na faixa de pH de 3 a 13 e mantidos a temperaturas entre 110° e 140° C. O consumo de aminoácido e a absorbância das soluções a 465 nm foram medidos em diferentes intervalos de tempo durante 180 minutos. Foi observada para ambos os aminoácidos uma velocidade máxima de reação em relações molares de aminoácido para glicose correspondentes à formação de mono e difrutosil-derivados. Análises cinéticas mostraram que os aminoácidos reagem também com produtos de degradação da glicose, principalmente com trioses, e que na presença de um excesso do açúcar ocorria um aumento na concentração desses produtos de degradação, ocasionando uma mudança na ordem da reação.

Em trabalho posterior, em 1978, ÖRSI e DWORSCHÁK (91) verificaram que durante a fusão de misturas contendo metionina ou triptofano com glicose, um mol do açúcar reagia no máximo com 0,67 mol

de metionina ou 0,43 mol de triptofano. Foi observado pelos autores que 50% da metionina presente reagiam com duas moléculas de glicose, enquanto o restante reagia com apenas uma, e que no caso do triptofano, além do amino-grupo primário, o grupamento amino do anel indol também participava da reação com glicose.

WANG et al (92), em 1978, observaram que íons Cu^{2+} apresentavam um efeito catalítico no escurecimento de soluções 1,25 M de glicose e 0,66 M de glicina a 50°C . Este efeito foi mais acentuado a pH 3,0 do que a pH 6,2, sendo progressivo com o aumento da concentração daquele íon entre 20 e 100 ppm. Os autores consideraram a possibilidade de estabilização da cadeia aberta de glicose por íons Cu^{2+} , aumentando assim as chances de ataque nucleofílico pelo amino-grupo.

OLSSON et al (93), em 1978, submeteram a aquecimento sob refluxo durante 120 horas uma solução aquosa contendo glicose e glicina na relação molar de 3:2, identificando em seguida alguns produtos desta reação. Além de um precipitado marrom, cuja composição elementar foi determinada como sendo $\text{C}_{11,6}\text{H}_{11,4}\text{NO}_{4,0}$, os autores encontraram no sobrenadante 27 compostos compreendendo furanos, piróis, piridina, fenóis, ácidos carboxílicos e lactonas, entre os quais, muitos não haviam sido identificado até então como produtos de degradação de carboidratos. A formação de 12 compostos contendo nitrogênio foi explicada pelos autores através de um esquema baseado na desidratação da glicose, com ou sem a degradação de Strecker da glicina.

III. MATERIAIS

A) Reagentes

A glicose usada nos experimentos era produto puro para análise da marca Merck.

Os aminoácidos eram produtos quimicamente puros das marcas Merck e Riedel-de Hæn.

Para determinação da glicose foram utilizados reagentes específicos da marca Merck.

Os demais reagentes empregados foram produtos puros das marcas Merck, Fisher e Carlo Erba.

Em todos os experimentos utilizou-se água desionizada com uma condutividade inferior a $10^{-6} \text{ Ohm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

B) Aparelhos

Banho de água da marca Braun, com termostato preciso até $0,05^{\circ}\text{C}$.

Potenciômetro Metrohm E-512 com microeletrodo combinado.

Espectrofotômetro visível ultravioleta, modelo Varian 635-D.

Aparelho de Van Slike, modelo 20, da Keyes Scientific Corporation.

Pipeta de Hempel, construída no Instituto de Física da UNICAMP, do tipo descrito por Van Slike (94).

Auto-analisador de aminoácidos de componentes modulados, acoplado a um fotômetro MER 1020 e a um registrador do tipo Honey Well Eletronik 15 Strip Multipoint Recorder, montado no Instituto de Biologia da UNICAMP, com o auxílio financeira da FAPESP.

Espectrofotômetro infravermelho Pye Unicom SP 1000.

IV. MÉTODOS

A) Métodos de análise

1. Medida do escurecimento

Foi feita através de leituras da absorvância das soluções a 450nm, com as diluições necessárias obedecendo ao limite de 1:100 indicado por Spark (62).

2. Determinação da glicose

A glicose foi determinada enzimaticamente com glicose-oxidase, segundo Barham e Trinder (95). Para cada série de determinações correspondentes a um mesmo sistema-modelo, foi construída uma curva padrão com quantidades conhecidas de glicose.

3. Determinação de nitrogênio amínico primário

Foi realizada segundo o método descrito por Van Slike (94) para de terminação manométrica de nitrogênio amínico primário alifático, através da reação com ácido nitroso.

As amostras analisadas foram apropriadamente diluídas de modo a con terem uma quantidade de nitrogênio amínico inferior a 0,6 mg por amostra, teor máximo determinável no aparelho.

A quantidade de nitrogênio amínico primário ($-NH_2$) presente em cada amostra analisada foi calculada através da equação:

$$\text{mg } ^-\text{NH}_2\text{amostra} = \frac{\text{mg } ^-\text{NH}_2\text{padrão} \times \text{pN}_2\text{amostra}}{\text{pN}_2\text{padrão}}$$

onde o quociente $\frac{\text{mg } ^-\text{NH}_2\text{padrão}}{\text{pN}_2\text{padrão}}$ foi calculado para cada determinação feita.

4. Determinação da lisina

Foi feita pelo laboratório de Imunologia Química do Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia da UNICAMP, de acordo com o procedimento descrito por Spackman et al (96), com o uso da escala de sensibilidade alta (25 nanomoles de cada aminoácido dão um fundo de escala de 0,100).

Foi utilizada a coluna para a resolução de aminoácidos básicos, de 13,0 x 1,0 cm, com resina do tipo Aminex A₅, trabalhando com tampão citrato de sódio 0,5 N, pH 5,25.

As áreas correspondentes aos picos obtidos para cada amostra foram comparadas a áreas correspondentes a picos de amostras padrões contendo o aminoácido puro. As referidas áreas foram calculadas pelo método de integração manual por pontos.

5. Dosagem de nitrogênio nas melanoidinas

Foi realizada pelo método micro-Kjeldahl (97).

6. Espectros infravermelho das melanoidinas

Foram feitos em pastilhas de KBr, a 1%.

B) Preparação dos sistemas-modelo

Foram preparadas soluções de glicose e aminoácido, na presença ou não de cloreto cúprico, conforme especificado nos dados da tabela 1.

O pH inicial das soluções foi corrigido pela adição de NaOH ou HCl, conforme o caso.

Foram também preparadas soluções contendo somente glicose na concentração 1,25 M, nas mesmas condições utilizadas para os sistemas-modelo com aminoácido.

As soluções assim preparadas foram distribuídas em tubos de vidro de 10 ml, com tampa rosqueável, vedados com papel "parafilm". Os tubos foram colocados em banho de água à temperatura constante de $50 \pm 0,05^\circ\text{C}$.

Antes dos tubos serem colocados no banho e em diferentes intervalos de tempo durante 240 horas de aquecimento, foram determinados a absorvância, o pH, o conteúdo de glicose e o conteúdo de nitrogênio amínico primário nos sistemas, de acordo com IV - A.1., 2., 3. Nos sistemas glu e glu3Cu não foi determinado o conteúdo de nitrogênio amínico primário. No final do tempo de reação foi feita a determinação do conteúdo de lisina nos sistemas-modelo lys6, lys6Cu, lys3 e lys3Cu, conforme IV - A.4.

TABELA 1 - Sistemas-modelo para a reação de Maillard entre glicose (1,25 M) e diferentes aminoácidos a 50°C.

Sistema modelo	Aminoácido	Concentração do aminoácido (M)	pH inicial	Concentração de Cu ²⁺ (ppm)
lys6	lisina	0,66	6,2	0
lys6Cu	lisina	0,66	6,2	100
lys3	lisina	0,66	3,0	0
lys3Cu	lisina	0,66	3,0	100
glu6	ác.glutâmico	0,66	6,2	0
glu6Cu	ác.glutâmico	0,66	6,2	100
glu3	ác.glutâmico	0,15*	3,0	0
glu3Cu	ác.glutâmico	0,15*	3,0	100
gly6	glicina	0,66	6,2	0
gly6Cu	glicina	0,66	6,2	100
gly3	glicina	0,66	3,0	0
gly3Cu	glicina	0,66	3,0	100

* Molaridade correspondente à solubilidade do ácido glutâmico em água, a 50°C, de acordo com o Merck Index (98). A solução foi equilibrada com um excesso de cristais do aminoácido.

C) Preparação das melanoidinas

As melanoidinas foram preparadas a partir de soluções 1,25 M de glicose e 0,66 M de aminoácido, ajustadas a pH 6,2 e aquecidas durante 48 horas a 90°C. Os aminoácidos utilizados foram a lisina e o ácido glutâmico.

A separação das melanoidinas foi feita segundo o método descrito por Leite (99). As melanoidinas solúveis em água foram separadas do meio de reação por diálise em celofane contra água, durante 48 horas. As soluções obtidas foram evaporadas em banho-maria (50°C) à vácuo, em evaporador rotatório. A melanoidina insolúvel em água foi separada dos demais produtos da reação através de filtração à vácuo e lavagem com água.

Em cada melanoidina obtida foram determinados o teor de nitrogênio e o espectro infravermelho, conforme IV - A.5. e 6.

V. RESULTADOS

A) Medida do escurecimento

Os valores da absorvância dos diferentes sistemas no decorrer das 240 horas de reação encontram-se nas tabelas 2 a 7 e também nas figuras 1, 2 e 3.

Nas soluções contendo somente glicose a pH 6,2 e 3,0, com e sem Ions Cu^{2+} , não foi observado desenvolvimento de cor mesmo após 240 horas de reação.

As figuras 4 a 11 e as tabelas 8, 9 e 10 referem-se ao tratamento matemático dos valores da absorvância dos vários sistemas.

TABELA 2 - Absorbância a 450 nm dos sistemas-modelo lys6 e lys6Cu.

Sistema-modelo	tempo (h)	Absorbância
lys6	0	0,000
	21	0,101
	47	0,790
	74	2,09
	97	3,05
	119	4,23
	143	5,65
	167	6,50
	191	7,98
	216	9,72
	241	11,4
lys6Cu	0	0,000
	8	0,030
	12	0,100
	26	0,520
	46	1,66
	68	2,83
	96	4,10
	120	5,23
	141	6,60
	168	8,60
	192	10,6
	216	12,6
	237	14,8

TABELA 3 - Absorbância a 450 nm dos sistemas-modelo lys3 e lys3Cu.

Sistema-modelo	tempo (h)	Absorbância
lys3	0	0,000
	23	0,007
	46	0,009
	96	0,025
	118	0,055
	142	0,088
	166	0,153
	190	0,226
	215	0,305
	240	0,414
lys3Cu	0	0,000
	23	0,007
	45	0,054
	72	0,199
	95	0,372
	141	0,812
	165	1,04
	191	1,37
	214	1,68
	239	2,04

TABELA 4 - Absorbância a 450 nm dos sistemas-modelo glu6 e glu6Cu.

Sistema-modelo	tempo (h)	Absorbância
glu6	0	0,000
	26	0,020
	42	0,074
	52	0,130
	69	0,284
	92	0,649
	115	1,16
	144	1,97
	161	2,63
	195	3,85
	218	4,93
	238	5,81
glu6Cu	0	0,000
	10	0,020
	24	0,135
	48	0,580
	97	1,95
	119	2,81
	143	3,76
	167	4,76
	193	6,21
	215	7,61
240	9,52	

TABELA 5 - Absorbância a 450 nm dos sistemas-modelo glu3 e glu3Cu.

Sistema-modelo	tempo (h)	Absorbância
glu3	0	0,000
	48	0,000
	92	0,000
	137	0,000
	186	0,001
	238	0,000
	glu3Cu	0
40		0,003
70		0,016
96		0,034
118		0,050
144		0,078
168		0,110
190		0,140
216		0,180
240		0,225

TABELA 6 - Absorbância a 450 nm dos sistemas-modelo gly6 e gly6Cu.

Sistema-modelo	tempo (h)	Absorbância
gly6	0	0,000
	30	0,003
	44	0,020
	55	0,042
	70	0,077
	94	0,205
	117	0,366
	142	0,573
	166	0,871
	189	1,13
	214	1,49
	239	1,89
gly6Cu	0	0,000
	25	0,035
	40	0,085
	72	0,300
	96	0,520
	125	0,885
	144	1,18
	168	1,55
	192	2,00
	216	2,48
240	3,00	

TABELA 7 - Absorbância a 450 nm dos sistemas-modelo gly3 e gly3Cu.

Sistema-modelo	tempo (h)	Absorbância
gly3	0	0,000
	24	0,000
	48	0,000
	72	0,005
	98	0,014
	124	0,029
	140	0,039
	164	0,063
	174	0,076
	188	0,100
	197	0,116
	212	0,152
	223	0,171
	240	0,220
gly3Cu	0	0,000
	28	0,018
	42	0,048
	52	0,078
	74	0,180
	100	0,340
	122	0,560
	139	0,770
	162	1,08
	185	1,50
	196	1,76
	220	2,35
	238	2,85

TABELA 8 - Valores dos coeficientes m e n das retas correspondentes à 1.ª e 2.ª fase do escurecimento nos vários sistemas (Figuras 4 a 11).

Equação geral da reta: $A(450) = m + nt^2$

Sistema-modelo	1.ª fase do escurecimento		2.ª fase do escurecimento	
	m	n	m	n
lys6	-0,077	$3,95 \times 10^{-4}$	2,11	$1,61 \times 10^{-4}$
lys6Cu	-0,017	$7,93 \times 10^{-4}$	1,94	$2,31 \times 10^{-4}$
lys3	-0,027	$5,73 \times 10^{-6}$	-0,086	$8,61 \times 10^{-6}$
lys3Cu	-0,037	$4,54 \times 10^{-5}$	0,148	$3,33 \times 10^{-5}$
glu6	-0,018	$5,41 \times 10^{-5}$	-0,239	$1,08 \times 10^{-4}$
glu6Cu	-0,008	$2,55 \times 10^{-4}$	0,536	$1,54 \times 10^{-4}$
glu3Cu	-0,004	$3,96 \times 10^{-6}$
gly6	-0,017	$1,92 \times 10^{-5}$	0,118	$3,53 \times 10^{-5}$
gly6Cu	-0,002	$5,69 \times 10^{-5}$	0,171	$4,93 \times 10^{-5}$
gly3	-0,014	$2,82 \times 10^{-6}$	-0,092	$5,39 \times 10^{-6}$
gly3Cu	-0,022	$3,81 \times 10^{-5}$	-0,482	$5,86 \times 10^{-5}$

TABELA 9 - Tempo de reação correspondente à intersecção das retas relativas à 1.^a e 2.^a fase do escurecimento nos diferentes sistemas.

Sistema-modelo	tempo (h)
lys6	96
lys6Cu	59
lys3	143
lys3Cu	124
glu6	64
glu6Cu	73
gly6	79
gly6Cu	151
gly3	174
gly3Cu	150

TABELA 10 - Valores das acelerações da 1.^a e 2.^a fase do escurecimento (a_1 e a_2) e do tempo de indução (t_i) calculados para os diferentes sistemas-modelo.

Sistema-modelo	t_i (h)	a_1 ($h^{-2} \times 10^4$)	a_2 ($h^{-2} \times 10^4$)
lys6	14	7,90	3,22
lys6Cu	5	15,9	4,62
lys3	68	0,115	0,172
lys3Cu	29	0,908	0,666
glu6	18	1,08	2,16
glu6Cu	6	5,10	3,08
glu3Cu	30	0,0792	. . .
gly6	30	0,384	0,706
gly6Cu	6	1,14	0,986
gly3	71	0,0564	0,108
gly3Cu	24	0,762	1,17

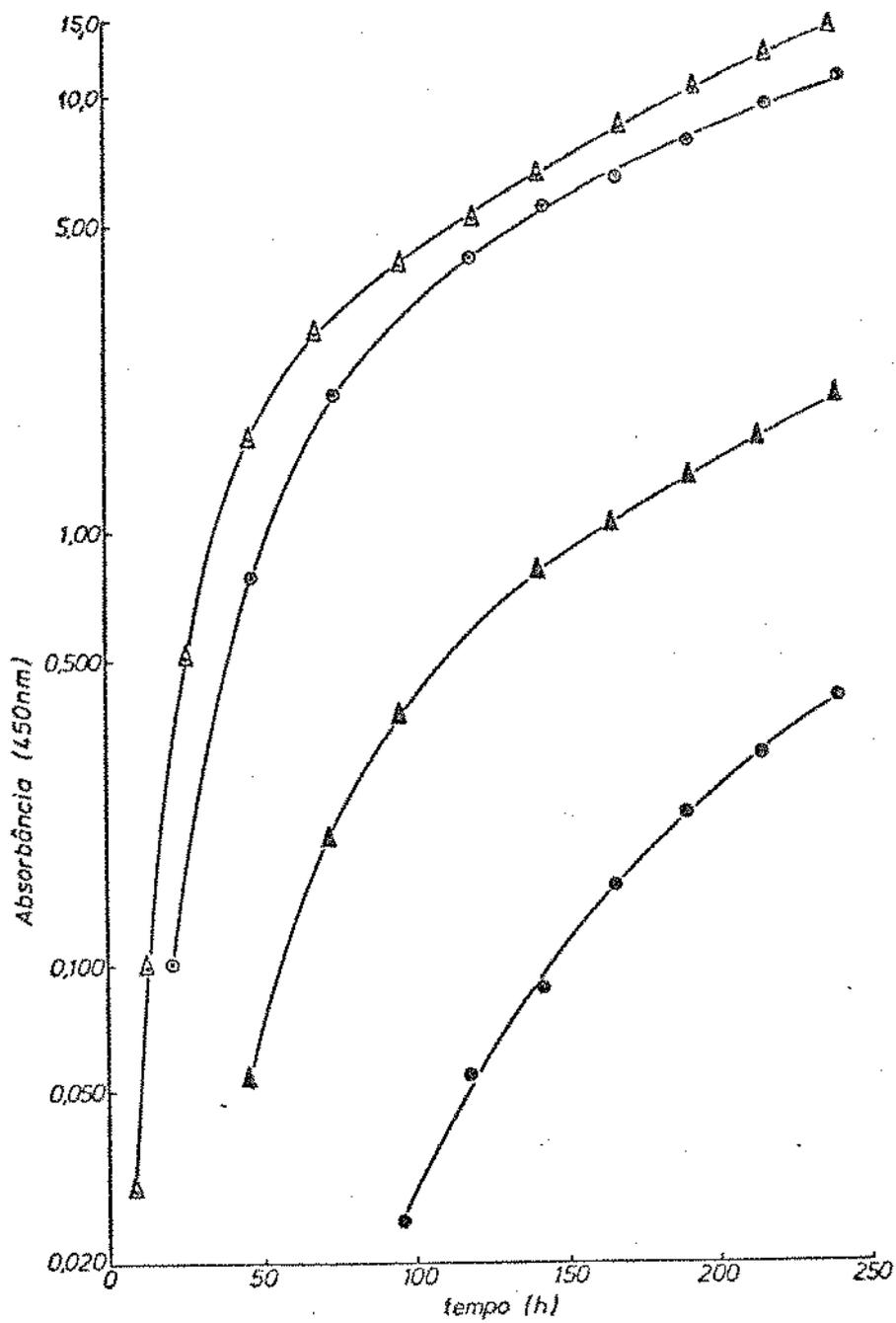


FIGURA 1 - Logaritmo da absorbância dos sistemas contendo lisina em relação ao tempo.

○ lys6 △ lys6Cu ● lys3 ▲ lys3Cu

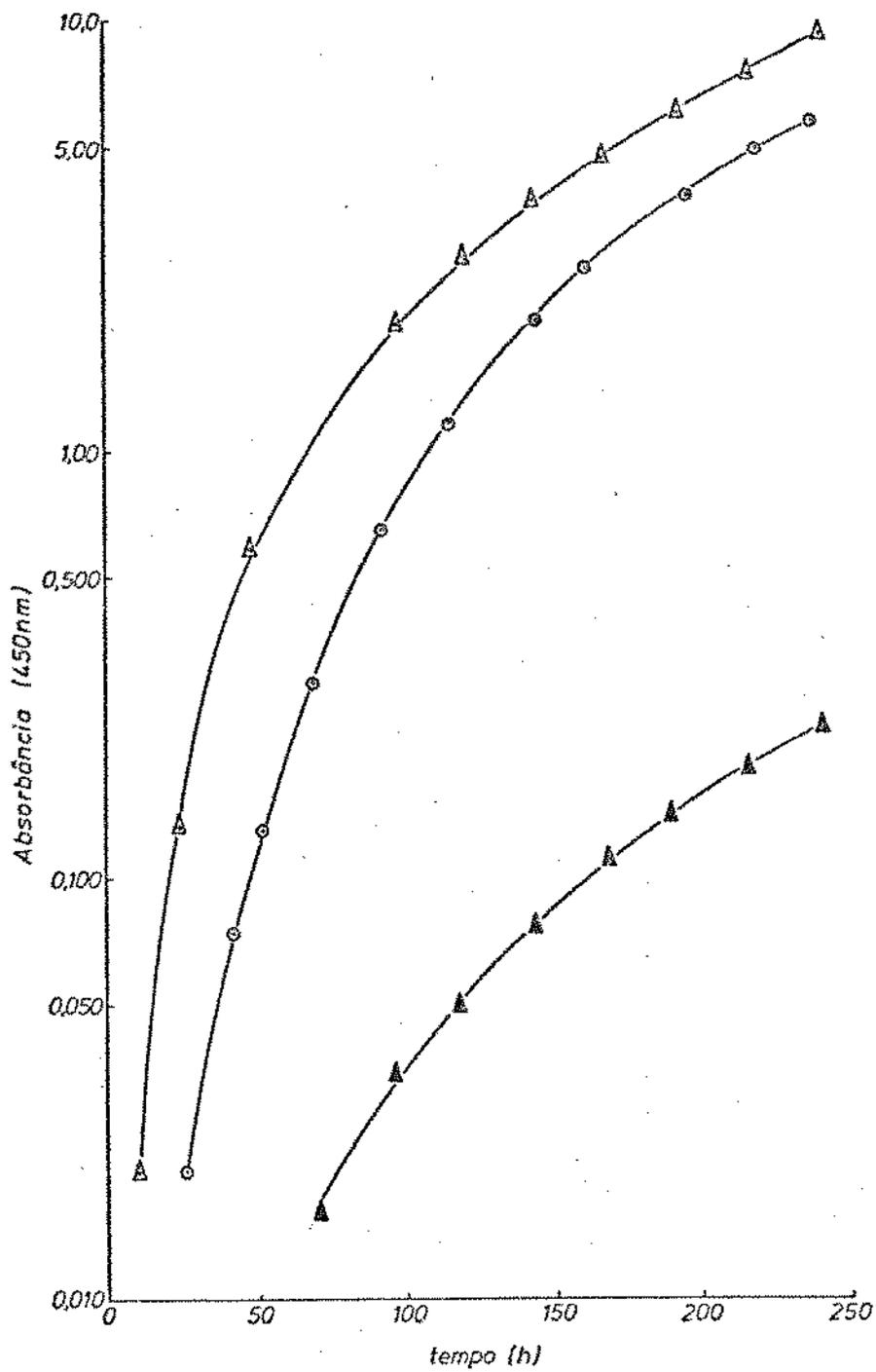


FIGURA 2 - Logaritmo da absorbância dos sistemas contendo ácido glutâmico em relação ao tempo.

○ glu6 △ glu6Cu ▲ glu3Cu

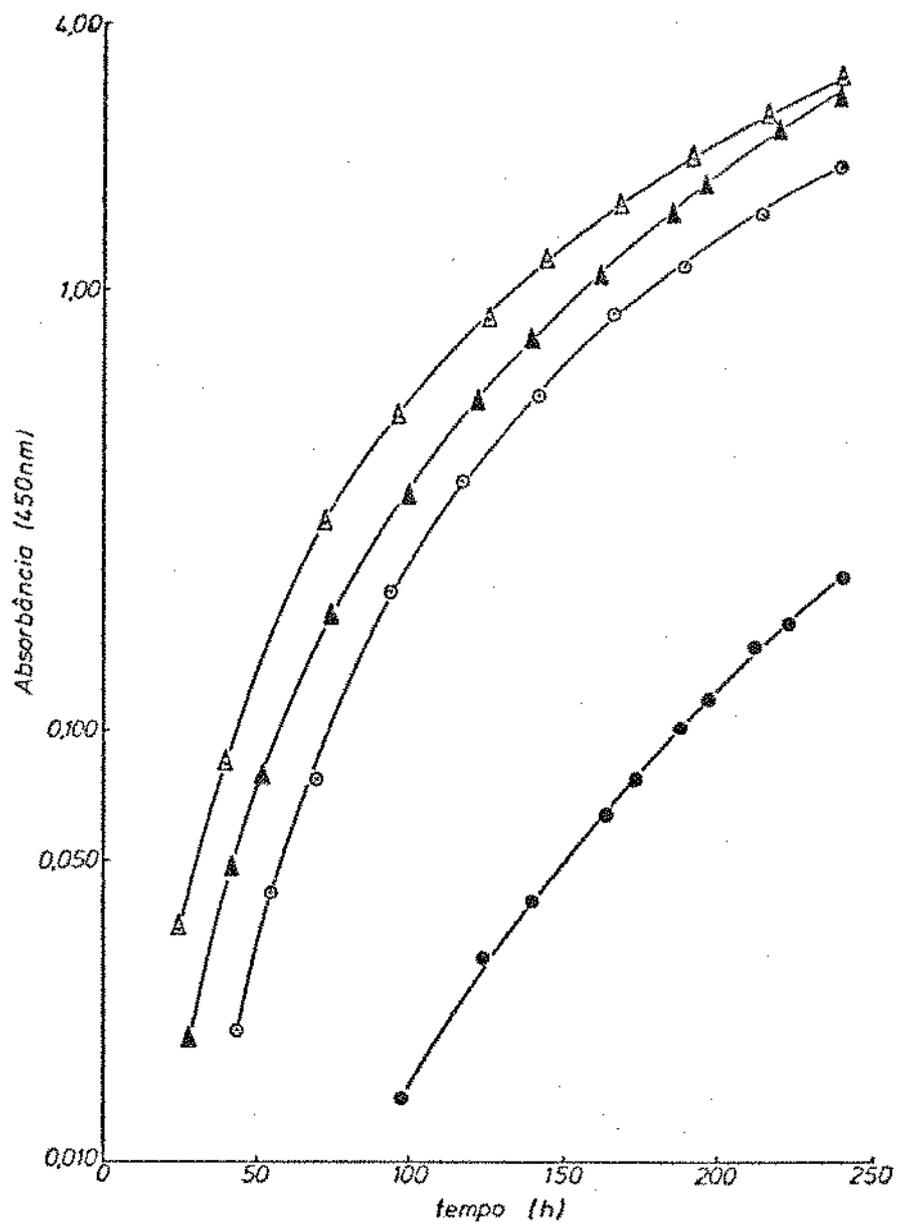


FIGURA 3 - Logaritmo da absorbância dos sistemas contendo glicina em relação ao tempo.
 ○ gly6 △ gly6Cu ● gly3 ▲ gly3Cu

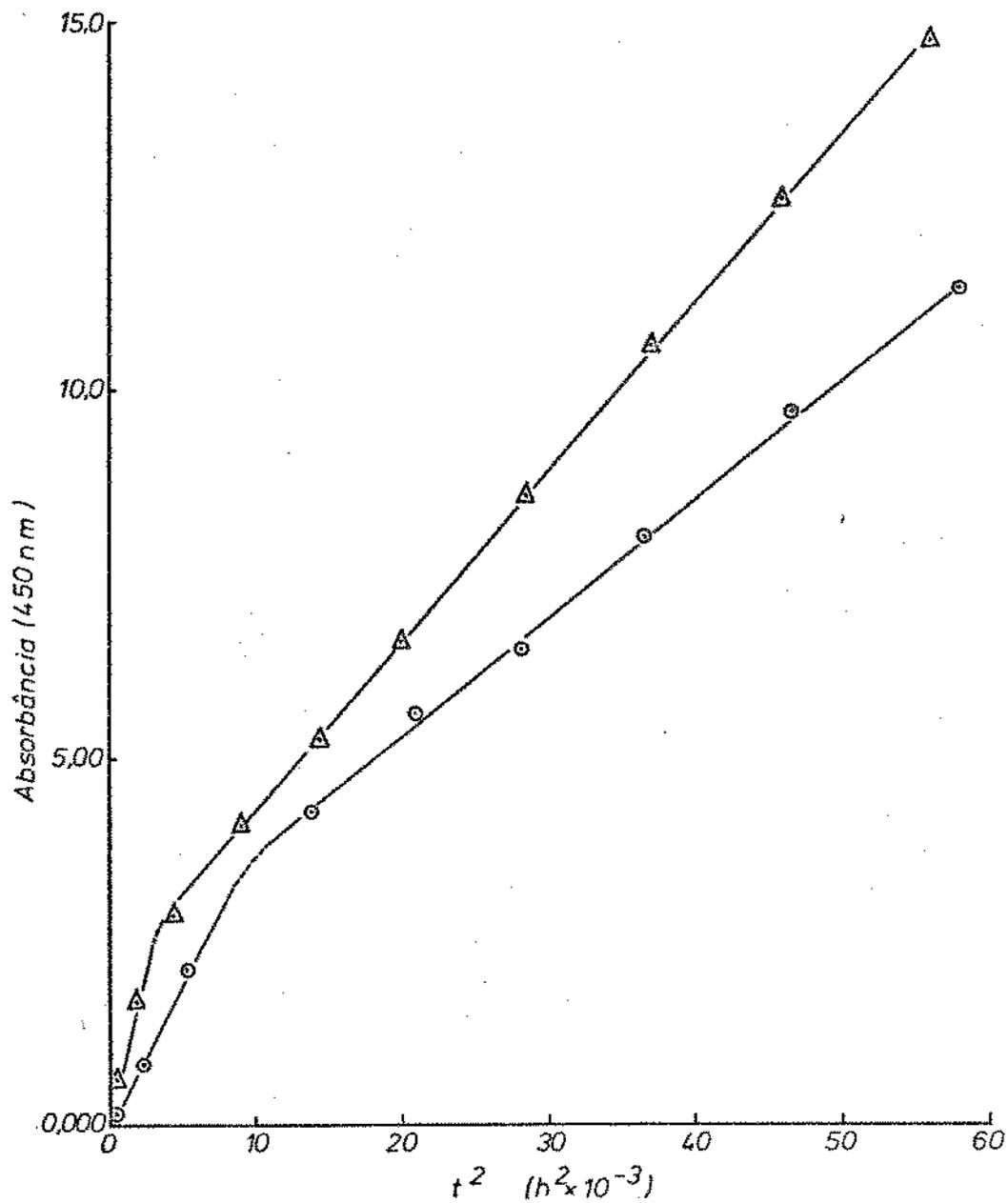


FIGURA 4 - Absorbância (450 nm) dos sistemas contendo lisina em relação ao quadrado do tempo.

○ lys6 △ lys6Cu

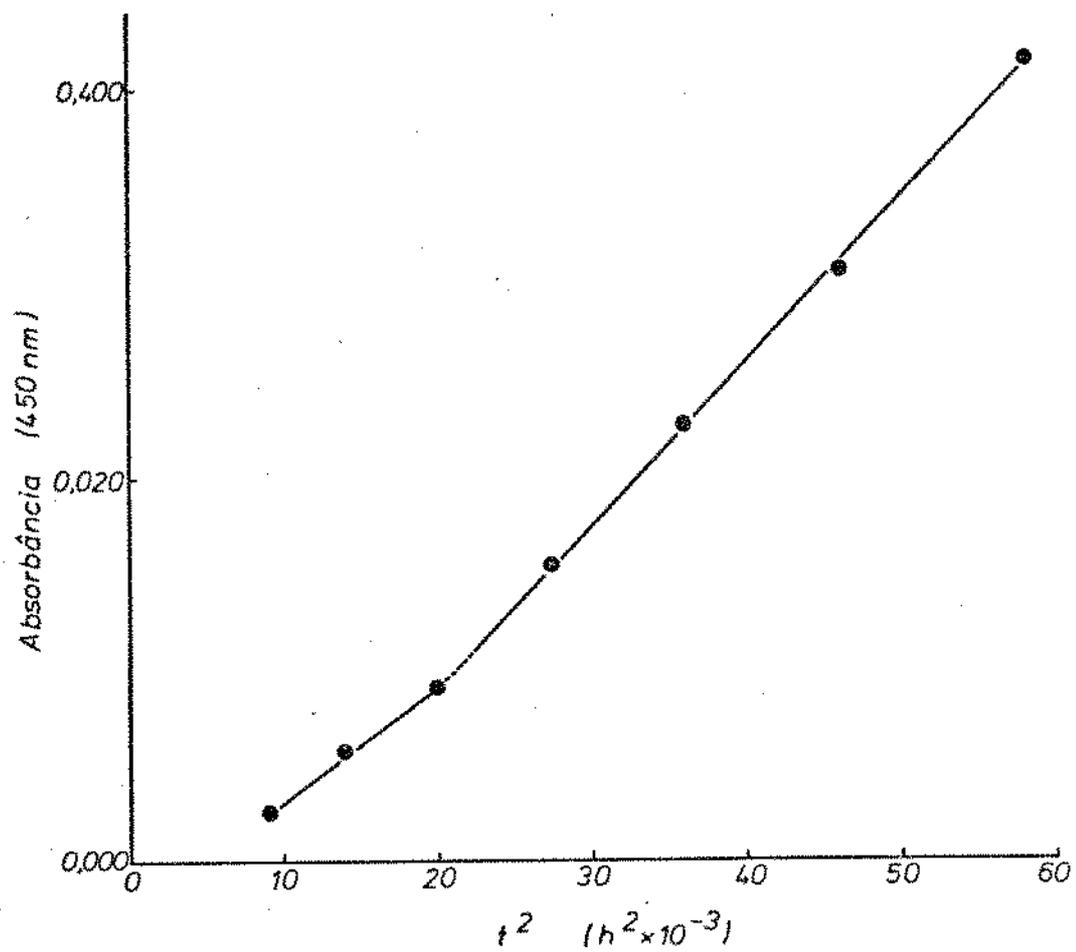


FIGURA 5 - Absorbância (450 nm) do sistema lys3 em relação ao quadrado do tempo.

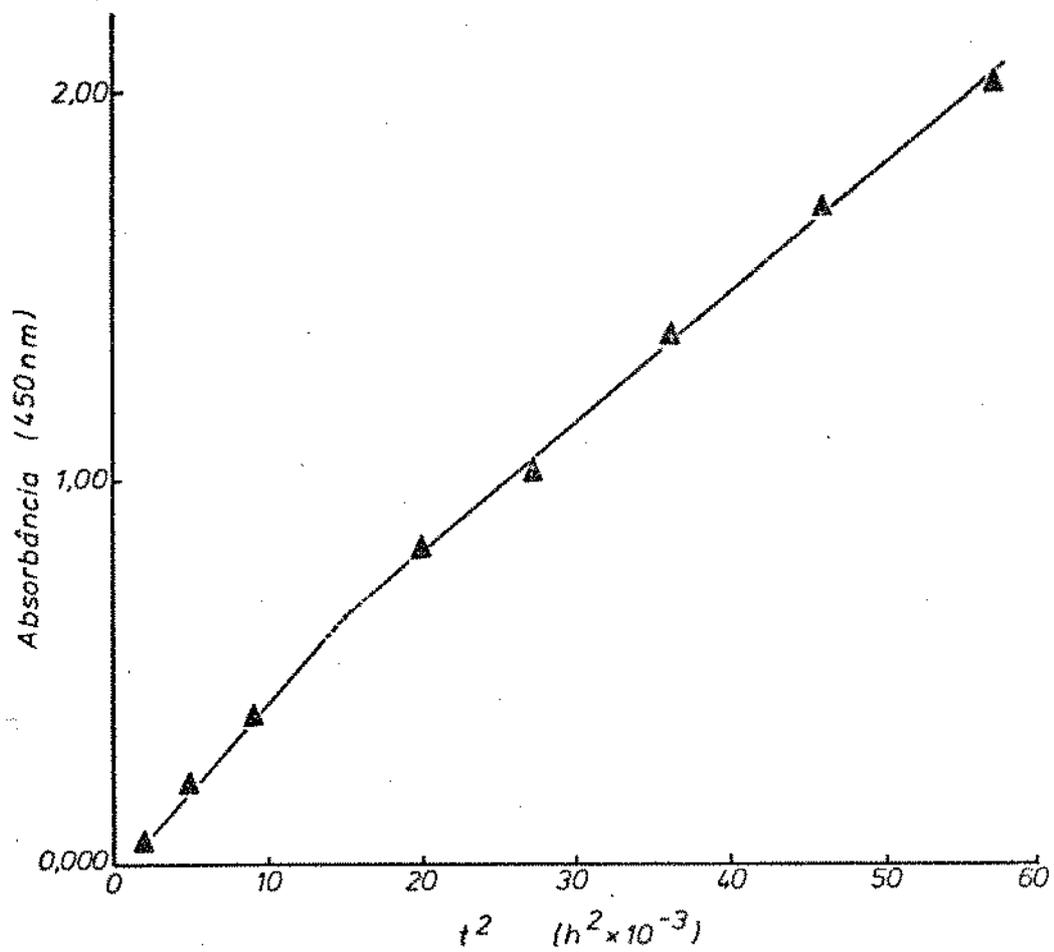


FIGURA 6 - Absorbância (450 nm) do sistema lys3Cu em relação ao quadrado do tempo.

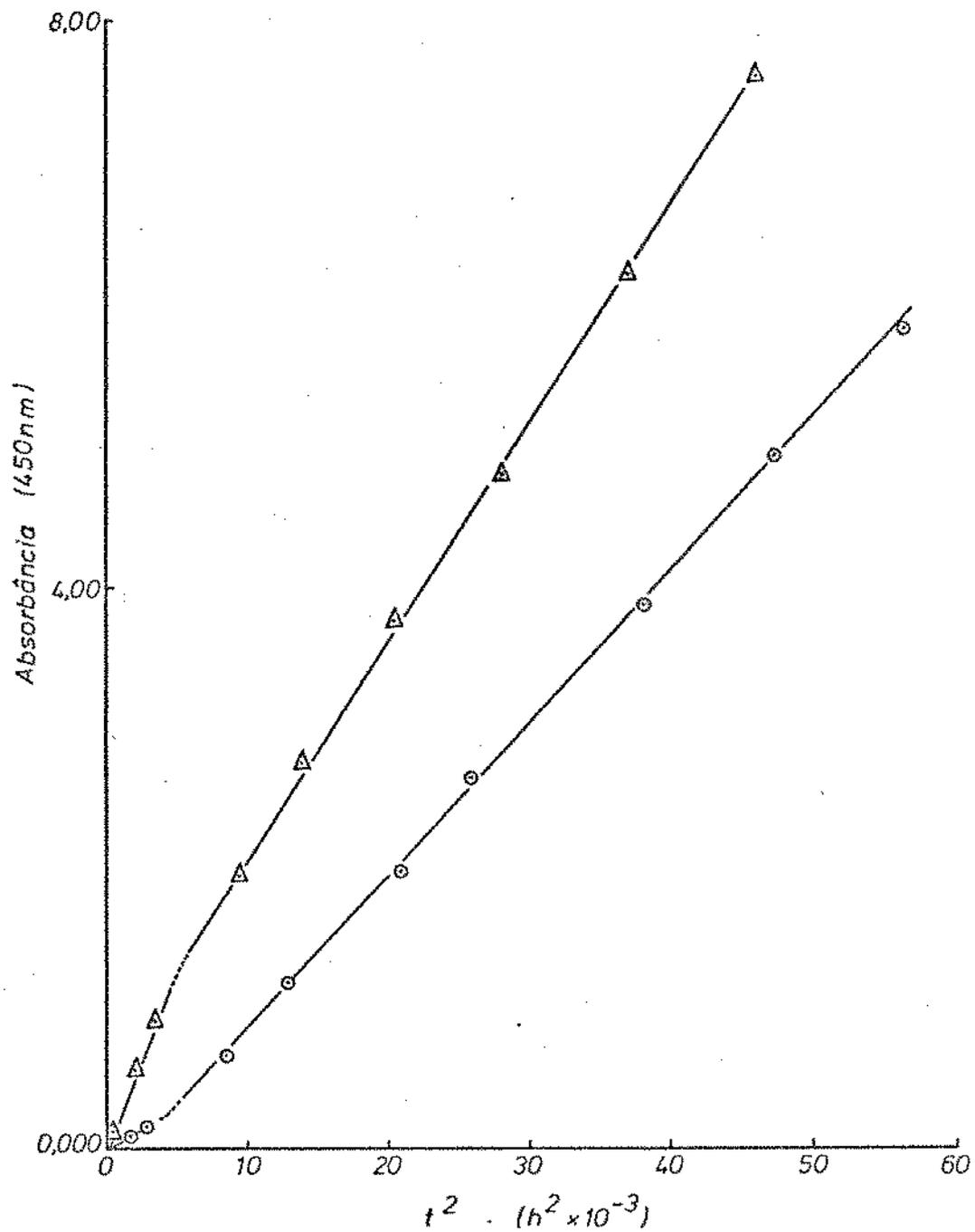


FIGURA 7 - Absorbância (450 nm) dos sistemas contendo ácido glutâmico em relação ao quadrado do tempo.

○ glu6 △ glu6Cu

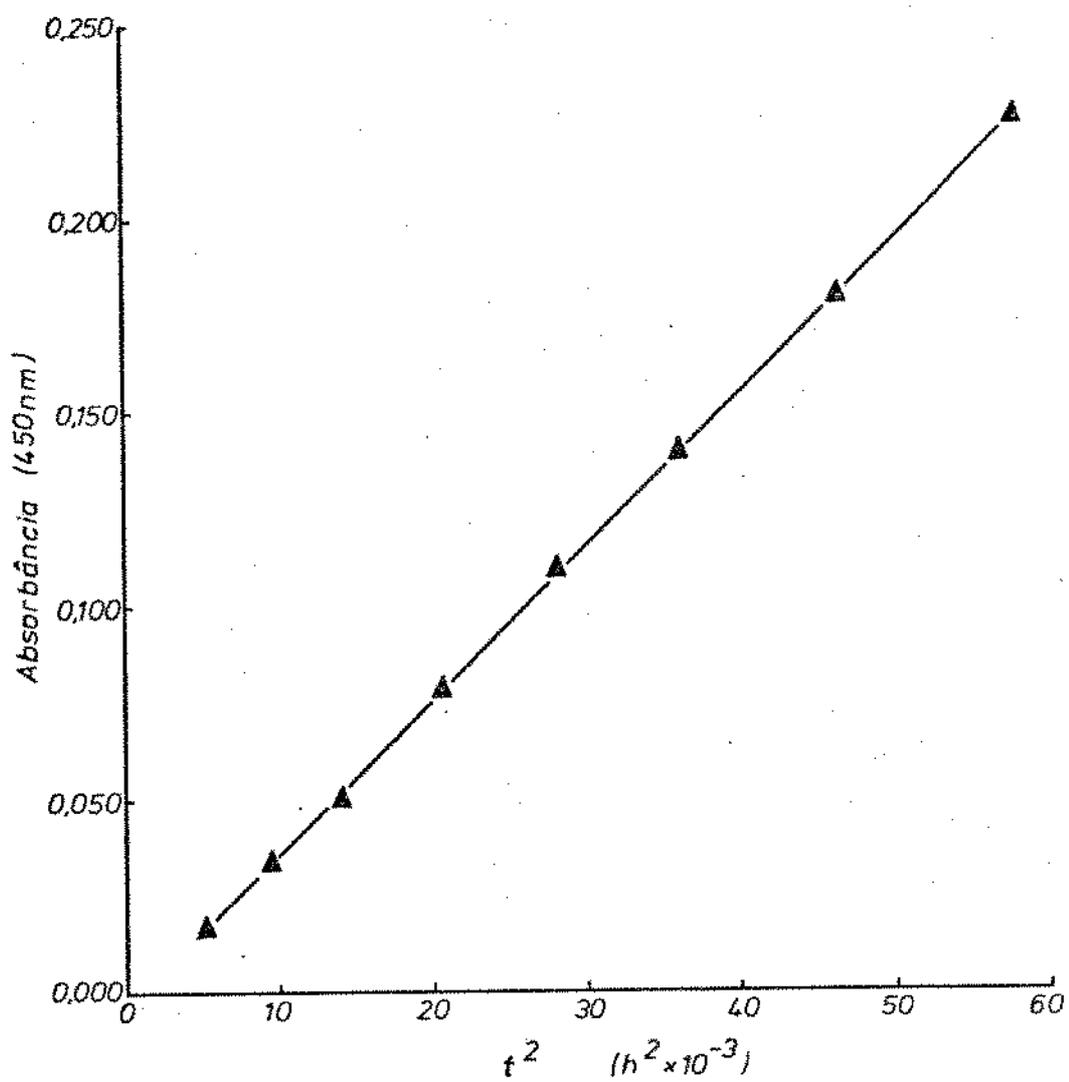


FIGURA 8 - Absorbância (450 nm) do sistema glu3Cu em relação ao quadrado do tempo.

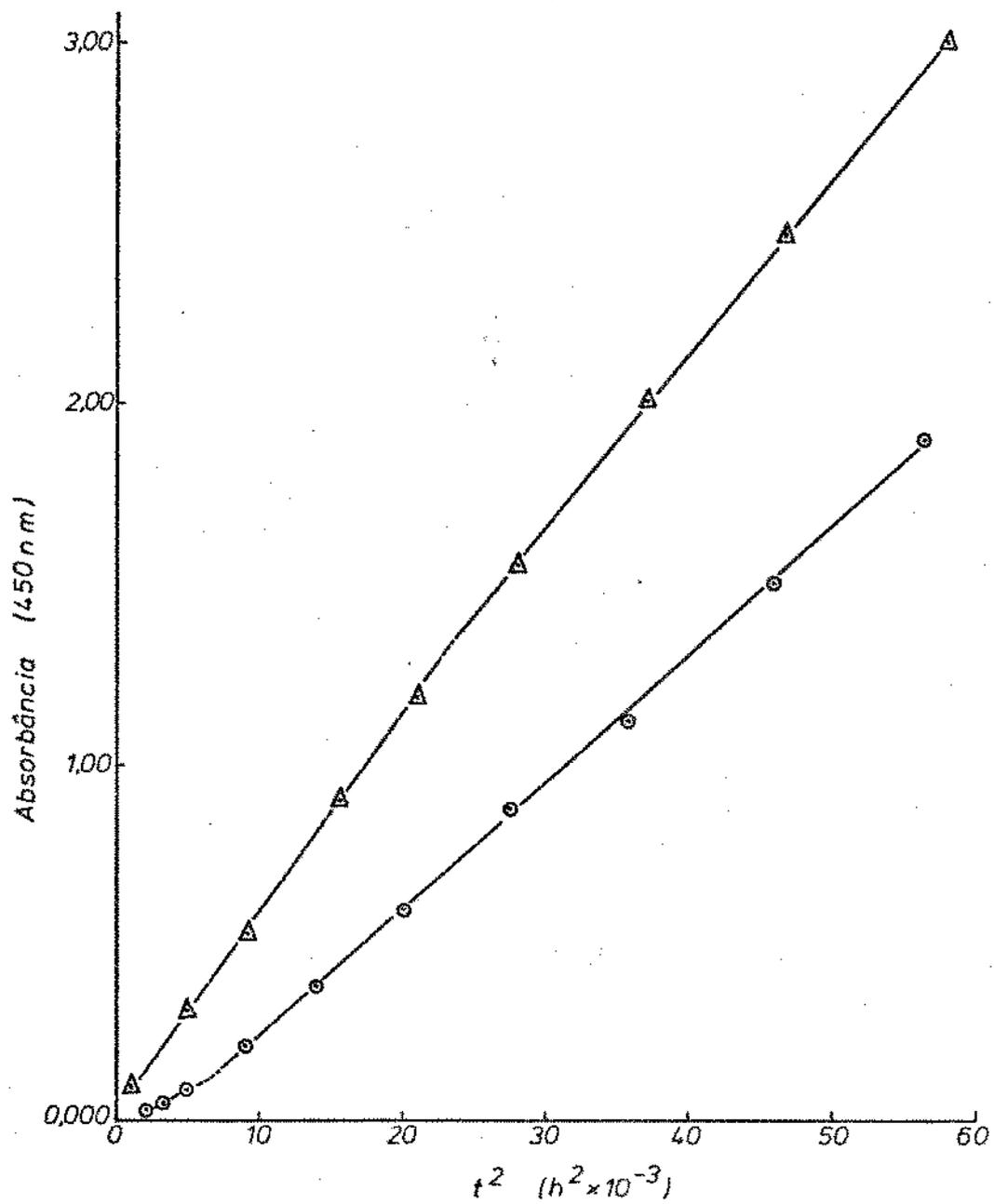


FIGURA 9 - Absorbância (450 nm) dos sistemas contendo glicina em relação ao quadrado do tempo.

○ gly6 △ gly6Cu

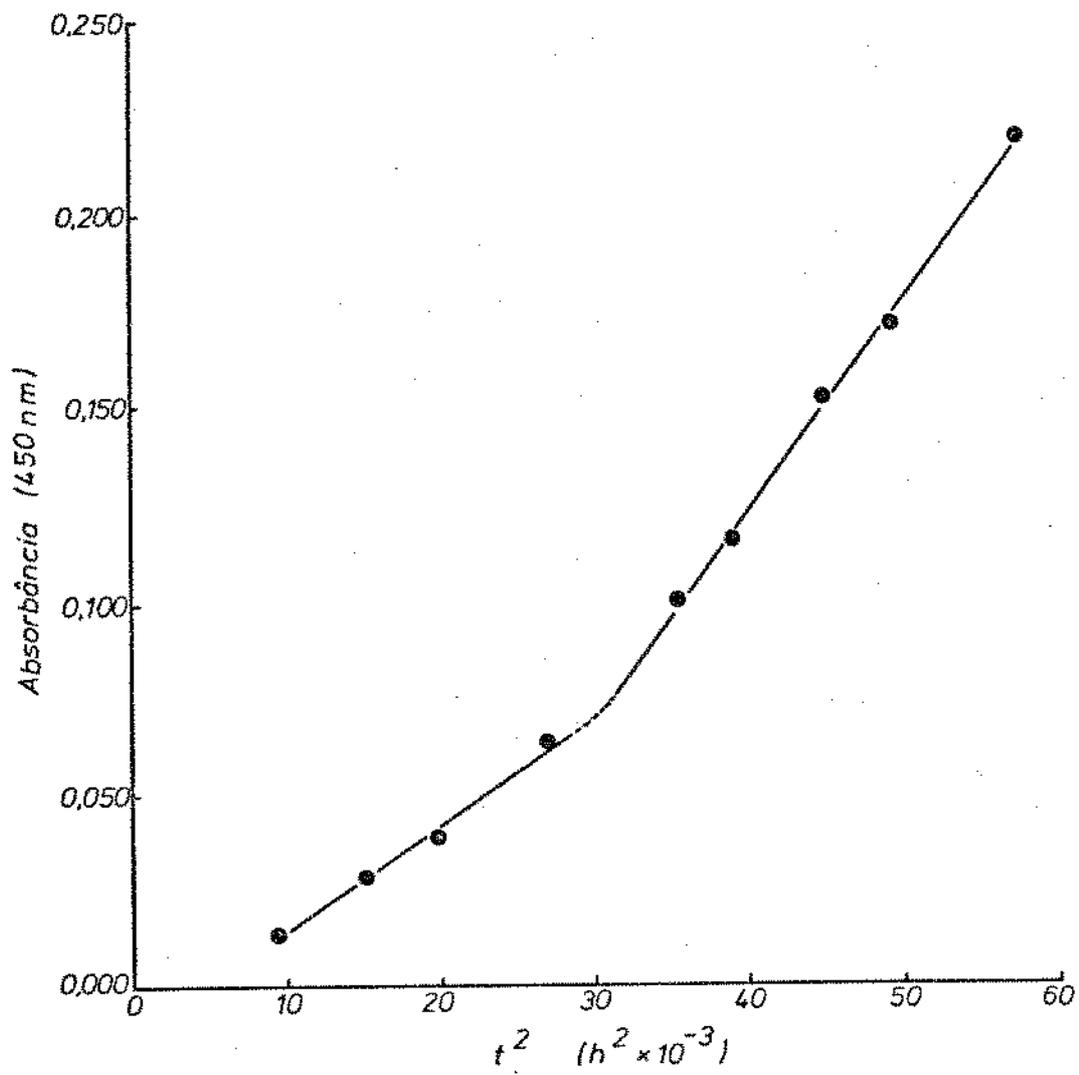


FIGURA 10 - Absorbância (450 nm) do sistema gly3 em relação ao quadrado do tempo.

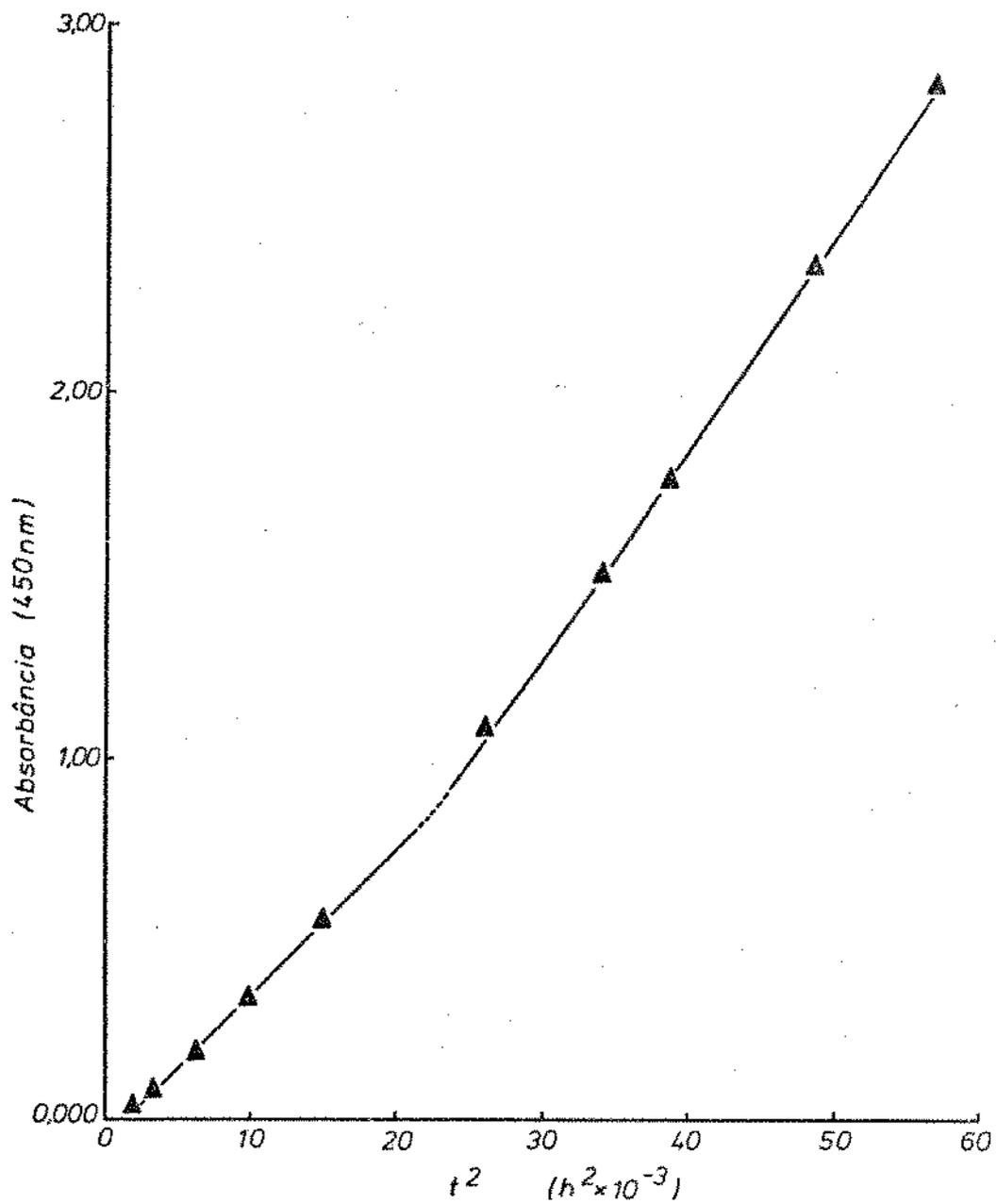


FIGURA 11 - Absorbância (450 nm) do sistema gly3Cu em relação ao quadrado do tempo.

B) Medida do pH

Os valores do pH em diferentes tempos de reação, nos sistemas com pH inicial 6,2, encontram-se nas figuras 12, 13 e 14.

Os sistemas com pH inicial igual a 3,0 mantiveram este valor constante até 240 horas de reação.

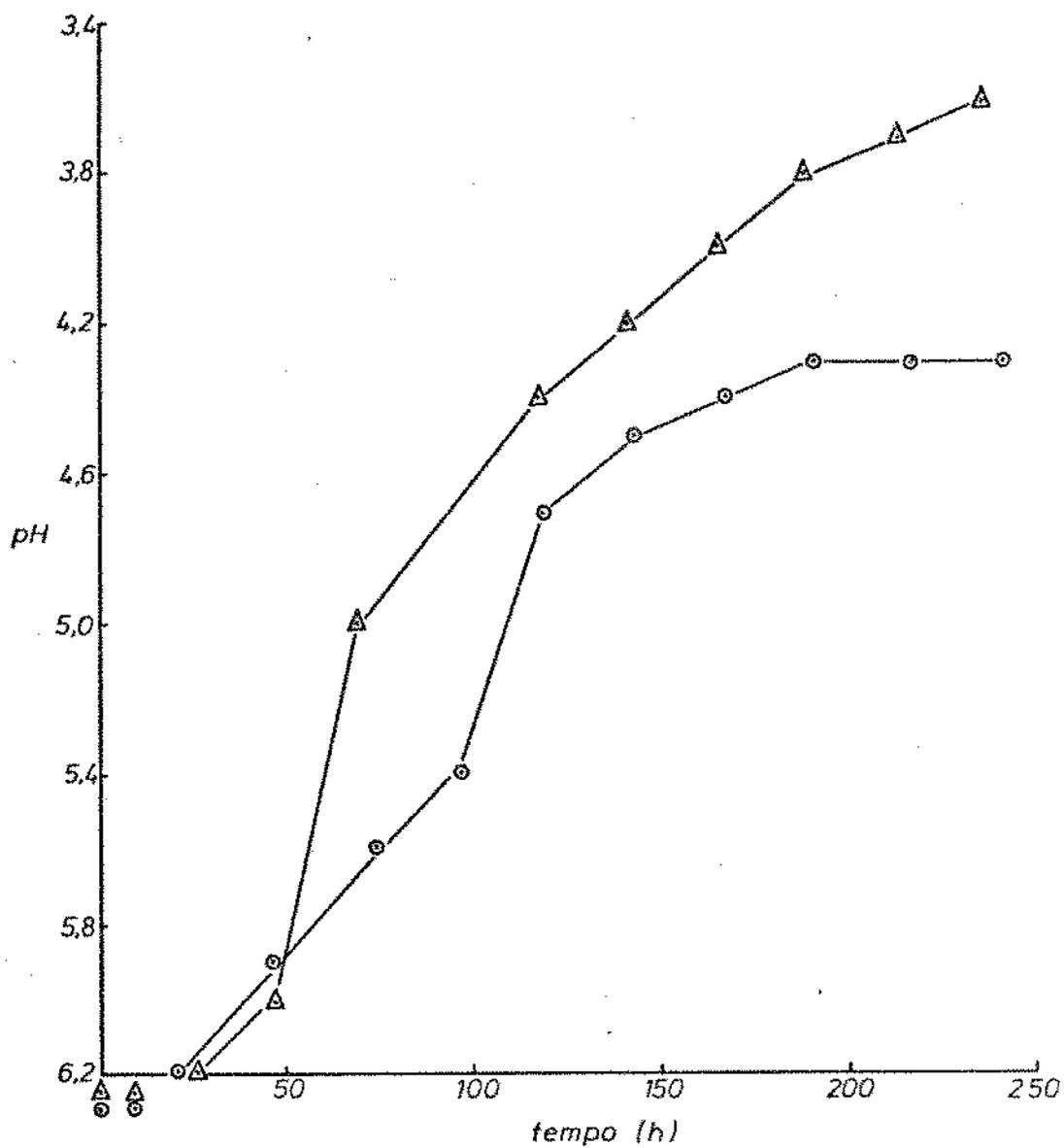


FIGURA 12 - Valores do pH dos sistemas contendo lisina em relação ao tempo.
 ● lys6 ▲ lys6Cu

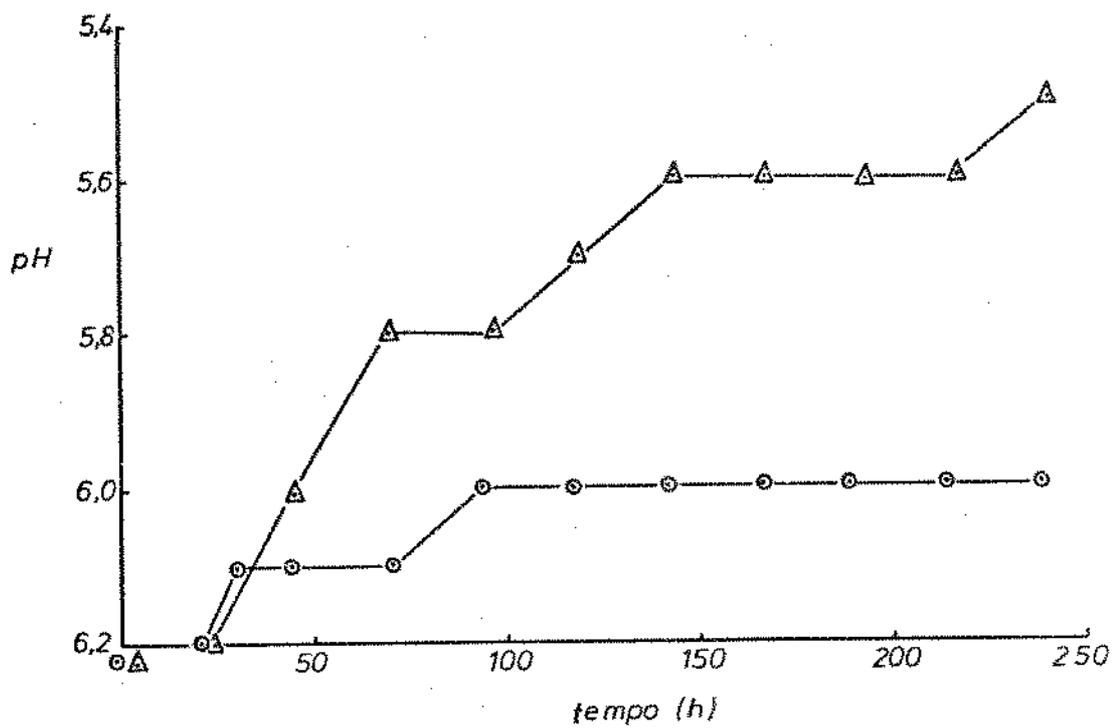


FIGURA 13 - Valores do pH dos sistemas contendo ácido glutâmico em relação ao tempo.

● glu6 ▲ glu6Cu

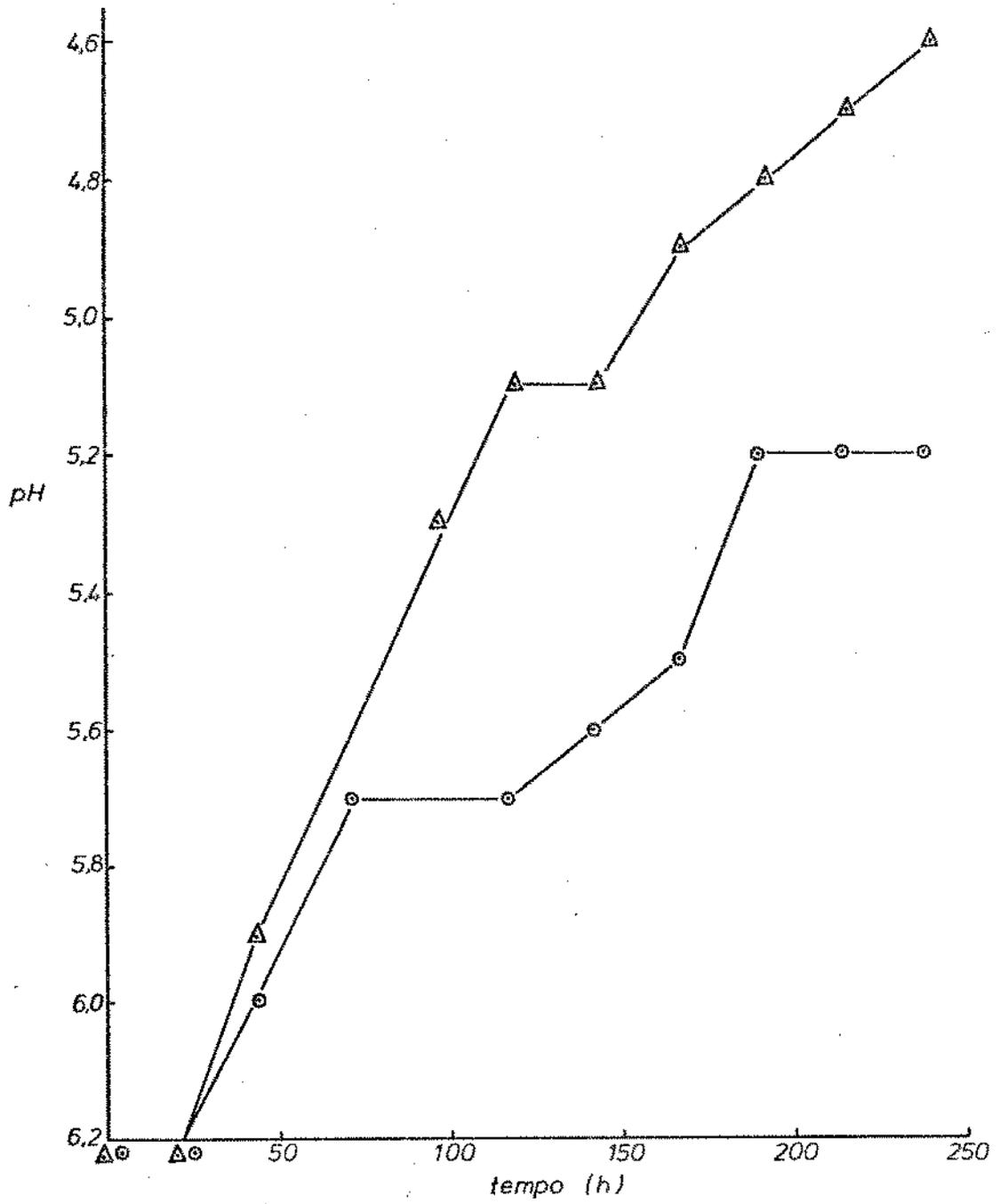


FIGURA 14 - Valores do pH dos sistemas contendo glicina em relação ao tempo.

○ gly6 △ gly6Cu

C) Consumo de glicose e de nitrogênio amínico primário ($-\text{NH}_2$)

As quantidades de glicose consumida e de $-\text{NH}_2$ consumido nos diferentes sistemas durante 240 horas de reação encontram-se nas figuras 15 a 24 e na tabela 11. No sistema glu3 não foi observado consumo de glicose até o final do tempo de reação.

Nas soluções contendo somente glicose, a pH 6,2, tanto na presença como na ausência de íons Cu^{2+} , foi determinado um consumo de glicose igual a 0,05 moles/l até o final do período de reação. - Neste mesmo tempo, os sistemas contendo somente glicose a pH 3,0, com e sem íons Cu^{2+} apresentaram um consumo de glicose de 0,03 moles/l.

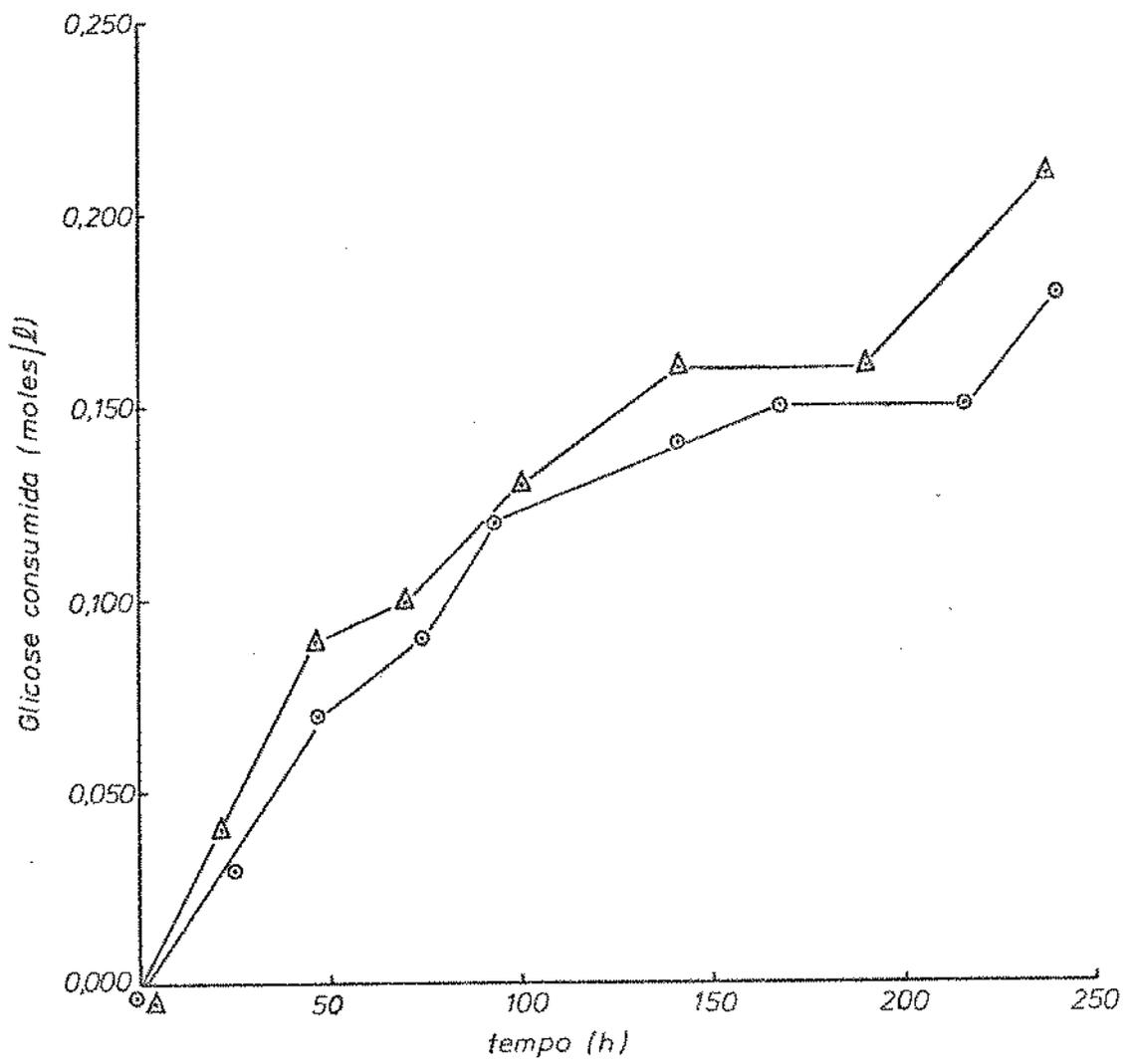


FIGURA 15 - Consumo de glicose em relação ao tempo nos sistemas contendo lisina.

○ lys6 △ lys6Cu

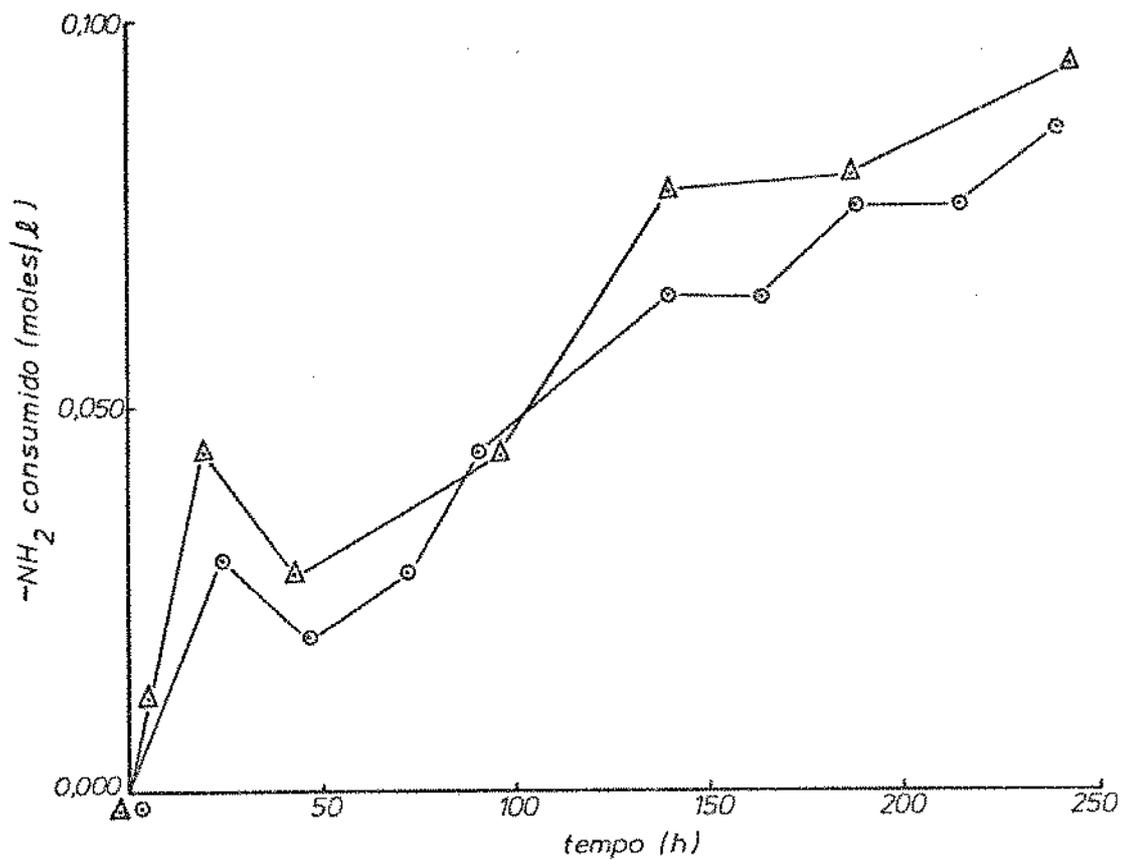


FIGURA 16 - Consumo de nitrogênio amínico primário ($-NH_2$) em relação ao tempo nos sistemas contendo lisina.

○ lys6 △ lys6Cu

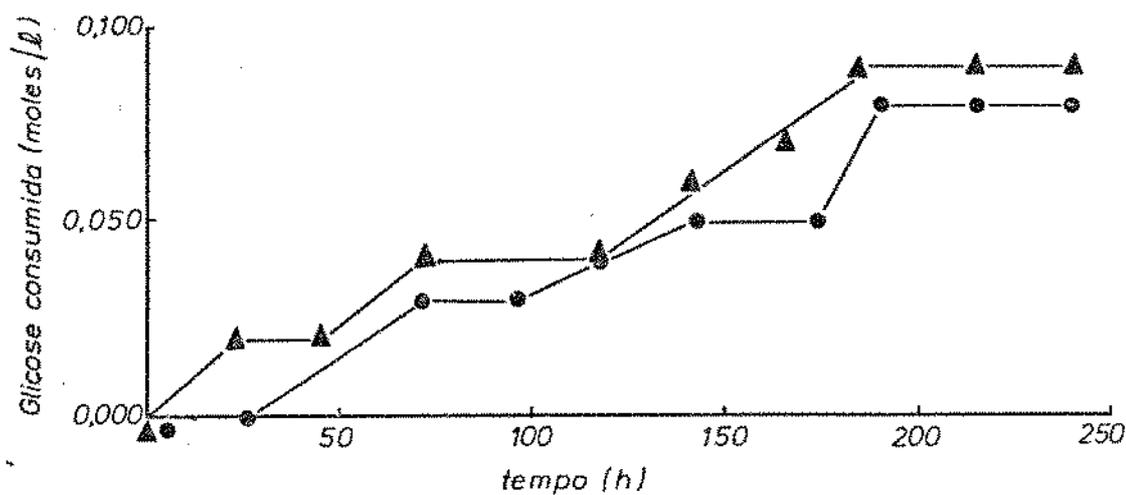


FIGURA 17 - Consumo de glicose em relação ao tempo nos sistemas contendo lisina.

● lys3 ▲ lys3Cu

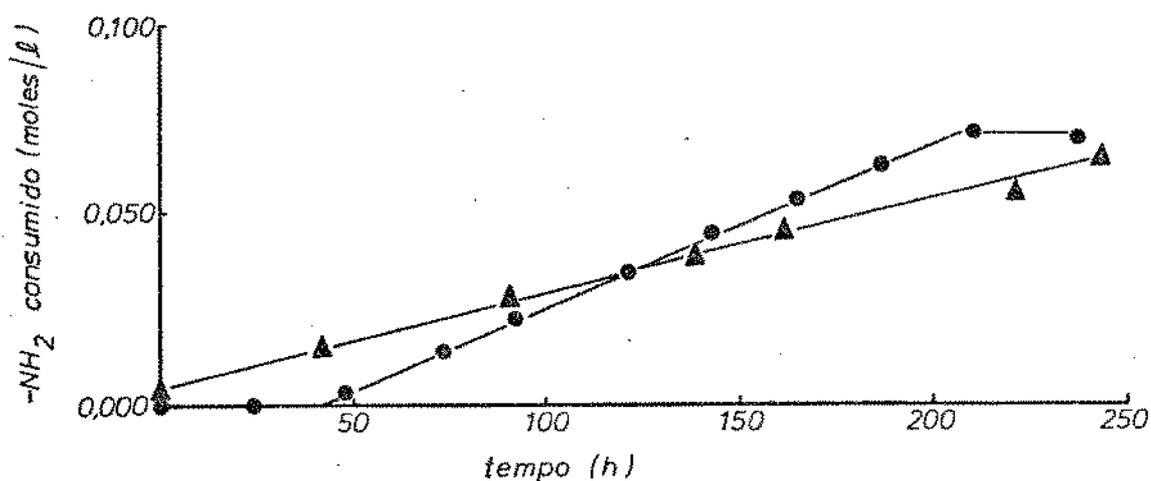


FIGURA 18 - Consumo de nitrogênio amínico primário (-NH₂) em relação ao tempo nos sistemas contendo lisina.

● lys3 ▲ lys3Cu

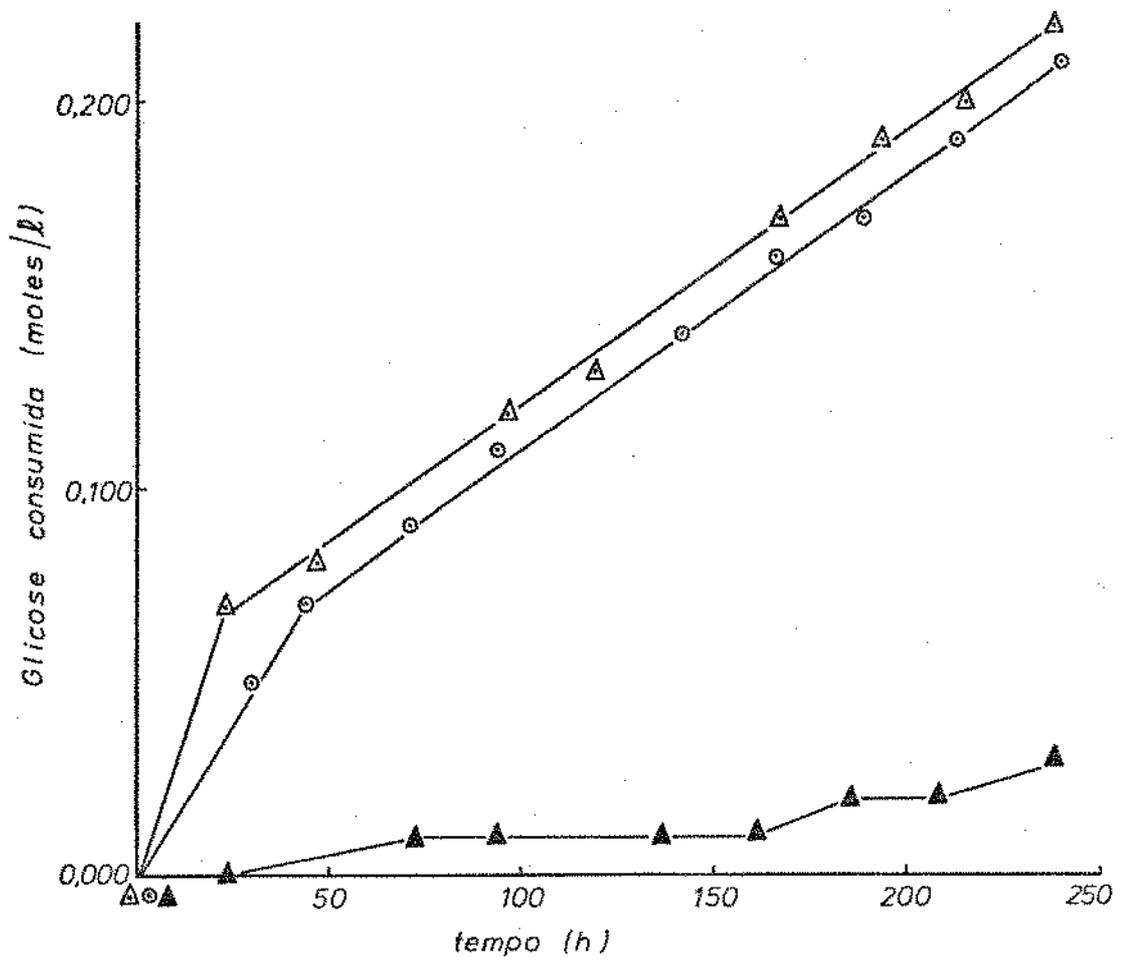


FIGURA 19 - Consumo de glicose em relação ao tempo nos sistemas contendo ácido glutâmico.

○ glu6 ▲ glu6Cu ▲ glu3Cu

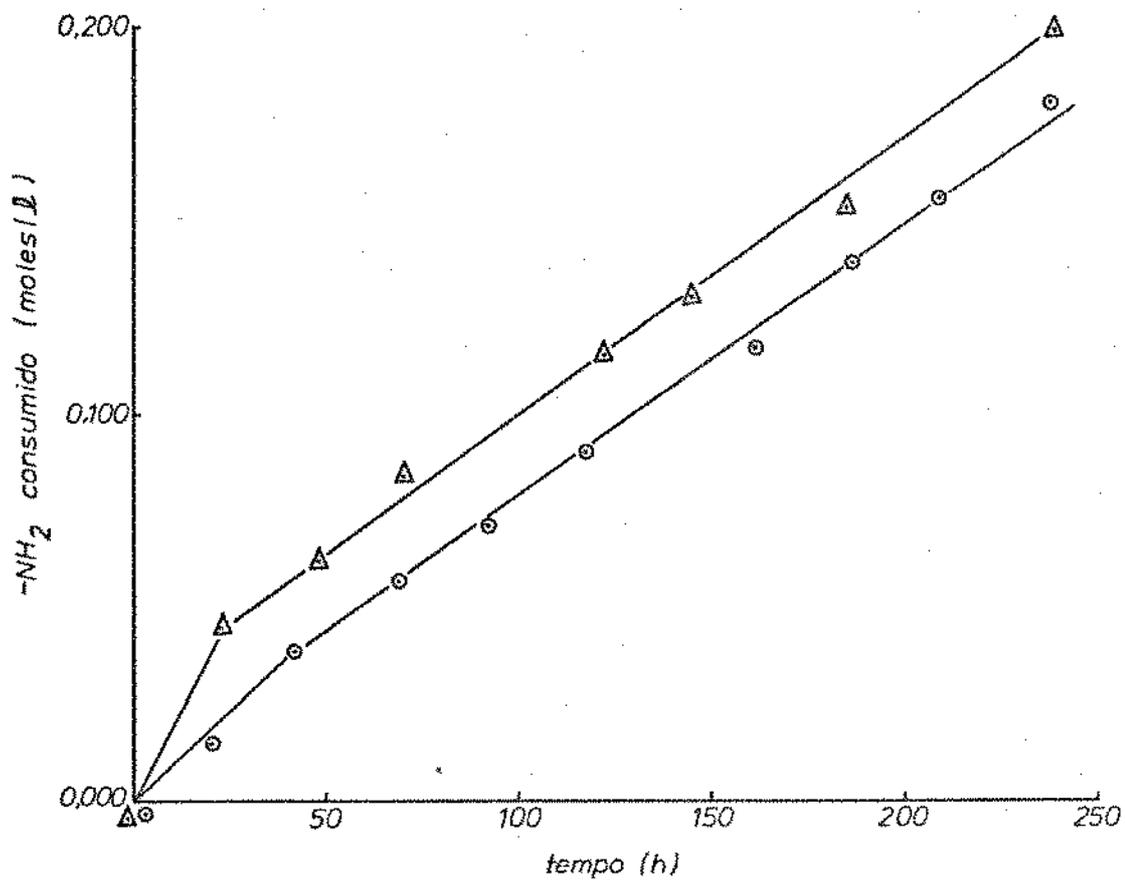


FIGURA 20 - Consumo de nitrogênio amínico primário (-NH₂) em relação ao tempo nos sistemas contendo ácido glutâmico.

○ glu6 △ glu6Cu

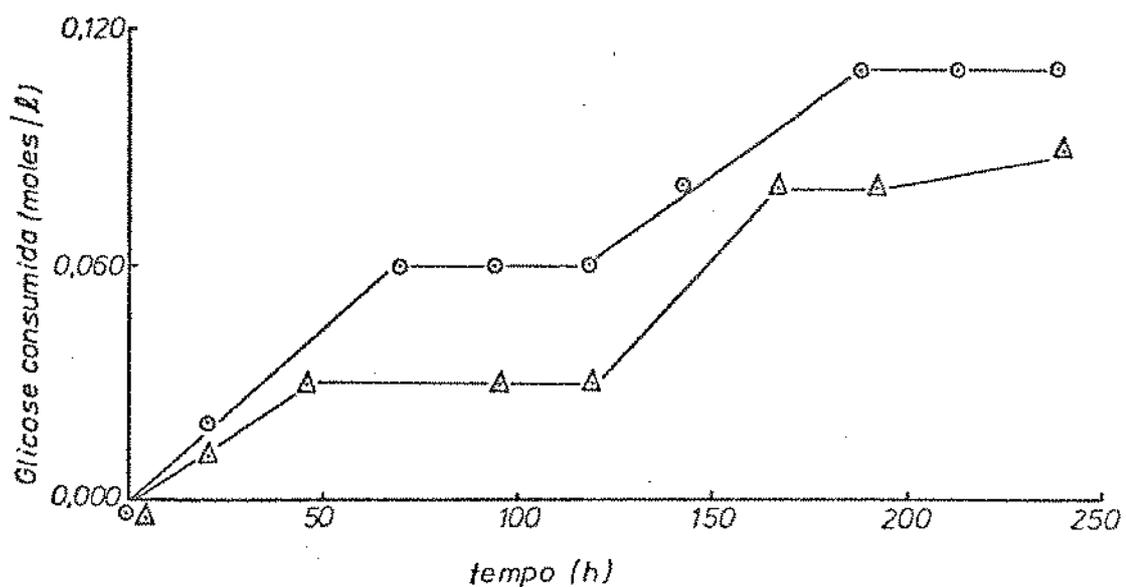


FIGURA 21 - Consumo de glicose em relação ao tempo nos sistemas contendo glicina.
 ○ gly6 △ gly6Cu

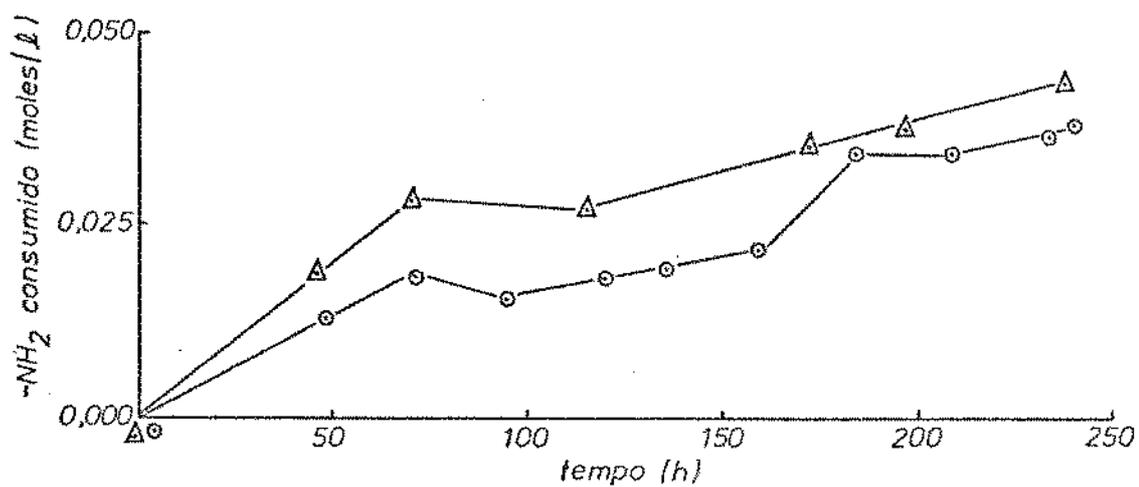


FIGURA 22 - Consumo de nitrogênio amínico primário (-NH₂) em relação ao tempo nos sistemas contendo glicina.
 ○ gly6 △ gly6Cu

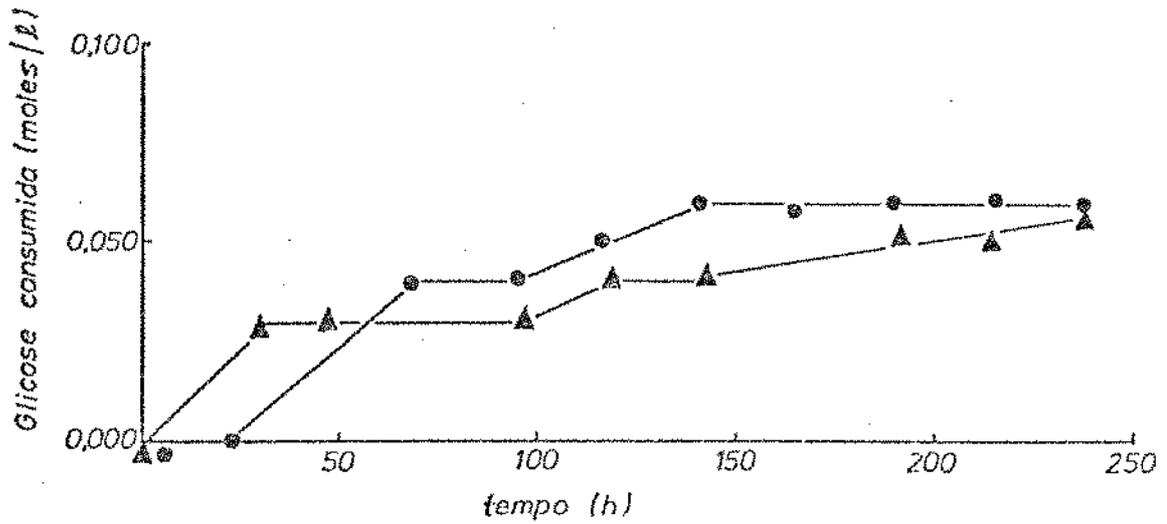


FIGURA 23 - Consumo de glicose em relação ao tempo nos sistemas contendo glicina.

● gly3 ▲ gly3Cu

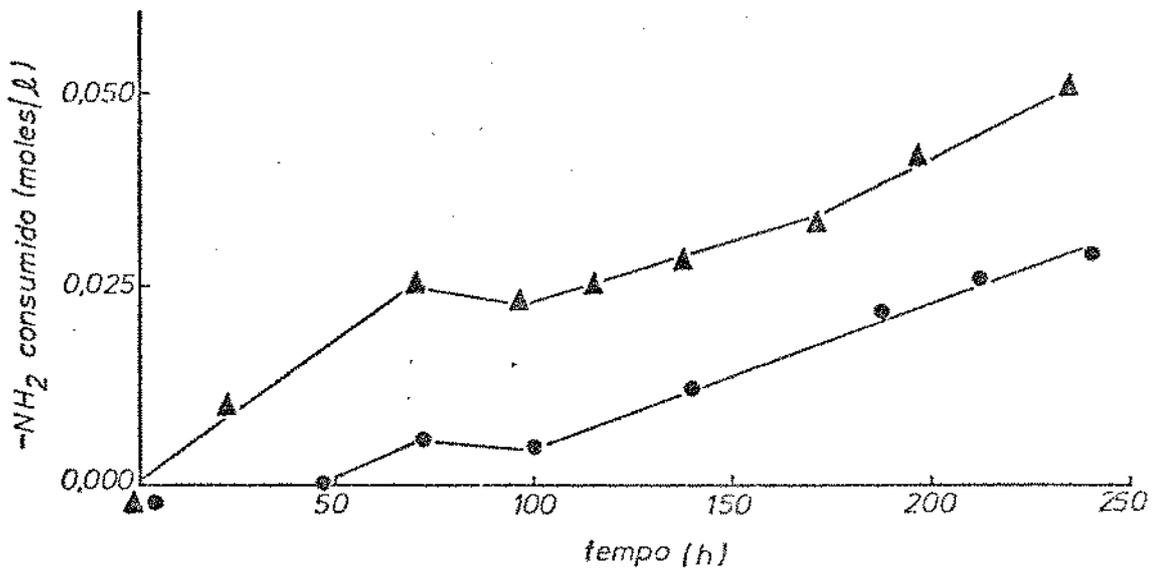


FIGURA 24 - Consumo de nitrogênio amínico primário (-NH₂) em relação ao tempo nos sistemas contendo glicina.

● gly3 ▲ gly3Cu

TABELA 11 - Consumo de glicose e de $-NH_2$ e razão molar entre glicose consumida e $-NH_2$ consumido (G/NH_2) nos diferentes sistemas, decorridas 240 horas de reação.

Sistema-modelo	Glicose consumida (%)	$-NH_2$ consumido (%)	G/NH_2
lys6	14,4	13,0	2,1
lys6Cu	16,8	14,1	2,3
lys3	6,4	10,6	1,1
lys3Cu	7,2	10,0	1,4
glu6	16,8	27,3	1,2
glu6Cu	17,6	30,3	1,1
glu3Cu	2,4
gly6	8,8	5,8	2,9
gly6Cu	7,2	6,8	2,0
gly3	4,8	4,5	2,0
gly3Cu	4,3	7,9	1,0

D) Medida da lisina

Os cromatogramas referentes à determinação da lisina residual encontram-se nas figuras 25 a 29.

A quantidade de aminoácido consumido nos sistemas contendo lisina, após 240 horas de reação, estão apresentados na tabela 12.

TABELA 12 - Consumo de lisina nos diferentes sistemas, decorridas 240 horas de reação.

Sistema-modelo	lisina consumida (moles/l)
lys6	0,117
lys6Cu	0,118
lys3	0,080
lys3Cu	0,081

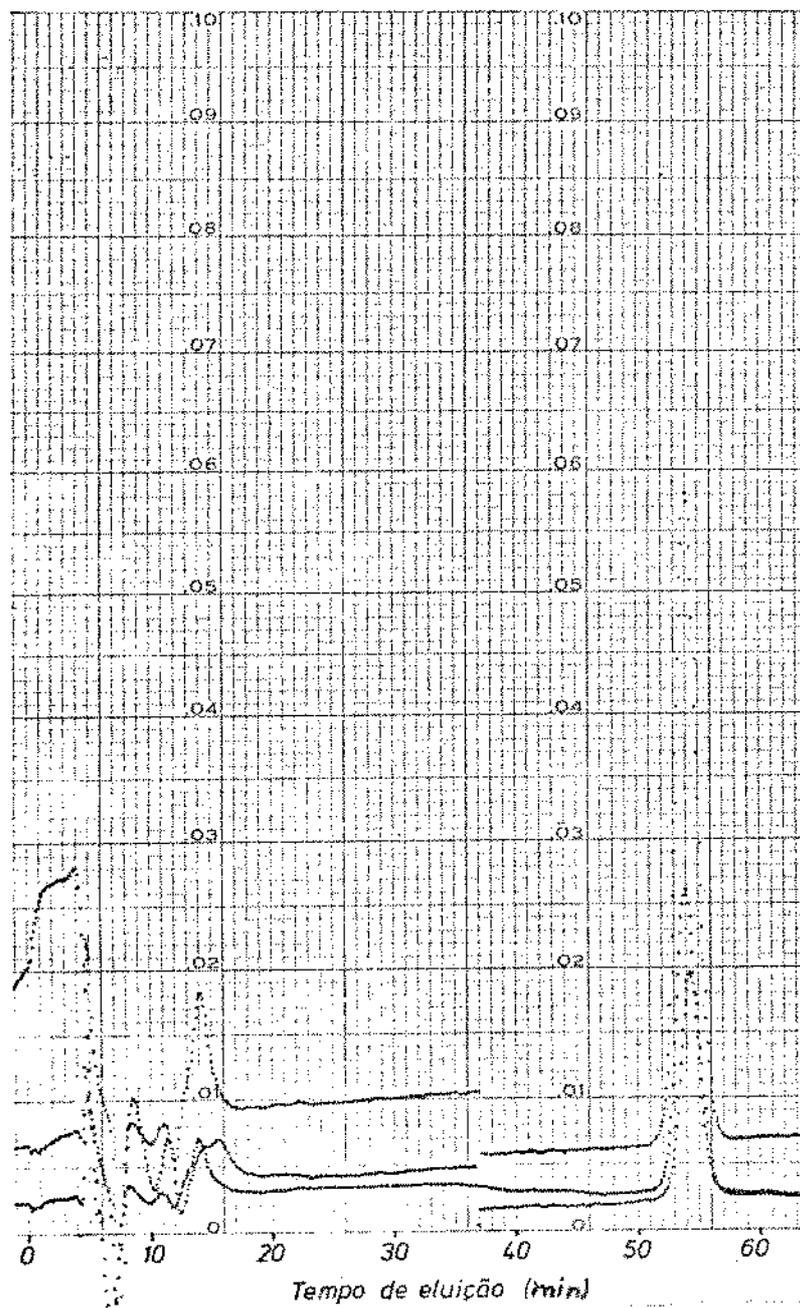


FIGURA 25 - Cromatograma correspondente ao padrão lisina.

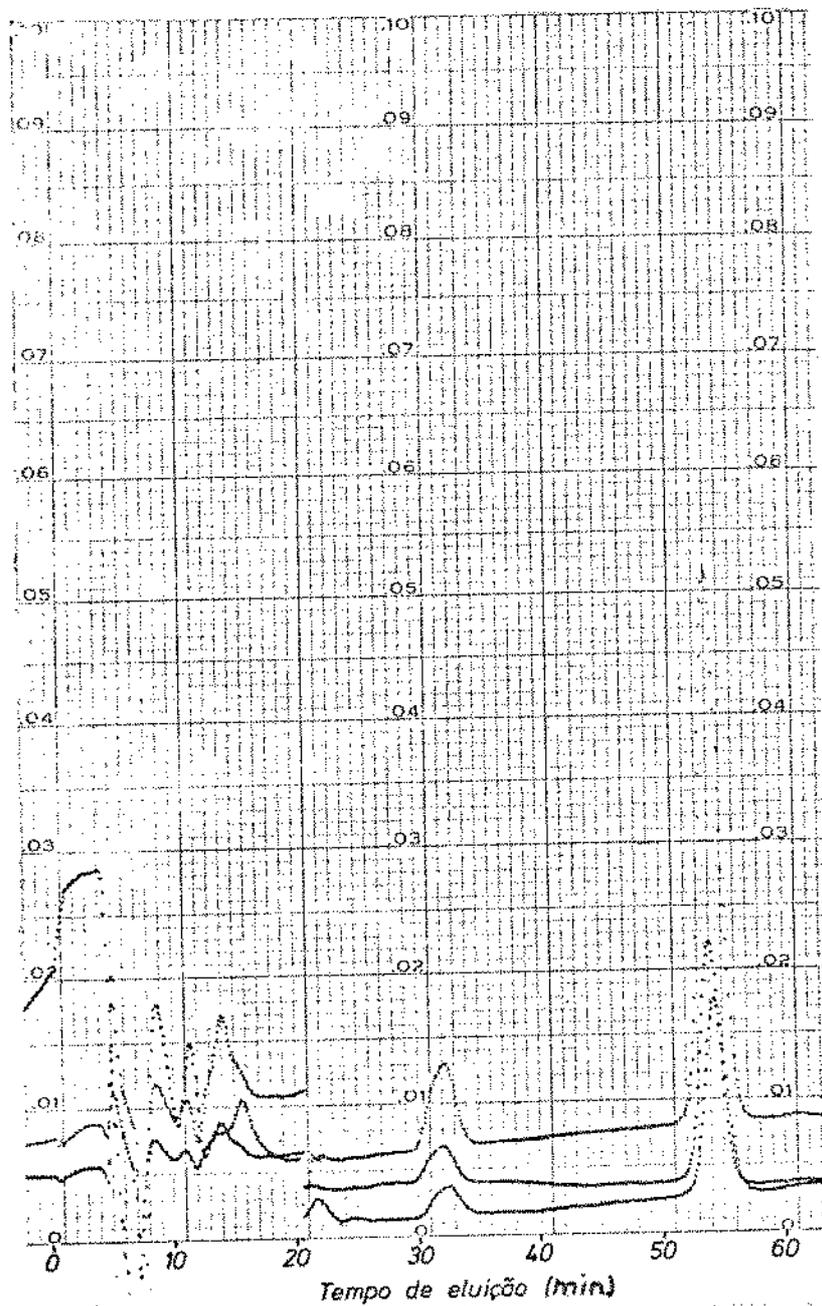


FIGURA 26 - Cromatograma correspondente à determinação de lisina no sistema lys6.

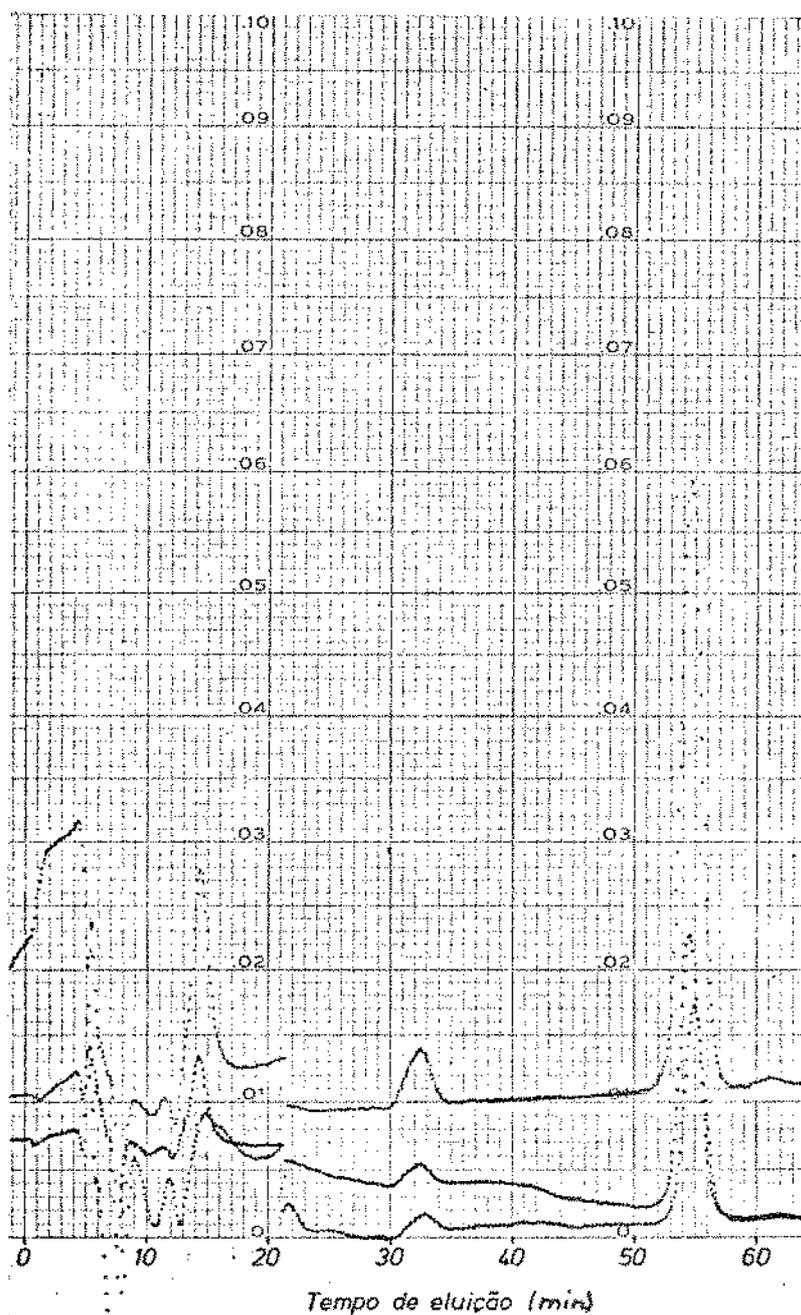


FIGURA 27 - Cromatograma correspondente à determinação de lisina no sistema lys6Cu.

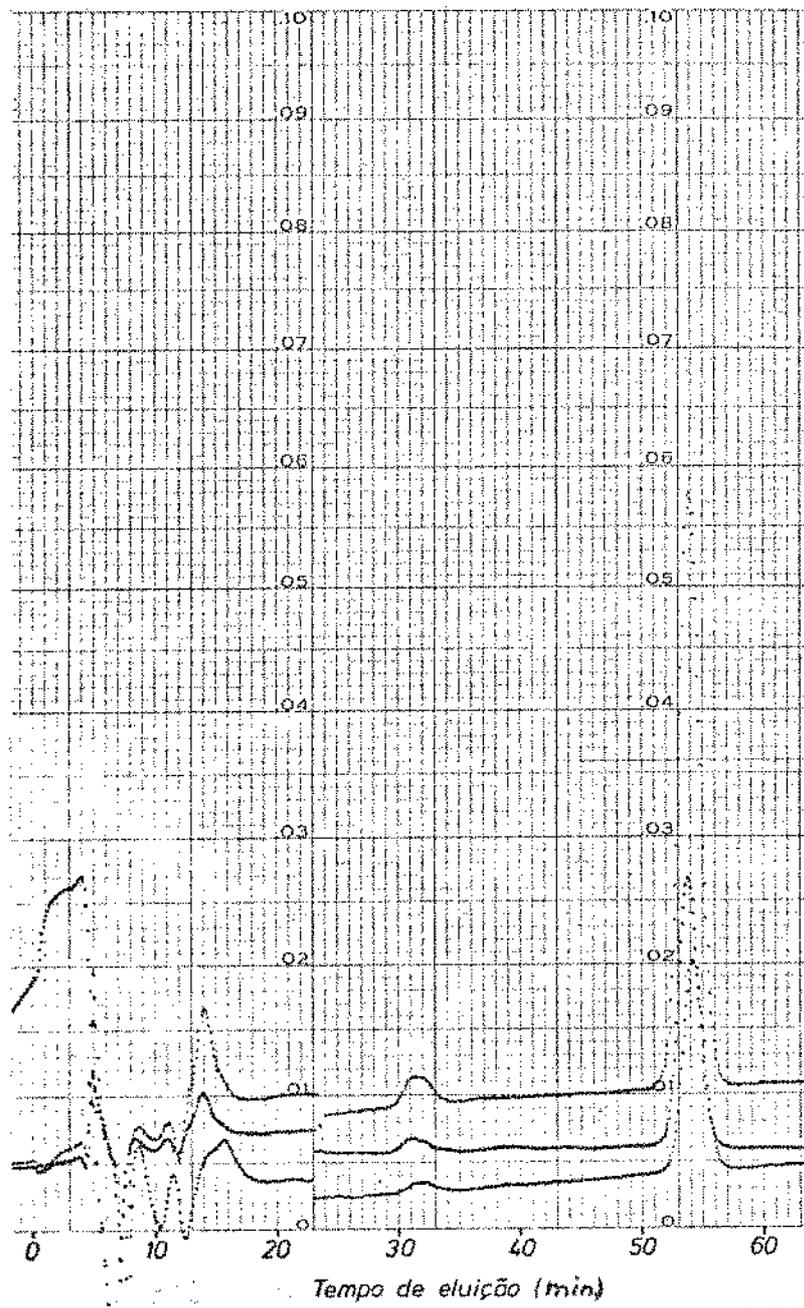


FIGURA 28 - Cromatograma correspondente à determinação de lisina no sistema lys3.

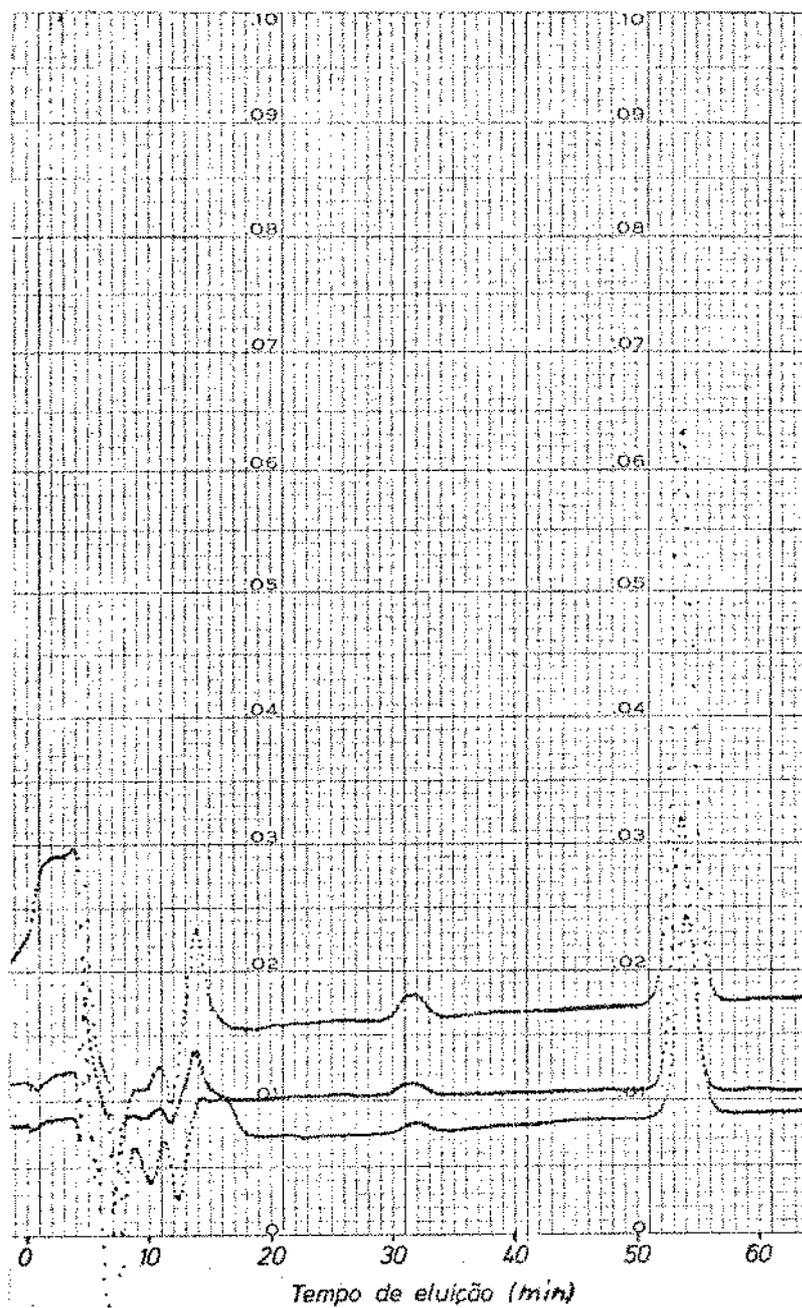


FIGURA 29 - Cromatograma correspondente à determinação de lisina no sistema lys3Cu.

E) Teor de nitrogênio das melanoidinas

O teor de nitrogênio determinado nas diferentes melanoidinas encontra-se na tabela 13.

TABELA 13 - Teor de nitrogênio das melanoidinas obtidas a partir de soluções de glicose (1,25 M) e aminoácido (0,66 M), pH inicial 6,2.

Aminoácido	N (%)
lisina (s)	5,7
lisina (ins)	5,6
ácido glutâmico (s)	3,1
glicina (s)	5,1*

s = melanoidina solúvel em água

ins = melanoidina insolúvel em água

* segundo Leite (99).

F) Espectros infravermelho das melanoidinas

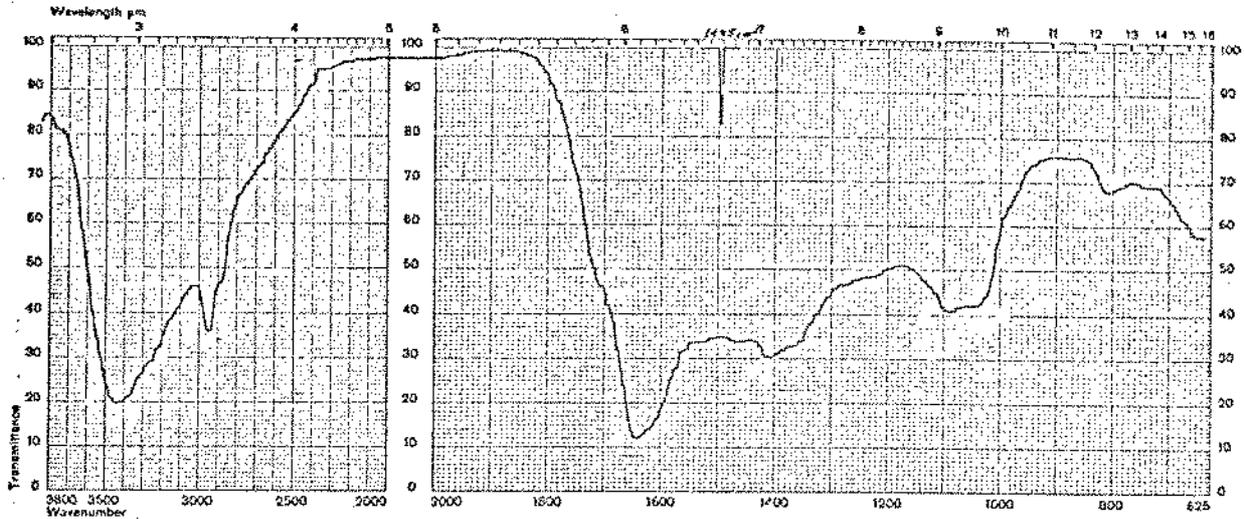


FIGURA 30 - Espectro infravermelho da melanoidina solúvel do sistema glicose (1,25 M) e lisina (0,66 M), pH 6,2.

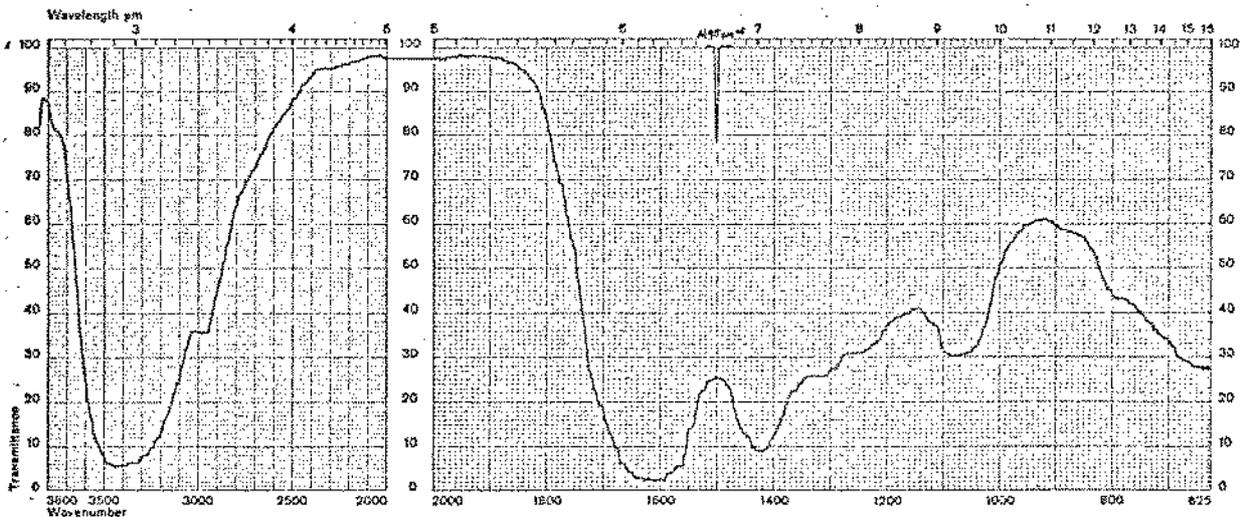


FIGURA 31 - Espectro infravermelho da melanoidina do sistema glicose (1,25 M) e ácido glutâmico (0,66 M), pH 6,2.

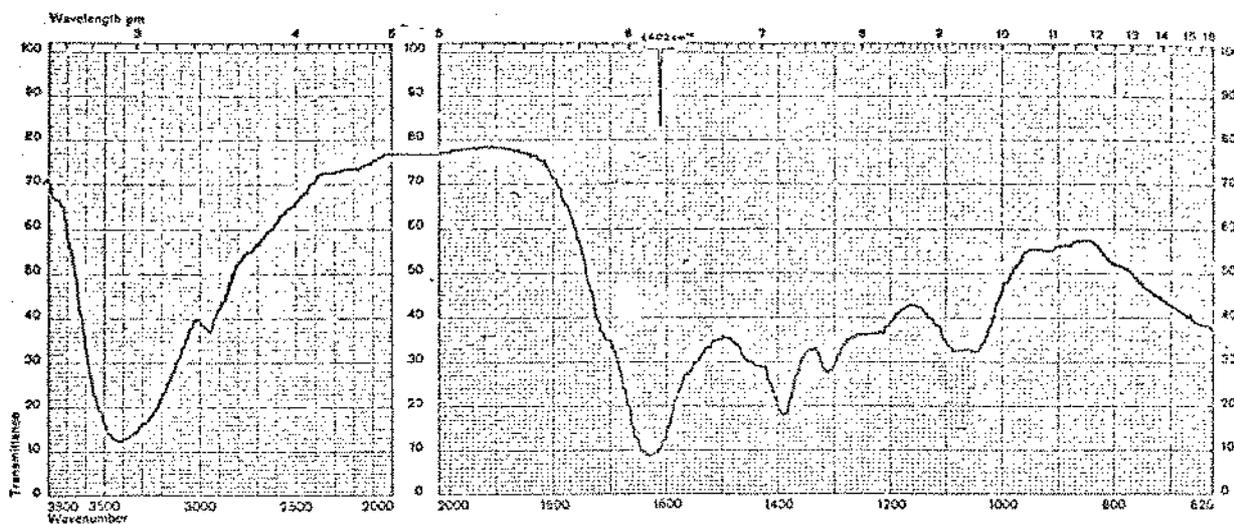


FIGURA 32 - Espectro infravermelho da melanoidina do sistema glicose (1,25 M) e glicina (0,66 M), pH 6,2 (99).

VI. DISCUSSÃO

A) Materiais e métodos

No presente trabalho, o estudo da reação de Maillard foi realizado em sistemas-modelo, com a finalidade de se diminuir o número de variáveis encontradas quando tal reação é estudada diretamente em sistemas naturais.

A glicose foi o açúcar utilizado por ser um carboidrato comum em alimentos e ter sido usada na maioria dos trabalhos que dizem respeito à reação de Maillard.

A glicina, a lisina e o ácido glutâmico foram empregados por apresentarem características de aminoácidos neutro, básico e ácido, respectivamente, além de serem encontrados em produtos naturais, livres ou como parte de proteínas, podendo participar das reações de escurecimento não enzimático que ocorrem durante o processamento e estocagem de alimentos.

O efeito do íon Cu^{2+} foi estudado tendo em vista trabalho anterior (92) que mostrou ser este íon um catalisador ativo da reação de Maillard, mesmo na concentração de 20 ppm.

A concentração de 100 ppm de íons Cu^{2+} utilizada no presente estudo teve como finalidade a obtenção de resultados que permitissem uma melhor caracterização da ação deste íon.

As concentrações de glicose e de aminoácido foram escolhidas com

base em trabalhos anteriores (74, 92). A baixa solubilidade do ácido glutâmico a pH 3,0 determinou, por sua vez, o emprego de soluções saturadas em que a concentração do aminoácido, embora baixa (0,15 M a 50°C), foi mantida constante durante a reação, na tentativa de se atingir uma velocidade de reação mais próxima daquela que seria esperada para a concentração 0,66 M.

Na escolha das condições de reação, procurou-se evitar condições extremas onde a degradação alcalina ou ácida da glicose e seu escurecimento pudessem competir com a reação de Maillard. Assim, foram utilizados pH 6,2 e 3,0 à temperatura de 50°C, condições estas que se aproximam muitas vezes daquelas encontradas durante o processamento e mesmo armazenamento de alimentos. Condições semelhantes tem sido empregadas por outros autores (62, 74, 92).

A medida da absorbância a 450 nm para determinar o desenvolvimento da cor nos sistemas-modelo estudados tem sido empregada por diferentes autores (62, 92, 32, 74), permitindo a obtenção de resultados comparativos.

O método de determinação de glicose através da glicose-oxidase foi empregado devido a sua especificidade, rapidez e reprodutividade, tendo sido utilizado anteriormente (17, 84) no estudo da reação de Maillard.

Ensaio feitos para se determinar a concentração mínima de glicose mensurável por esse método mostraram que o limite prático era $1,000 \pm 0,005$ µg/ml. A fim de que os dados obtidos neste trabalho refletissem perdas de glicose devido apenas à reação de Maillard, as quantidades de glicose consumidas referentes aos vários siste-

mas estudados correspondem à diferença entre a concentração da glicose residual determinada na solução de glicose e aquela determinada em cada sistema-modelo, nas mesmas condições de reação.

O método de Van Slike (94) foi escolhido por ser seletivo, medindo somente os amino-grupos livres dos aminoácidos presentes no meio de reação. Além disso, trata-se de um método sensível, permitindo determinações de até $0,0100 \pm 0,0001$ mg de nitrogênio amínico por ml de amostra (94).

Ensaio preliminares mostraram que variações na tensão da corrente elétrica afetavam o funcionamento do aparelho de Van Slike, alterando os resultados finais. Para se evitar essa distorção, procedeu-se à análise de padrões imediatamente após a leitura das amostras, de forma a se obter valores de pressões de N_2 (pN_2) referentes à mesma tensão de corrente elétrica e à mesma temperatura. Assim, a quantidade de nitrogênio amínico primário ($-NH_2$) em cada amostra foi determinada através da igualdade:

$$\text{mg } -NH_2\text{amostra} = \frac{\text{mg } -NH_2\text{padrão} \times pN_2\text{amostra}}{pN_2\text{padrão}}$$

A expressão acima foi adaptada da seguinte equação (94):

$$\text{mg } -NH_2\text{amostra} = pN_2 \times f$$

onde f é um fator tabelado para diferentes temperaturas.

A determinação da lisina através do auto-analisador de aminoácidos foi feita tendo em vista que a medida de nitrogênio amínico primário

rio não pode ser considerada, neste caso, como representativa da lisina residual, uma vez que este aminoácido, ao reagir com a gli cose, pode formar α -derivados ou ϵ -derivados, bem como α , ϵ -derivados (58). Estes derivados também reagem com a ninidrina, podendo ser detectados pelo analisador de aminoácidos. Os cromatogramas obtidos (figuras 26 a 29) de fato apresentaram um pico adicional ao da lisina, com tempo de eluição menor, e que poderia corresponder a um dos referidos derivados. A identificação desse com posto não pôde, no entanto, ser feita devido às dificuldades na obtenção dos padrões necessários.

No presente estudo, a concentração de $-NH_2$ determinada nos sistemas contendo glicina ou ácido glutâmico pode ser considerada como representativa do conteúdo de aminoácido, uma vez que, nesses sis temas, cada amino-grupo livre corresponde a uma molécula de aminoácido que não reagiu.

B) Resultados

1. Tratamento cinético do escurecimento

Alguns autores (26, 92), analisando o aspecto cinético da reação de Maillard após o aparecimento de cor em sistemas-modelo, interpretaram o início da curva do logaritmo da absorbância em relação ao tempo como sendo representativo de uma reação de pseudo primeira ordem, e calcularam as constantes específicas de velocidade para a reação de escurecimento através da inclinação da parte reta da curva traçada. Tal tratamento não parece ser o mais adequado, já que o próprio aspecto da curva (figuras 1, 2 e 3) sugere que

não há uma constante de velocidade única para a reação, além de que, uma vez iniciado o escurecimento, não existe somente um composto cujo acúmulo seria responsável pelo aumento da cor. Por outro lado, o aumento da absorbância depende da absortividade molar das várias moléculas presentes, podendo aumentar, por exemplo, através de um aumento de insaturação ou conjugação, ou do peso molecular, sem que isto implique no aumento da concentração das espécies presentes. Dessa forma, tem-se que num mesmo sistema, durante o escurecimento, ocorrem simultaneamente diferentes tipos de reação, o que torna difícil a definição de uma ordem cinética para a reação de escurecimento.

No presente trabalho, o aspecto cinético do escurecimento foi analisado com base na existência de uma variação linear da absorbância em relação ao quadrado do tempo de reação, para todos os sistemas, como pode ser visto nas figuras 4 a 11. A mesma dependência foi encontrada por Haugaard et al (22) em sistemas contendo glicose e glicina, submetidos a condições experimentais drásticas.

A partir dos dados experimentais (tabelas 2 a 6) foram calculadas, por regressão linear, as equações das retas obtidas nos diferentes sistemas (tabela 8), as quais apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,99. Estas retas podem ser representadas pela seguinte equação geral:

$$A_{450} = m + nt^2 \quad (\text{equação 1})$$

onde, A_{450} - absorbância a 450 nm

m - intersecção da reta com o eixo y

n - inclinação da reta

t - tempo de reação (h).

Utilizando-se a equação da reta relativa ao que foi considerado como a primeira fase do escurecimento, foi calculado o tempo de indução (período de tempo até o aparecimento da cor) para cada sistema-modelo, admitindo-se que, durante este período, a absorvância dos sistemas permaneceu igual a zero. Os tempos de indução, que se encontram na tabela 10, não são necessariamente os valores reais, uma vez que foram poucos os dados disponíveis para o cálculo da equação da reta correspondente à primeira fase do escurecimento; por outro lado, a estimativa do tempo de indução permitiu a obtenção de dados comparativos quanto à reatividade dos diferentes aminoácidos nas condições de reação empregadas.

Derivando-se a equação 1 em relação ao tempo, temos que:

$$\frac{\partial A_{450}}{\partial t} = 2 n t \quad (\text{equação 2})$$

onde o termo $\frac{\partial A}{\partial t}$ representa a variação da absorvância com o tempo, ou seja, a velocidade do escurecimento (v_e). Se a equação 2 for derivada em relação ao tempo, temos que:

$$\frac{\partial v_e}{\partial t} = 2 n \quad (\text{equação 3})$$

onde $2 n$ é a variação da velocidade de escurecimento com o tempo, ou a aceleração (a) da velocidade da reação. Dessa forma, utilizando-se as equações das retas obtidas para cada sistema (tabela 8), foram calculados dois valores de aceleração, a_1 e a_2 , corresponden

tes, respectivamente, a uma primeira e a uma segunda fase do escurecimento (tabela 10). No caso do sistema glu3Cu, até 240 horas de reação, obteve-se um único valor de aceleração. Pelos dados da tabela 10, verifica-se que a aceleração inicial do escurecimento - dependeu da reatividade de cada aminoácido e, para o mesmo aminoácido, variou conforme o pH do meio.

Analisando-se as figuras 4 a 11 observa-se que, para cada sistema, existiu um intervalo de tempo de reação em que ocorreu uma mudança na inclinação da reta correspondente à primeira fase do escurecimento, mudança esta que foi traduzida como um aumento ou diminuição da aceleração da reação. Embora não seja possível definir exatamente, para cada sistema, o intervalo de tempo em que tal mudança ocorreu, os resultados obtidos mostram que o tempo correspondente à intersecção das retas traçadas para um mesmo sistema situam-se dentro daquele intervalo de tempo (tabela 9).

2. Comportamento dos aminoácidos, efeito do pH e do íon Cu^{2+}

O não aparecimento de cor nos sistemas contendo somente glicose mostra que, nas condições de reação empregadas, não houve caramelização do açúcar e portanto o escurecimento observado nos vários sistemas-modelo foi devido apenas à reação de Maillard.

Pelos dados da tabela 10 verifica-se que, dos aminoácidos estudados, o mais reativo foi a lisina, que possui dois amino-grupos capazes de participar da reação. O ácido glutâmico, apesar de possuir apenas um amino-grupo, mostrou-se mais reativo que a glicina a pH 6,2, o que poderia estar associado à ação catalítica do grupo

carboxila no C₄. Este grupo, devido à flexibilidade da cadeia, poderia catalisar reações de enolização, de modo semelhante à ação catalítica de ácidos carboxílicos comuns (41, 60). A não formação de melanoidinas no sistema glu3 (tabela 5) pode ser atribuída à baixa concentração do ácido glutâmico (0,15 M) (60, 79, 89), uma vez que as demais condições de reação foram as mesmas que para os sistemas lys3 e gly3.

O decréscimo do pH durante a reação de Maillard tem sido atribuído à remoção do amino-grupo do aminoácido pela interação com o açúcar (9, 11, 62). No entanto, parece pouco provável que a formação dos compostos iniciais de adição seja suficiente para fazer com que o pH do sistema se altere, como é mostrado nas figuras 12, 13 e 14. Nos sistemas considerados, o valor do pH inicial começou a variar somente decorridas 20-30 horas de reação, quando esses sistemas já apresentavam coloração. É, portanto, possível que os maiores responsáveis pela variação do pH sejam intermediários formados em estágios mais avançados da reação de Maillard.

Em experimentos preliminares em que foram incubadas a 50°C soluções de melanoidinas puras (obtidas conforme IV. C.), em água a pH 6,2, observou-se que o pH das soluções diminuía durante o aquecimento, enquanto que as suas absorbâncias permaneciam as mesmas ou ocorria precipitação das melanoidinas. Após 96 horas, as diminuições de pH nas soluções de melanoidinas correspondentes aos aminoácidos lisina, ácido glutâmico e glicina foram, respectivamente: 0,7, 0,4 e 0,4 unidade de pH. Essas observações sugerem que também as melanoidinas que se formam nos estágios finais da reação de Maillard seriam responsáveis pelos decréscimos do pH

dos sistemas. Ainda, parece provável que, após determinado estágio da reação, modificações adicionais na estrutura da melanoidina não mais afetam a absorvância da solução.

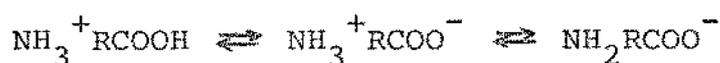
Os dados das figuras 1, 2, 3, 12, 13 e 14 mostram que não há uma relação direta entre variação de pH e escurecimento. Observa-se, - porém, que nos sistemas com íons Cu^{2+} houve um maior decréscimo do pH e um maior escurecimento durante as 240 horas de reação. Nas figuras 12, 13 e 14 podem ser observados intervalos de tempo em que o pH não sofreu mudanças, enquanto que nas figuras 1, 2 e 3 verifica-se que não ocorreram patamares nas curvas de absorvância, as quais mostram um aumento gradativo e contínuo do escurecimento. Comparando-se tais observações com os dados de consumo de glicose e de $-\text{NH}_2$ para os sistemas analisados (figuras 15, 16 e 19 a 22), verifica-se que, com exceção dos sistemas glu6 e glu6Cu, nos sistemas sem íons Cu^{2+} houve intervalos de tempo correspondentes nos quais o consumo dos reagentes iniciais não sofreu alterações significativas. Nos sistemas gly6Cu e lys6Cu, o escurecimento aumentou e o pH caiu em períodos em que não houve alteração significativa - no consumo de glicose e de $-\text{NH}_2$. O escurecimento e quedas de pH correspondentes seriam, neste caso, provenientes de alterações no próprio polímero. O consumo contínuo dos reagentes nos sistemas contendo ácido glutâmico a pH 6,2 (figuras 19 e 20) poderia estar associado às pequenas variações do pH observadas nestes sistemas, de maneira que o pH, sendo mantido mais alto, favoreceria a reação inicial de adição.

As figuras 1, 2 e 3 mostram que a pH 6,2 o escurecimento se iniciou num tempo relativamente menor àquele observado a pH 3,0. Admi

tindo-se que:

- a) a reação de Maillard se inicia com o ataque nucleofílico do amino-grupo ao grupo carbonila do açúcar;
- b) a pH 3,0 e a pH 6,2 a forma acíclica da glicose deverá estar presente;
- c) a variação de pH entre 3,0 e 6,2 não altera significativamente a velocidade de mutarrotação da glicose (100),

a velocidade da reação nos diferentes pH irá depender da reatividade do aminoácido nessas condições. Considerando-se ainda que em soluções aquosas existe um equilíbrio entre as formas aniônica, catiônica e zwitteriônica do aminoácido, em sistemas com pH baixo o equilíbrio:



favorece a forma catiônica e a reação é inibida. Em pH mais alto o equilíbrio favorece a forma aniônica e a adição nucleofílica é facilitada.

Os dados da tabela 10 mostram que, apesar das reatividades dos vários aminoácidos determinarem as diferentes velocidades de reação, o escurecimento nos sistemas gly3 e lys3 se iniciou em tempos próximos. Ainda nesses mesmos sistemas, o consumo de glicose se iniciou num tempo duas vezes menor relativamente ao início do consumo de $-\text{NH}_2$ (figuras 17, 18, 23 e 24). Tais resultados sugerem que, a pH 3,0, os primeiros compostos responsáveis pelo escurecimento teriam sido formados, principalmente, através de transformações da glicose pelo meio ácido. No sistema gly3, por exemplo, o consumo de glicose nas primeiras 70 horas de reação chegou a ser 8 vezes

superior ao consumo de glicina (figuras 23 e 24).

Para todos os sistemas, a existência de um período de indução antes do aparecimento da cor (tabela 10) parece indicar que é necessária a presença de uma determinada quantidade de intermediários incolores antes que se formem os compostos coloridos. A adição de íons Cu^{2+} diminuiu esses tempos de indução, especialmente nos sistemas a pH 3,0, além de que os tempos de indução se tornaram semelhantes para os três aminoácidos, tanto a pH 6,2 como a pH 3,0.

O modo de ação do íon Cu^{2+} pode ser tentativamente explicado considerando-se, pelo menos, duas possibilidades: a primeira relaciona-se à atuação desse íon na interação inicial entre o açúcar e o aminoácido, levando à formação dos intermediários necessários ao escurecimento em tempo menor; a segunda possibilidade envolve a ação do íon Cu^{2+} sobre intermediários formados após a reação inicial entre o aminoácido e o açúcar ou seus produtos de degradação, de tal forma que esses compostos se transformariam com maior rapidez, formando os produtos responsáveis pela cor. Quanto à primeira possibilidade, a mesma está relacionada à observação (100) de que os íons Cu^{2+} aceleram a mutarotação da glicose, aumentando as possibilidades de adição nucleofílica ao grupo carbonila. A possibilidade de interação do íon Cu^{2+} com os intermediários incolores é baseada, por sua vez, na observação do efeito acelerador de íons Fe^{3+} em fases da reação de Maillard posteriores à interação inicial entre o açúcar e o aminoácido (64, 65).

Estudos anteriores (92) sobre o efeito do íon Cu^{2+} no escurecimento de soluções contendo glicose e glicina, nas mesmas condições -

de reação empregadas no presente trabalho, mostraram que a ação desse íon era crescente com o aumento de sua concentração no intervalo de 20 a 100 ppm. Considerando-se que 20 ppm de íons Cu^{2+} são suficientes para complexar com todo amino-grupo não protonado da glicina (0,66 M) a pH 6,2 e, portanto, também a pH 3,0, o maior efeito catalítico do íon Cu^{2+} quando em concentrações mais altas sugere que a sua ação dependeria da quantidade de íon livre em solução. Esta hipótese explicaria então a maior atividade catalítica do íon Cu^{2+} a pH 3,0, uma vez que, neste pH, a quantidade de amino-grupo não protonados dos diferentes aminoácidos é da ordem de 10^3 vezes menor que a pH 6,2 e, portanto, menos íon Cu^{2+} é complexado.

Através dos dados da tabela 10, pode também ser observado que o efeito do íon Cu^{2+} foi maior na primeira fase do escurecimento, em todos os sistemas-modelo. Esta observação concordaria com a hipótese sugerida de que a ação desse íon dependeria da sua concentração livre em solução, a qual seria diminuída em estágios mais adiantados da reação, devido à complexação desse íon (101) com as melanoidinas formadas durante o escurecimento.

Os dados obtidos neste estudo não permitem uma caracterização completa da ação catalítica do íon Cu^{2+} na reação de Maillard, pois embora o aumento do consumo dos reagentes no início da reação seja sensível a pH 3,0, em outros casos, como acontece com o sistema gly6, o consumo de glicose foi menor na presença desse íon. Deve também ser considerado o grande aumento nas absorbâncias dos vários sistemas na presença de íons Cu^{2+} , apesar do consumo final dos reagentes ter sido aparentemente semelhante na presença e

na ausência desse íon, para a maioria dos sistemas.

A proporção entre o consumo de glicose e de $-NH_2$ no final do tempo de reação (tabela 11) mostra que a perda de aminoácido, relativamente à perda de glicose, foi maior a pH 3,0 do que a pH 6,2. - Considerando-se que o mesmo teor de nitrogênio é incorporado nas melanoidinas tanto a pH 6,2 como a pH 3,0 (99), pode ser admitido que a pH 3,0 houve formação de compostos N-heterocíclicos estáveis em maior quantidade. Estes compostos poderão ter toxidez suficiente para explicar os efeitos tóxicos, sobre animais e microorganismos, de sistemas em que ocorreu a reação de Maillard (102).

Também nos sistemas contendo ácido glutâmico a pH 6,2 teriam sido favorecidas as reações que levam à formação de compostos N-heterocíclicos, que seriam estáveis e permaneceriam em solução, não sendo incorporados às melanoidinas. Tal fato justificaria o baixo teor de nitrogênio na melanoidina correspondente ao ácido glutâmico (tabela 13), tendo em vista as perdas elevadas de $-NH_2$ nos sistemas contendo este aminoácido (tabela 11).

Os espectros infravermelho das diferentes melanoidinas (figuras 30, 31 e 32) mostram os mesmos grupos funcionais, o que indica que, embora o aminoácido de partida tenha sido diferente, as melanoidinas finais foram semelhantes entre si. Esta semelhança poderia ser explicada admitindo-se que as melanoidinas seriam formadas pela polimerização de compostos contendo, principalmente, produtos de degradação do açúcar, que seriam os mesmos nos sistemas correspondentes aos três aminoácidos estudados, uma vez que foi utilizada a glicose em todos eles.

Nos sistemas lys6 e lys6Cu, após um período de consumo equimolar de glicose e de $-NH_2$ (figuras 15 e 16), parte dos amino-grupos anteriormente combinados foi liberada, o que está provavelmente associado à decomposição de cetoseaminas, com liberação do aminoácido e formação de compostos carbonílicos mais reativos (84). Estes compostos sofreriam novas transformações e/ou reagiriam novamente com o aminoácido, dando seqüência às reações que levam à formação de compostos coloridos. Também nos sistemas contendo glicina existem intervalos de tempo em que teria ocorrido uma liberação do aminoácido (figuras 22 e 24).

Os dados do consumo de glicose e de $-NH_2$ nos sistemas glu6 e glu6Cu (figuras 19 e 20) indicam a formação de derivados mono e dissustituídos até aproximadamente 20 horas de reação. Decorrido este tempo, as velocidades de consumo de ambos os reagentes foram praticamente iguais entre si e as mesmas nos dois sistemas, sugerindo a formação de intermediários monossustituídos.

As curvas relativas ao consumo dos reagentes nos sistemas contendo glicina, a pH 6,2 e 3,0, na presença de íons Cu^{2+} (figuras 21 a 24), mostram que, pelo menos até 70 horas de reação, houve formação de intermediários envolvendo o aminoácido e a glicose ou produtos de sua degradação, na relação molar de 1:1. Decorrido esse tempo, no sistema a pH 6,2 teria ocorrido também a formação de derivados dissustituídos da glicina, o que é traduzido por um consumo de glicose superior ao de aminoácido no final do tempo de reação (tabela 11). Perdas de glicose superiores às de glicina têm sido encontradas por vários autores (48, 55, 63), tendo sido identificadas, em algumas misturas de reação, tanto a presença de mo-

nofrutoseglicina como a de difrutoseglicina (44, 63).

VII. CONCLUSÕES

Os resultados das experiências permitem concluir que:

- A) Não é possível determinar-se com segurança a ordem cinética de reação para o escurecimento não enzimático, para o qual existem períodos de tempo em que a velocidade da reação é independente do consumo de glicose e de aminoácido.
- B) A absorvância nos sistemas estudados é proporcional ao quadrado do tempo de reação.
- C) A ordem decrescente de escurecimento a pH 6,2 com e sem íons Cu^{2+} , em relação ao aminoácido presente, é: aminoácido básico, aminoácido ácido, aminoácido neutro. A pH 3,0, a ordem decrescente, na ausência de íons Cu^{2+} , é: aminoácido básico, aminoácido neutro, ocorrendo o inverso na presença de íons Cu^{2+} .
- D) A velocidade do escurecimento nos sistemas estudados apresenta acelerações distintas para cada aminoácido e dependentes do pH para um mesmo aminoácido.
- E) Não existe uma relação direta entre intensidade de escurecimento e decréscimo de pH ou consumo de glicose e de aminoácido durante a reação de Maillard.

- F) A pH 3,0 a velocidade do escurecimento é menor que a pH 6,2 e está relacionada à protonação do amino-grupo, favorecendo a degradação ácida da glicose.
- G) O período de indução corresponde à formação e acúmulo de intermediários incolores, com ou sem nitrogênio na molécula, conforme o pH, até uma concentração efetiva para o prosseguimento da reação.
- H) O período de indução é diminuído pela presença de íons Cu^{2+} , especialmente a pH 3,0.
- I) Íons Cu^{2+} são catalisadores da reação de Maillard, mais efetivos na fase inicial, atuando também na transformação dos intermediários formados. Tanto a pH 6,2 como a pH 3,0, os íons Cu^{2+} tendem a igualar os períodos de indução para os aminoácidos básico, ácido e neutro. Na presença desses íons ocorre um maior escurecimento e, a pH 6,2, também um maior decréscimo do pH.
- J) O efeito dos íons Cu^{2+} a pH 6,2, na fase inicial do escurecimento, é decrescente na ordem: ácido glutâmico, glicina, lisina. Na fase posterior da reação, o efeito é o mesmo para os três aminoácidos. A pH 3,0 o efeito do íon Cu^{2+} permanece maior para a glicina relativamente à lisina.
- K) A formação de derivados incolores contendo nitrogênio é favorecida para o ácido glutâmico, a pH 6,2.

L) As melanoidinas obtidas a partir de glicose e diferentes aminoácidos apresentam os mesmos grupos funcionais.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MAILLARD, L.C. - Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoidines par voie méthodique. Compt. rend. 154: 66-68 (1912).
2. BORSOOK, H. & WASTENEYS, H. - Interaction of free amino nitrogen and glucose. Biochem. J. 19: 1128-1137 (1925).
3. VON EULER, H. & JOSEPHSON, K. - Reactions between sugars and amines. A reaction between glucose and glycine. Z. Phisyol. Chem. 153: 1-9 (1926). In: Chem. Abs. 20: 3159 (1926).
4. WATANABE, J. - Action of sugar on aminoacid. I. The reaction in alkaline medium. J. Biochem. 16: 163-189 (1932).
5. WEBB, B.H. - Color development in lactose solutions during heating with special reference to the color of evaporated milk. J. Dairy Sc. 18: 81-96 (1935).
6. FRANKEL, M. & KATCHALSKY, A. - The interaction of α -amino-acids and peptides with sugars in aqueous solution. Biochem. J. 31: 1595-1604 (1937).
7. FRANKEL, M. & KATCHALSKY, A. - The time factor in the interaction of amino-acids with sugars. Biochem. J. 32: 1904-1907 (1938).
8. CANTOR, S.M. & PENISTON, Q.P. - The reduction of aldoses at

the dropping mercury cathode. Estimation of the aldehyde structure in aqueous solution. J. Am. Chem. Soc. 62: 2113-2121 (1940).

9. KATCHALSKY, A. - Interaction of aldoses with α -amino-acids or peptides. 3. Determination of equilibrium constants. Biochem. J. 35: 1024-1027 (1941).
10. FRANKEL, M. & KATCHALSKY, A. - Interaction of aldoses with α -amino-acids or peptides. The percentage combination. Biochem. J. 35: 1028-1034 (1941).
11. FRANKEL, M. & KATCHALSKY, A. - Interactions of aldoses with α -amino-acids or peptides. 5. Continuous back titration of the system to its initial pH. Biochem. J. 35: 1034-1038 (1941).
12. RICE, R.G.; KERTESZ, Z.I. & STOTZ, E.H. - Color formation in furfural systems. J. Am. Chem. Soc. 69: 1798-1800 (1947).
13. WOLFROM, M.L.; CAVALIERI, L.F. & CAVALIERI, D.K. - Chemical interactions of amino compounds and sugars. II. Methylation experiments. J. Am. Chem. Soc. 69: 2411-2413 (1947).
14. LEWIS, V.M.; ESSELEN, Jr., W.B. & FELLERS, C.R. - Nitrogen-free carboxylic acids in the browning reaction. Ind. Eng. Chem. 41 (11): 2591-2594 (1949).
15. WOLFROM, M.L.; SHULTZ, R.D. & CAVALIERI, L.F. - Chemical

- interaction of amino compounds and sugars. IV. Significance of amino compounds and furan derivatives in color formation. J. Am. Chem. Soc. 71, 3518-3523 (1949).
16. LEA, C.H. & HANNAN, R.S. - Studies of the reaction between proteins and reducing sugars in the dry state. I. The effect of activity of water, of pH and of temperature on the primary reaction between casein and glucose. Biochim. et Biophys. Acta 3: 313-325 (1949).
17. LEA, C.H. - The role of amino-acids in the deterioration of food: the browning reaction. Chemistry & Industry, 155-158 (1950).
18. LEA, C.H. & HANNAN, R.S. - Studies on the reaction between proteins and reducing sugars in the dry state. II. Further observations on the formation of the casein-glucose complex. Biochim. et Biophys. Acta 4: 518-531 (1950).
19. LEA, C.H. & HANNAN, R.S. - Studies on the reaction between proteins and reducing sugars in the dry state. III. Nature of the protein groups reacting. Biochim. et Biophys. Acta 5: 433-454 (1950).
20. THOMPSON, J.B. - A browning reaction involving copper proteins. In: Symposium on Copper Metabolism. Johns Hopkins Press, 1950, p. 141-153. In: Chem. Abs. 47: 11269f (1953).
21. GOTTSALK, A. & PARTRIDGE, S.M. - Interaction between simple

- sugars and amino acids. *Nature* 165: 684-685 (1950).
22. HAUGAARD, G.; TUMERMAN, L. & SILVESTRI, H. - A study on the reaction of aldoses and aminoacids. *J. Am. Chem. Soc.* 73: 4594-4600 (1951).
23. BEACHAM, H.H. & DULL, M.F. - Some observation on the browning reaction. *J. Food Res.* 16 (5): 439-445 (1951).
24. CHICHESTER, C.O.; STADTMAN, F.H. & MACKINNEY, G. - On the products of the Maillard reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 74: 3418-3420 (1952).
25. HANNAN, R.S. & LEA, C.H. - Studies on the reaction between proteins and reducing sugars in the dry state. VI. The reactivity of the terminal amino groups of lysine in model systems. *Biochim. et Biophys. Acta* 9: 293-305 (1952).
26. WOLFROM, M.L.; KOLB, D.K. & LANGER Jr., A.W. - Chemical interactions of amino compounds and sugar. VII. pH dependency. *J. Am. Chem. Soc.* 75: 3471-3473 (1953).
27. HODGE, J.E. & RIST, C.E. - The Amadori rearrangement under new conditions and its significance for nonenzymatic browning reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 75: 316-322 (1953).
28. GIRI, K.V.; RAO, P.B.R. & RAJAGOPALAN, R. - Some studies on the destruction of aminoacids in proteins caused by autoclaving in presence of glucose. *J. Food Res.* 18 (2): 217-222 (1953).

29. SCHWIMMER, S. & OLCOTT, H.S. - Reaction between glycine and the hexose-phosphates. J. Am. Chem. Soc. 75, 4855-4856 (1953).
30. WOLFROM, M.L. & ROONEY, C.S. - Chemical interaction of amino compounds and sugars. VIII. Influence of water. J. Am. Chem. Soc. 75: 5435-5436 (1953).
31. SCHROEDER, L.J.; IACOBELLIS, M. & SMITH, A.H. - The influence of water and pH on the reaction between amino compounds and carbohydrates. J. Biol. Chem. 212: 973-983 (1955).
32. KATO, H. - Studies on browning reactions between sugars and amino compounds. Part I. pH dependency of browning interactions between various kinds of reducing sugars and amino compounds. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan 20, 273-278 (1956).
33. PETIT, M.L. - Complexion du cuivre par les produits de la réaction de Maillard: dosage d'un intermediaire de la formation des mélanoidines. Compt. Rend. 242: 829-831 (1956).
34. KATO, H. - Studies on browning reaction between sugars and amino compounds. Part II. Significance of N-glycosides for browning reactions. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan 20: 279-283 (1956).
35. LEWIN, S. - Some aspects of the effect of the initial pH on the behaviour of glucose in the amino acid-glucose

- interactions. *Biochem. J.* 65: 30 p. Part 3 (1957).
36. DUBOURG, J. & DEVILLERS, P. - Contribution a l'étude de la réaction de Maillard. *Bull. Soc. Chim.* 3: 333-336 (1957).
37. ANET, E.F.L.J. - Chemistry of non-enzymic browning. II. Some crystalline amino acid-deoxy-sugar. *Aust. J. Chem.* 10: 193-197 (1957).
38. WILLITS, C.O.; UNDERWOOD, J.C.; LENTO, H.G. & RICCIUTI, C. - Browning of sugar solutions. I. Effect of pH and type of amino acid in dilute sugar solutions. *Food Res.* 23 (1): 61-67 (1958).
39. LENTO, H.G.; UNDERWOOD, J.C. & WILLITS, C.O. - Browning of sugar solutions. II. Effect of the position of amino group in the acidic molecule in dilute glucose solutions. *Food Res.* 23, (1): 68-71 (1958).
40. NORDIN, P. & KIM, Y.S. - Browning and the Amadori rearrangement. *Agr. Food Chem.* 6, (10): 765-766 (1958).
41. ISBELL, H.S. & FRUSH, H.L. - Mutarotation, hydrolysis and rearrangement reactions of glycosylamines. *J. Org. Chem.* 23: 1309-1319 (1958).
42. UNDERWOOD, J.C.; LENTO, H.G. & WILLITS, C.O. - Browning of sugar solutions. III. Effect of pH on the color produced in dilute glucose solutions containing amino acids with

the amino group in different positions in the molecule.
Food Res. 24 (2): 181-184 (1959).

43. REYNOLDS, T.M. - Chemistry of non-enzymic browning. III. Effect of bisulphite, phosphate and malate on the reaction of glycine and glucose. Aust. J. Chem. 12: 265-274 (1959).
44. ANET, E.F.L.J. - Chemistry of non-enzymic browning. VII. Crystalline Di-D-fructose-glycine and some related compounds. Aust. J. Chem. 12: 280-287 (1959).
45. ANET, E.F.L.J. - Difrutose-aminoacids as intermediates in browning reactions. Aust. J. Chem. 12: 491-496 (1959).
46. POMERANZ, Y.; JOHNSON, J.A. & SHELLENBERGER, J.A. - Effects of various sugars on browning. J. Food Sc. 27: (4) 350-354 (1962).
47. CAMPAGNE, Y. - Action des acides aminés sur le glucose. Ind. Aliment. Agr. 79: 529-536 (1962).
48. CAMPAGNE, Y. - Action du glucose sur les acides aminés. Ind. Aliment. Agr. 80: 935-940 (1963).
49. BURTON, H.S. & MACWEENY, D.J. - Non-enzymatic browning reactions: Consideration of sugar stability. Nature 197: 266-268 (1963).
50. BURTON, H.S.; MACWEENY, D.J. & BILTCLIFFE, D.O. - Non-enzymatic

browning reactions. Development of chromophores in the glucose-glycine and sucrose-glycine systems. J. Food Sc. 28 (6): 631-639 (1963).

51. MARKUZE, Z. - Effects of traces of metal on the browning of glucose-lysine solutions. Roczniki Panstworwego Zakladu Hig 14 (1): 65-70 (1963). In: Chem. Abs. 59: 4980h (1963).
52. ADRIAN, J. - La réaction de Maillard. II. Étude du comportement de six acides aminés purs. Ann. Nutr. Alim. 17 (2): 1-35 (1963).
53. MONTGOMERY, M.W. & DAY, E.A. - Aldehyde-amine condensation reaction. A possible fate of carbonyls in foods. J. Food Sc. 30 (5): 828-832 (1965).
54. SAUNDERS, J. & JERVIS, F. - The role of buffer salts in non-enzymic browning. J. Sci. Fd. Agric. 17: 245-249 (1966).
55. HOLTERMAND, A. - The browning reaction. Brewers Digest. 58-66, Dez. (1966).
56. SONG, P.S.; CHICHESTER, C.O. & STADTMAN, F.H. - Kinetic behaviour and mechanism of inhibition in the Maillard reaction. I. Kinetic behaviour of the reaction between D-glucose and glycine. J. Food Sc. 31 (6): 906-913 (1966).
57. SONG, P.S. & CHICHESTER, C.O. - Kinetic behaviour and mechanism of inhibition in the Maillard reaction. II.

Mechanistic considerations in the reaction between D-glucose and glycine. J. Food Sc. 31 (6): 914-926 (1966).

58. HEYNS, K.; MÜLLER, G. & PAULSEN, H. - Quantitative Untersuchungen der reaktion von hexosen mit aminosäuren. Liebigs Ann. Chem. 703: 202-214 (1967).
59. KOEHLER, P.E.; MASON, M.E. & NEWELL, J.A. - Formation of pyrazine compounds in sugar-amino acid model systems. Agric. Food Chem. 17 (2): 393-396 (1969).
60. KATO, H.; YAMAMOTO, M. & FUJIMAKI, M. - Mechanisms of browning degradation of D-fructose in special comparison with D-glucose-glycine reaction. Agric. Biol. Chem. 33, (6): 939-948 (1969).
61. FREIMUTH, U. & TRÜBSBACH, A. - Versuche zur Maillard-reaktion. 3. Mitt. nachweis einer ninhydrinpositiven substanz in proteinhydrolysaten nach Maillard-reaktion. Nahrung 13 (4): 311-316 (1969).
62. SPARK, A.A. - Role of amino acids in non-enzymic browning. J. Sci. Fd. Agr. 20, 308-316 (1969).
63. REYNOLDS, T.M. - Nonenzymic browning. Sugar-amine interactions. In: Symposium on foods: carbohydrates and their roles. ed. Schultz, H.W., Cain, R.F. & Wrolstad, R.W. AVI Publishing Co., Westport, Conn., 1969. p. 219-252.

64. UMEMOTO, S.; ISHII, S.; IRIE, Y. & IMAI, T. - Effects of trace iron on the amino-carbonyl reaction. I. Browning of glucose- β -alanine solution. Nippon Nogei Kagaku Kaishi 44 (2): 64-67 (1970). In: Chem. Abs. 77: 99883q (1972).
65. UMEMOTO, S.; ISHII, S.; IRIE, Y. & IMAI, T. - Effects of trace iron on the amino-carbonyl reaction. II. Browning degradation of fructose-amine. Nippon Nogei Kagaku Kaishi 44 (2): 71-76 (1970). In: Chem Abs. 77: 99884r (1972).
66. HEYDENREICH, G.A. - Modellversuche zur klärung nichtenzymatischer Bräunungs-reaktionen in Lebensmitteln. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 146 (4): 191-197 (1971).
67. FLEMING, M.; PARKER, K.J. & WILLIAMS, J.C. - Chemistry of browning reaction. Sugar J. 33 (11): 21-27 (1971).
68. JANÍČEK, G. & POKORNÝ, J. - Nichtenzymatische Bräunung. I. Mitteilug Reaktionen aliphatischer carbonylderivate mit aminen on modellsystemen. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 145 (3): 142-147 (1971).
69. POWEL, R.C.T. & SPARK, A.A. - Effects of zirconium and aluminium compounds and pH on the Maillard reaction. J. Sci. Food Agric. 22: 596-599 (1971).
70. EICHNER, K. & KAREL, M. - The influence of water content and water activity on the sugar-amino browning reaction in model systems under various conditions. J. Agric. Food Chem. 20 (2): 218-223 (1972).

71. MOTAI, H. & INOUE, S. - Conversion of color component of melanoidin produced from the glycine-xylose systems. Agric. Biol. Chem. 38 (2): 233-239 (1974).
72. MOTAI, H. - Color tone of various melanoidins produced from model systems. Agric. Biol. Chem. 37 (7): 1679-1685 (1973).
73. NAMIKI, M.; HAYASHI, T. & KAWAKISHI, S. - Free radicals developed in the amino-carbonyl reaction of sugars with amino acids. Agric. Biol. Chem. 37 (12): 2935-2936 (1973).
74. BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. & TREVISAN, L.M.V. - Maillard reaction. II. Catalytic effect of anions. Lebensm.-Wiss. u. Technol. 6 (6): 215-218 (1973).
75. OMURA, H.; FUJITA, A.; SATO, M.; OTSUKI, M. & IIO, M. - Reaction of triose reductone with several nitrogenous compounds. Sci. Bull. Fac. Agric. Kyushu Univ. 28 (2): 79-92 (1974).
76. SHINOHARA, K.; TSENG, Y.K.; INOUE, Y.; SATO, M. & OMURA, H. - Browning by the reaction of triose reductone and amino acids. Sci. Bull. Fac. Agric. Kyushu Univ. 28 (3): 139-144 (1974).
77. SHINOHARA, K.; TSENG, Y.K. & OMURA, H. - Browning and variation of absorption spectra by the reaction of triose reductone with amino acids under the co-existence of Cu^{2+} . Sci. Bull. Fac. Agric. Kyushu Univ. 29 (1-2): 23-30 (1974).
78. KOLKA, S. & SOKOLOWSKI, J. - Kinetics of Amadori rearrangement of N-D-glucosylamines. Roczniki Chemii - Ann. Soc. Chem.

Polonorum 44: 439-444 (1974).

79. WOLFROM, M.L.; KASHIMURA, N. & HORTON, D. - Factors affecting the Maillard browning reaction between sugars and amino acids. Studies on the nonenzymic browning of dehydrated orange juice. J. Agric. Food Chem. 22, (5): 796-800 (1974).
80. YU, M.H.; WU, M.T.; WANG, D.J. & SALUNKHE, D.K. - Nonenzymatic browning in synthetic systems containing ascorbic acid, amino acids, organic acids and inorganic salts. J. Inst. Can. Sci. Tech. Alim. 7 (4): 279-282 (1974).
81. HASHIBA, H. - A glucose-diglycine condensation product participating in oxygen-dependent browning. J. Agric. Food Chem. 23 (3): 539-542 (1975).
82. NAMIKI, M. & HAYASHI, T. - Development of novel free radicals during the amino-carbonyl reaction of sugars with amino acids. J. Agric. Food Chem. 23 (3): 487-491 (1975).
83. CIUSA, W.; MAZZARACCHIO, P. & BARBIROLI, G. - Ricerche sistematiche sulla reattività di 20 amminoacidi con mono e dissaccaridi e sui rendimenti in N-ammino deossi-cheto-derivati. Rassegna Chimica, 3, 143-152 (1975).
84. WARMBIER, H.C.; SCHNICKELS, P.A. & LABUZA, T.P. - Non enzymatic browning kinetics in an intermediate moisture model system: effect of glucose to lysine ratio. J. Food

Sc. 41: (5) 981-983 (1976).

85. BARBETTI, P. - Effetto del grado di umidità sulla reazione di Maillard: studio di alcuni sistemi-modello allo stato condensato. *Ind. Alimentari* 128 (5): 94-98 (1976).
86. BARBETTI, P. - Effetti del pH sulla reazione di Maillard: studio del sistema lattosio-glicina. *Ind. Alimentari* 126 (3): 101-103 (1976).
87. HEYNS, K. & HEUKESHOVEN, J. - Mechanismus der Reaktion von Hexulosen und partiell methylierten hexulosen mit aminosäuren. *Liebigs Ann. Chem.*, 585-599 (1976).
88. ADRIAN, J. & FRANGNE, R. - Le comportement des protéolysats au cours de la réaction de Maillard. 1. La réactivité d'une protéine in fonction de son degré de protéolyse. *Ind. Aliment. Agr.* 1: 23-28 (1976).
89. CÁRDENAS, L.G.; ARMAS, A.L.; MARCHENA, M.R.D. & BOBROVNIK, L. Algunos aspectos del papel de los aminoácidos en la reacción amino-carbónica. *Cent. Azucar* 4 (2): 53-68 (1977).
90. ÖRSI, F. & DWORSCHÁK, E. - Study into the Maillard reaction occurring between methionine and tryptophan on the one hand and glucose on the other. Part I. Studies in aqueous solutions. *Acta Alimentaria* 6 (1): 59-71 (1977).

91. DWORSCHÁK, E. & ÖRSI, F. - Study into the Maillard reaction occurring between methionine and tryptophan on the one hand and glucose on the other. Part II. Studies in melts. *Acta Alimentaria* 7 (1): 41-55 (1978).
92. WANG, S.H.; BOBBIO, F.O. & BOBBIO, P.A. - Maillard Reaction IV. The effect of Cu, Ca, Zn and Mn ions. *An. Acad. brasil. Ciênc.* 50 (1): 55-59 (1978).
93. OLSSON, K.; PERNEMALM, P.A. & THEANDER, O. - Formation of aromatic compounds from carbohydrates. VII. Reaction of D-glucose and glycine in slightly acidic aqueous solution. *Acta Chem. Scand. B* 32 (4): 249-256 (1978).
94. VAN SLIKE, D.D. - Manometric determination of primary amino nitrogen and its application to blood analysis. *J. Biol. Chem.* 83: 425-447 (1929).
95. BARHAM, D. & TRINDER, P. - An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst* 97: 142-145 (1972).
96. SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. & MOORE, S. - Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. *Anal. Chem.* 30: 1190-1206 (1958).
97. HORWITZ, W., ed. - Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 12. ed. Washington, D.C., A.O.A.C., 1975, p. 927.

98. STECHER, P.G., ed. - The Merck index; an encyclopedia of chemicals and drugs. 8. ed. Rahway, N.J., Merck. 1968, p. 497.
99. 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).
100. BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O.; RODRIGUES, L.R. & REYES, F.G.R. Mutarotation I. Effect of Cu^{+2} and Ca^{+2} on the mutarotation of glucose. An. Acad. brasil. Cienc. 50 (2): 255-257 (1978).
101. KAJIMOTO, G.; YOSHIDA, H. & TAKAMORI, Y. - Studies on the metal-protein complex. V. Reactions between the browning reaction products from glycine and reducing sugars and metals. Oil Chem. 24 (1): 15-21 (1975).
102. ADRIAN, J. - Nutritional and physiological consequences of the Maillard reaction. World Review of Nutrition and Dietetics 19: 71-122 (1974).

RESUMO

A reação de Maillard foi estudada em sistemas-modelo contendo glicose (1,25 M) e aminoácido (0,66 M), a pH 6,2 e 3,0, a 50°C, na presença e na ausência de íons Cu^{2+} . Foram também preparadas melanoidinas a partir dos mesmos sistemas-modelo, a pH 6,2 e a 90°C. A reação foi acompanhada pela medida da absorvância a 450 nm e foi determinado o consumo de glicose e de nitrogênio amínico primário.

A ordem decrescente de escurecimento a pH 6,2, com e sem íons Cu^{2+} , em relação ao aminoácido presente, foi: lisina, ácido glutâmico, glicina. A pH 3,0, na ausência de íons Cu^{2+} , os sistemas-modelo com lisina escureceram mais que aqueles contendo glicina, sendo esta seqüência invertida na presença dos íons cúpricos.

A absorvância dos sistemas estudados variou com o quadrado do tempo de reação, sendo a velocidade do escurecimento proporcional a acelerações características para cada aminoácido e para cada pH.

Não foi encontrada uma relação direta entre intensidade de escurecimento e decréscimo de pH ou consumo de glicose e de aminoácido durante a reação de Maillard.

Os íons Cu^{2+} diminuíram o tempo de indução (tempo necessário para o aparecimento da cor), especialmente a pH 3,0.

Espectroscopia no infravermelho mostrou que as melanoidinas obtidas por reação entre glicose e glicina, lisina ou ácido glutâmico apresentavam os mesmos grupos funcionais.

SUMMARY

The Maillard reaction was studied in model systems containing glucose (1.25 M) and aminoacid (0.66 M), at pH 6.2 and 3.0 at 50°C, in the presence or absence of cupric ions. Melanoidins were prepared from the same model systems, at pH 6.2 and 90°C. The reaction was followed by measuring the absorbance at 450 nm, and the loss of glucose and primary amino nitrogen was determined.

The intensity of browning at pH 6.2, with or without Cu^{2+} ions, was in decreasing order in relation to: lysine, glutamic acid glycine. At pH 3.0, in the absence of Cu^{2+} ions, the system with lysine browned more than that containing glycine, this sequence being changed in the presence of the cupric ions.

The absorbance of the model systems varied with the square of the reaction time, and the browning velocity was proportional to accelerations characteristics for each aminoacid and for each pH.

No direct relationship was observed between intensity of browning and decreasing of pH or loss of glucose and aminoacid during the Maillard reaction.

The induction period (time needed for the appearance of color) diminished in the presence of cupric ions, especially at pH 3.0.

Infrared spectroscopy showed that the melanoidins obtained from the reaction between glucose and glycine, lysine or glutamic acid contained the same functional groups.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor André Tosello, Diretor da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola.

Ao Professor Paulo Anna Bobbio, pela sua constante e valiosa orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Maria Conceição Arruda Toledo, pelo trabalho de revisão ortográfica.

Aos colegas e aos funcionários do Laboratório de Química de Alimentos, pelo incentivo e colaboração prestados.