

FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INFLUÊNCIA DO pH E DE ANIONS NA REACÃO
DE MAILLARD E NA HIDRÓLISE DE
DISACARÍDEOS

Felix Guillermo Reyes Reyes
Bacharel em Ciências Químicas

Orientador:
Professor Paulo A. Bobbio
Professor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos

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

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INFLUÊNCIA DO pH E DE ANIONS NA REACÃO
DE MAILLARD E NA HIDRÓLISE DE
DISACARÍDEOS

Felix Guillermo Reyes Reyes
Bacharel em Ciências Químicas

Orientador:

Professor Paulo A. Bobbio

Professor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos

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

ERRATA

1. Trocar a frase ligação hemiacetálica pela frase ligação glicosídica nas seguintes partes:
 - No Sumário parágrafo 2; linha 1
 - Pág. 14; parágrafo 2; linhas 2, 3 e 4
 - Pág. 38; parágrafo 2; linhas 4 e 6
 - Pág. 51 ; conclusão nº 5; linhas 1 e 2
2. Página 4 ; parágrafo 3; linha 5, trocar a palavra amoneo para amônio
3. Página 7 ; parágrafo 2; linha 1, trocar a palavra glucosil por glicosila
4. Página 8; parágrafo 3; linha 8, trocar : (lactose, glicose, xilose) por (respectivamente, lactose, glicose, xilose)
5. Página 27; Acrescentar após a tabela 1 As soluções foram preparadas com os mesmos solventes e nas mesmas condições usadas em 4.2. O escurecimento produzido foi medido da mesma forma e nas mesmas condições experimentais usadas em 4.3.

INDICE

páginas

SUMARIO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1. Reação de Maillard.....	2
2.2. Hidrólise dos Disacarídeos.....	14
3. MATERIAL.....	23
3.1 Reagentes.....	23
3.2 Aparelhos.....	23
4. MÉTODOS.....	25
4.1 Determinação da Pureza dos Açúcares.....	25
4.2 Medida do Escurecimento das Soluções de Lactose e de Sacarose.....	25
4.3 Reação de Maillard com Sacarose e com Lactose.....	26
4.4 Hidrólise da Lactose e da Sacarose.....	26
4.5 Reação de Maillard dos Produtos de Hidrólise da Lactose.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1 Material e Métodos.....	28
5.2 Escurecimento das Soluções de Lactose e de Sacarose.....	29
5.3 Hidrólise da Lactose em Água, em Tampão Fosfato e em Tampão Citrato a pH 6,20.....	30

páginas

Gráficos 62

Apêndice..... 71

Agradecimentos

Dedicatória

a meus pais: Guillermo Reyes P.
Angela R. de Reyes

a meus irmãos: Maria Eugenia
Sérgio Mário
Eduardo Alfredo
Maurício
Alvaro Javier

com especial carinho a Elizabete C. Frias

S U M Á R I O

Foi estudada a hidrólise da lactose e da sacarose a pH 6,20 e 3,00 em água desionizada em tampão citrato e em tampão fosfato a 50°C. Com os mesmos disacarídeos e nas mesmas condições da hidrólise, foi também estudada a reação de Maillard com glicina.

Os resultados obtidos indicam que a ligação hemiacetálica da sacarose é mais facilmente hidrolizada do que a da lactose.

Foi demonstrado o efeito catalítico de pH e de ânions tanto na reação de hidrólise como na reação de Maillard da lactose e da sacarose. A sacarose só participa da reação de Maillard através dos seus produtos de hidrólise.

Dos resultados obtidos foram feitas correlações entre a velocidade de hidrólise e reação de Maillard dos disacarídeos.

S U M M A R Y

The hydrolysis of sucrose and lactose was studied at pH 6.20 and 3.00 in model systems in water, citrate and phosphate buffers at 50°C. The Maillard reaction of lactose and sucrose with glycine was investigated under the above conditions.

The catalytic effect of pH and of the anions present was demonstrated for the hydrolysis as well as for the Maillard reaction. Sucrose was hydrolyzed faster than lactose and the Maillard reaction with sucrose is due to the products of its hydrolysis.

The effect of hydrolysis, anions and pH on the Maillard reaction with the two model disaccharides was discussed.

1. INTRODUÇÃO

A formação de produtos melanoidínicos em alimentos pode ser devido a tres tipos de transformações que seriam: transformações enzimáticas de substratos polifenólicos; caramelização de compostos polihidroxicarbonílicos, e reações entre compostos polihidroxicarbonílicos e amino grupos. Esta última transformação conhecida por reação de Maillard é a de maior incidencia, em alimentos e apresenta elevado grau de complexidade e importancia pelo seu efeito sobre a cor, sabor, aroma e valor nutricional dos produtos alimentícios.

Neste trabalho foram estudados em sistemas modelo o efeito do pH e de anions sobre a reação de Maillard, a velocidade de hidrólise de disacarídeos bem como a relação entre tais transformações.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Reação de Maillard

A reação de Maillard compreende um complexo de reações químicas as quais se iniciam pela interação entre açúcares redutores ou grupos carbonilas com amino ácidos, peptídeos, proteínas ou outros compostos amínicos e cuja última etapa é a produção de substâncias coloridas denominadas melanoidinas.

Um dos primeiros trabalhos em que a reação de Maillard foi estudada usando técnicas aperfeiçoadas no qual foi também estudada a reação com disacáridos foi publicado em 1937 por FRAENKEL e KATCHALSKY (6), os quais usaram um método potenciométrico para medir o progresso da reação. Os referidos autores basearam-se no fato de que a interação do grupo amino do α -amino ácido com o grupo aldeídico do açúcar é acompanhada por um abaixamento do pH, resultante da diminuição dos grupos básicos livres de amino ácido. Os autores concluíram que a presença de um grupo aldeídico no açúcar deveria ser essencial para a reação e que a interação entre amino ácidos e açúcares tem lugar em meio fracamente ácido, neutro ou fracamente alcalino e é inibida quase totalmente já a pH 11. Pelos resultados obtidos foi estabelecida a seguinte ordem decrescente de reatividade dos compostos carbonila com α - dl - alanina: formaldeído, gliceraldeído, arabinose, glicose, lactose.

KRETOVICH e TOKAREVA em 1948 (15) mediram a formação de melanoidinas aquecendo a 95°C soluções contendo 200 mg de açúcar e 50 mg de aminoácido em 2 ml de água. Houve formação mais intensa de melanoidinas na presença de pentoses. Maltose reagiu, mas a sacarose não, o que levou os referidos autores a concluírem que a presença no açúcar de um grupo carbonila livre é necessária para a formação de melanoidinas.

LEA (16) usando proteína de leite fresco, dializada e liofilizada, estudou as transformações sofridas por esse produto armazenado durante 6 meses a

37°C e 55% de umidade relativa. Em seu trabalho LEA usou a proteína isoladamente e em misturas com glicose, lactose ou sacarose. Usou também misturas desses açúcares. Pelos resultados obtidos LEA verificou que a incorporação de alta concentração de sacarose não causou deterioração na proteína, ao contrário exerceu uma marcada influência estabilizante. A adição de glicose ou lactose à proteína dializada resultou em perda de nitrogênio amínico livre, perda de solubilidade e alteração na cor da mistura. A glicose reagiu com a proteína mais rapidamente do que a lactose e o complexo formado escureceu mais rapidamente tornando-se insolúvel em água, fria ou quente. O grupo aldeído dos açúcares redutores combinado com os grupos amínicos livres da proteína produziu insolubilidade da mesma. A lactose mostrou-se mais efetiva que a sacarose em evitar a insolubilização induzida pela glicose, provavelmente como resultado da reação competitiva dos dois açúcares com os grupos amínicos da proteína.

MOSTER e CHAPMAN (18) aqueceram a 100°C durante 48 horas sistemas modelo de glicina - lactose e lisina - lactose, nas seguintes concentrações: (a) 1 parte por peso do amino ácido e 13 partes do açúcar; (b) partes iguais de cada constituinte. Quando foi utilizado excesso de lactose produziu-se um intenso escurecimento acompanhado por perda de nitrogênio amínico - determinado pelo método volumétrico de Van Slyke (1) - , mas tal perda não ocorreu quando estavam presentes partes iguais de açúcar e amino ácido.

Em 1950 PATTON (19) produziu maltol autoclavando maltose ou lactose com glicina. Nas mesmas condições experimentais mas substituindo a maltose e a lactose por glicose, galactose ou sacarose não foi possível obter maltol.

HAUGGARD, TUMERMAN e SILVESTRI (21) indicaram que a influência do pH na ionização dos amino ácidos se reflete na extensão da reação de Maillard. Também verificaram que lactose e valina reagem em proporções equimolares.

CONRAT, COOK e MORGAN (22) incubaram, durante 24 horas a 53 °C, lactose e cristais de β - lactoglobulina em tampão fosfato 0,5M (pH 7,6). No sistema usado foi verificada formação de produtos fluorescentes bem como aumento da densidade ótica da solução, decréscimo dos grupos amínicos

livres da proteína e resistência da proteína a digestão enzimática, particularmente aquela relacionada com liberação da lisina. Não foi constatada perda de grupos - SH na reação da β - lactoglobulina com lactose.

PATTON (25) fazendo um estudo com leite evaporado armazenado a temperatura ambiente durante um ano, verificou entre outras coisas que : (a) temperaturas de armazenamento mais altas aumentam o escurecimento , (b) caseína e lactose são os principais responsáveis pela produção de cor, (c) fosfatos inorgânicos não são importantes no escurecimento do leite induzido pelo calor.

Estudando a torrefação do amendoim, PICKETT e HOLLEY (26), verificaram que a reação de escurecimento não enzimático é a principal transformação química que ocorre durante a torrefação. Os autores citados concluíram que : (a) a sacarose foi o principal carboidrato envolvido, (b) temperaturas altas aceleram a reação, (c) todos os amino ácidos livres encontrados no amendoim parecem ter tomado parte nas reações durante a torrefação, (d) a proximidade do grupo - NH_2 ao grupo - COOH nos amino ácidos influenciou a produção de CO_2 na reação de escurecimento, mas tal proximidade não teve influência na produção da cor.

TAMAKI (28) estudando a ação de várias classes de ions e amino ácidos na reação de Maillard aqueceu a aproximadamente 100°C durante 10 horas soluções aquosas de glicose, rarnose, maltose e frutose na presença de 20 sais e 12 amino ácidos a pH 7,0. As variações de cor foram medidas colorimetricamente. Fosfatos, sais de ácidos orgânicos e sais de amonio foram mais ativos quando em presença de triptofano, histidina, tirosina e glicina.

WOLFROM, KOLE e LANGER (29) estudaram a formação de cor em função do pH, utilizando soluções equimolares de amino ácidos e açúcares redutores mantidas a 100°C . Foi demonstrada forte catálise básica entre os valores iniciais de pH 6,5 - 8,5; fraco efeito catalítico entre pH 3,0 - 5,0 e inibição a pH de 1,0 - 3,0 . Soluções de glicina e xilose a pH inicial entre 6,3 e 6,8 sofreram uma rápida queda de várias unidades de pH até o início do escurecimento das soluções, devido à diminuição dos amino grupos livres.

Estudando as condições que afetam o curso da reação entre açúcares e aminoácidos ZABRODSKII e VITKOVSKAYA (30) observaram que em soluções aquosas mantidas a temperaturas de 120°C, sacarose, maltose e dextrinas reagem com aminoácidos, e a interação aumentava com a concentração de aminoácidos. A pH 7,0 a reação foi mais rápida.

DUBOURG e DEVILLERS (33) fizeram reagir glicina com glicose, galactose, maltose e lactose em soluções aquosas "quase equimoleculares" mantidas a temperatura de 95°C. Em cada caso foi obtido um produto que isolado, por cromatografia, e cristalizado lembrava por suas propriedades um N-ósídeo. DUBOURG e DEVILLERS sugeriram que o composto formado pela reação do grupo amino do aminoácido com a função aldeído do açúcar e eliminação de H₂O representava o primeiro produto da reação de Maillard. Baseados na formação do N - glucosídeo estabeleceram a seguinte ordem decrescente de velocidade de reação: glicose, galactose, maltose, lactose.

Estudando a reação de escurecimento de aminoácidos e açúcares KAMADA e SAKURAI (34) verificaram que em misturas contendo 10% de glicina e 10% de açúcar a velocidade de escurecimento em relação ao açúcar usado tinha a seguinte ordem decrescente: xilose, arabinose, frutose, glicose, maltose e sacarose.

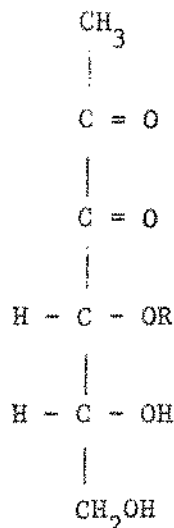
SHALLENBERGER, SMITH e TREADWAY (38) procuraram elucidar o papel dos açúcares no desenvolvimento da cor produzida em "potato chip" por escurecimento não enzimático. Os resultados obtidos mostraram que tanto açúcares redutores (glicose e frutose) como sacarose reagem com aminoácidos para produzir escurecimento nas temperaturas de processamento utilizadas. Os referidos autores mostraram que a sacarose é hidrolizada na presença do aminoácido glicina, a 150°C, produzindo glicose e frutose. Concluíram que o aminoácido condensava-se com o açúcar invertido e subsequentemente formavam-se melanoidinas.

STENBERG e GEDDES (39) prepararam pastas de amido de trigo com e sem adição de gluten de trigo, açúcares, manteiga e leite em pó desengordurado. As pastas foram preparadas a pH 4,4 e 5,4 com tampão ftalato (0,05M) e a pH 6,4 com tampão fosfato (0,05M). Depois de 25 dias de armazenamento a 75°C, os autores constataram que dos ingredientes utilizados, os açúcares eram os principais causadores do escurecimento das pastas. Em ordem decrescente a contribuição de cada açúcar no escurecimento foi a seguinte: glicose, sacarose, lactose. A adição de gluten às pastas de amido contendo açúcares aumentava o escurecimento. O efeito do pH, pelo menos nos intervalos utilizados, foi pouco significativo e inconsistente.

POMERANZ, JOHNSON e SHELLENBERGER (40) mediram espectrofotometricamente, a 500 nm, a velocidade de escurecimento de soluções de açúcares e amino ácidos. Foram usados vinte açúcares e dois amino ácidos, glicina e lisina. As concentrações de cada açúcar e de cada amino ácido foram respectivamente 0,05M, usando tampão fosfato 0,1M como solvente. Cada sistema foi aquecido por 20 minutos a 114°C. Pelos resultados obtidos POMERANZ e seus colaboradores verificaram que a reatividade dos açúcares variava em função do pH e do amino ácido presente. A elevação do pH de 4,6 para 8,9 favoreceu o escurecimento. A lisina mostrou-se mais ativa que a glicina na produção de cor. Com os disacarídeos utilizados não foram obtidos resultados consistentes. Na presença de lisina, lactose mostrou-se mais reativa que maltose acontecendo o contrário na presença de glicina. Não se produziu escurecimento quando foram usados disacarídeos não redutores (sacarose e trealose).

HODGE, FISHER e NELSON (41) trabalharam com sais de aminas secundárias em vez de amino ácidos ou sais de aminas primárias as quais produzem menos melanoidina na reação e consequentemente alguns produtos de desidratação do açúcar puderam ser cristalizados na fase inicial da reação. HODGE e colaboradores (41) produziram maltol e isomaltol a partir de maltose e lactose. Partindo de maltose o rendimento de maltol foi de dez vezes maior quando foram usados sais de aminas secundárias em substituição a glicina utilizada por PATTON (19) e usando sistemas quase secos. De acordo com PATTON (19) as mesmas condições de reação que produziram maltol e isomaltol a partir de maltose ou lactose não produzem nenhum dos

2 compostos a partir de glicose, enquanto que HODGE (17) verificou que se formavam redutonas a partir da glicose. Para explicar este fato HODGE e co laboradores (41) admitiram a existência de um intermediário metil α -dicar**bon**ila cuja fórmula seria:



No caso de maltose ou lactose R é um grupo glucosil ou galactosila o qual bloqueia a formação de redutonas.

Em 1965 a "Division of Food Preservation" (46) - Austrália - relatou os resultados de estudos sobre o escurecimento não enzimático em alimentos submetidos a concentração, desidratação ou aquecimento. Segundo a referida publicação o escurecimento é devido a reações químicas dos componentes dos alimentos e tais reações são favorecidas pela remoção da água presente em cada sistema. Este tipo de escurecimento ocorria somente depois da condensação inicial entre compostos contendo grupos amino e aqueles contendo grupos carbonilas.

KOSHY, DUVALL, TROUP e PYLES (47) fazendo um estudo dos fatores envolvidos no escurecimento da lactose secada pelo processo "spray-dry", verificaram que o escurecimento é catalizado por ions de fosfato, tartarato e citrato, e é retardado por ions de borato.

NAKAZAWA e TAMAKI (48) estudaram o efeito do ácido fosfórico na reação de escurecimento de soluções de açúcares. Para isto prepararam soluções a 50% de xilose, fructose, glicose e lactose em ácido fosfórico 0,01M, corrigindo o pH inicial para 7,0 com NaOH. As soluções foram aquecidas em atmosfera de nitrogênio a 100°C durante 6 e 8 horas. O pH das soluções caiu para 4,0; 4,0; 5,0; 5,0; 6,5 respectivamente para xilose, fructose, glicose, lactose e sacarose. Medindo a absorvância das soluções a 420 nm depois de corrigir o pH para 7,0 com Ba(OH)_2 NAKAZAWA e TAMAKI verificaram que quanto mais baixo o pH final da reação mais intenso era o escurecimento. Por outro lado variando a concentração de ácido fosfórico e por aquecimento durante 4 horas dos sistemas usados, a absorvância das misturas de reação neutralizadas mostrou-se proporcional à concentração de ácido fosfórico usado.

RICHARDS (50) preparou uma mistura de lactose (230g) e caseína (220g) em água a pH 6,3. A mistura aquosa foi filtrada, liofilizada e o produto armazenado durante uma semana a 80°C e 75% de umidade relativa, após o que o produto se tornou escuro. A partir deste material, RICHARDS isolou e identificou os seguintes compostos: lactulose, D- galactose, D- tagatose, 5-hidroximetilfurfural, ácido lático, ácido glicólico, ácido fosfórico e as lactonas dos ácidos 2 - deoxi - D - glicero - tetrônico e 3 - deoxi - D - eritro - pentônico.

COLE (53) estudou a produção de CO_2 em soluções tamponadas (tampão fosfato 0,5M) de açúcares (0,5M) e amino ácidos (0,5M). Para verificar o efeito das várias condições de reação na velocidade de produção de CO_2 , foram variados o pH, temperatura e as combinações de açúcar e amino ácido nas soluções. Pelos resultados obtidos COLE concluiu que o tipo de açúcar, mais que o tipo de amino ácido, é um fator limitante na velocidade de produção de CO_2 e que a velocidade da reação aumentava na ordem: dissacarídeos, hexoses, pentoses (lactose, glicose, xilose). A velocidade da reação também aumentava com o aumento do pH (4,0 a 7,0) e da temperatura (80 a 95°C). Segundo COLE o CO_2 foi formado principalmente via degradação de STRECKER, não podendo ser excluída a possibilidade de outro caminho, ainda não identificado, para a formação de CO_2 a partir de açúcares na presença de

compostos amínicos. COLE relacionou a produção de CO_2 com a formação de cor e de compostos carbonílicos.

EL'ODE, DORNSEIFER, KEITH e POWERS (55) estudaram os efeitos da temperatura e pH no aroma e nos compostos carbonílicos produzidos durante o aquecimento de soluções 0,2M de um açúcar (glicose, frutose, maltose e sacarose) e de um amino ácido (glicina, ácido glutâmico, lisina, metionina e fenil alanina) em tampão fosfato 0,028M. As soluções cujos pH iniciais eram 5,0; 6,5; e 8,0 foram aquecidas a 100°C durante 60 minutos ou a 180°C durante 30 minutos. Em cada um dos sistemas o peso de 2,4 dinitrofenilhidrazona obtido foi usado como medida da reatividade. Com este critério a ordem de reatividade decrescente foi: sacarose, glicose, frutose e maltose. Quando o critério de reatividade utilizado foi a medida do escurecimento em cada sistema, EL'ODE e colaboradores constataram que maltose e sacarose eram menos reativas do que glicose e frutose, independentemente do amino ácido utilizado. O escurecimento também foi relacionado com a temperatura da reação, comprimento da cadeia e tipo de amino-ácido e de açúcares usados.

Num estudo sobre a influência do solvente no escurecimento não enzimático SAUNDERS e JERVIS (56) prepararam sistemas modelo contendo glicose e glicina em tampão fosfato, citrato ou acetato. As concentrações dos três componentes variaram entre 0,0 e 0,5 M, o pH inicial das soluções foi de 3,0; 7,5; e 8,0 e todos os sistemas foram mantidos a 121°C durante 2 horas. Os referidos autores verificaram que: 1- a velocidade de reação era máxima quando se utilizaram concentrações equimolares de glicose e glicina. 2 - a reação de escurecimento do sistema glicose-glicina é significativamente acelerada pela presença dos anions citrato, fosfato ou acetato. 3 - a reação de escurecimento procede mais rapidamente em soluções ligeiramente alcalinas do que em meio ácido.

LANGNER e TOBIAS (58) através da extração por solvente descreveram um procedimento para o isolamento de compostos formados durante o aquecimento de soluções contendo açúcares e amino ácidos. Foram utilizados sistemas modelo formados por um açúcar (glicose ou lactose) e um amino ácido livre

(glicina ou valina) ou caseína, diluídos em tampão fosfato 0,1M (pH 6,6 - 6,7). Com os sistemas usados foi possível identificar hidroximetilfurfural nos extratos dos sistemas contendo glicose e em menor grau nos sistemas contendo lactose. Maltol somente foi encontrado nos extratos dos sistemas contendo lactose. Um número maior de componentes foi identificado nos extratos dos sistemas contendo glicose do que naqueles que continham lactose. Pelos resultados obtidos LANGNER e TOBIAS (58) concluíram que álcool furfúrico é o principal componente nos sistemas contendo lactose enquanto que 2 - acetilpirrol é o componente mais abundante nos sistemas contendo glicose.

ROONEY, SALEM e JOHNSON (59) estudaram o tipo e a quantidade de compostos carbonílicos produzidos pela reação de amino ácidos (0,2M) com açúcares redutores (0,2M) em soluções aquosas e em pastas de amido. Para o primeiro sistema as soluções foram tamponadas com acetato (0,4M) a pH 5,5 e aquecidas a 95°C durante 12 horas. Para o preparo das pastas de amido os amino ácidos e os açúcares foram misturados com amido de trigo dando uma consistência semelhante a massa para pão e as misturas foram aquecidas durante 30 minutos a 221,1°C. O escurecimento e a produção de compostos carbonílicos foram atribuídas, em ambos os sistemas modelo à reação do tipo Maillard. A comparação dos dados obtidos com os três açúcares usados (glicose, xilose e maltose) em reação com os diferentes amino ácidos indicaram que o escurecimento e a quantidade de compostos carbonílicos produzidos foi afetada pelo tipo de açúcar. Xilose reagiu com os amino ácidos produzindo a maior quantidade de compostos carbonílicos, seguida por glicose e depois maltose. O tipo de açúcar não afetou a classe de compostos carbonílicos formados, assim as suas quantidades. Por outro lado o tipo de amino ácido influenciou no tipo e na quantidade de compostos carbonílicos produzidos.

MARCUS e LABUZA (60) estudaram o escurecimento não enzimático em sistemas modelo liofilizados contendo sacarose, lipídeos, tripsina e ácido málico e cítrico. Os resultados obtidos indicaram que na ausência de ácidos, o sistema modelo era estável e não escurecia enquanto que mesmo sem proteína mas em presença de ácidos ocorria considerável escurecimento até em teores de umidade extremamente baixos. A adição da proteína reduziu a velocidade

de escurecimento, especialmente com baixo teor de água, isto foi justificado pelo efeito tampão da proteína que reduzia a concentração de ions hidrogênio na água superficial. Deste modo seria diminuída a hidrólise ácida da sacarose cujos produtos eram responsáveis pelo escurecimento.

FREIMUTH e TRUBSBACH (62) investigaram a reação da β -lactoglobulina com a lactose no estado seco (10% de umidade) e para isto prepararam misturas de β -lactoglobulina e lactose. Nos sistemas usados a reação de Maillard conduziu a vários graus de destruição da lisina em função do tempo e temperatura de aquecimento. A análise da composição dos amino ácidos da proteína mostrou que nem arginina, nem histidina ou os amino ácidos neutros ou ácidos foram afetados pelo tratamento térmico na presença de lactose.

Posteriormente FREIMUTH e TRUBSBACH (63) estudaram as alterações físico-químicas da β -lactoglobulina depois de sua reação com lactose, nas mesmas condições citadas no trabalho anterior (62). Pela eletroforese dos produtos da reação, os autores constataram um decréscimo na velocidade de migração da β -lactoglobulina em função do aumento do tempo de aquecimento, permitindo a separação de produtos em gel de poliacrilamida pH 4,0 enquanto que, utilizando tampão de barbiturato a pH 8,6 não foi obtida separação dos produtos. Através da filtração em gel de Sephadex G-100 e por ultracentrifugação, foi possível determinar o tamanho das partículas da β -lactoglobulina antes e depois de reagir com lactose a 37 e 55°C. Os resultados obtidos indicaram um aumento no peso molecular da proteína que foi atribuído as combinações com resíduos do carboidrato.

EOPECHINO e LEEDER (64) utilizaram xarope de milho de baixa e alta conversão para substituir parcialmente a sacarose em misturas para sorvete. As misturas foram posteriormente submetidas a várias temperaturas e tempos de aquecimento. O efeito que esta prática teve na reação de escurecimento foi medido pela quantidade de CO_2 produzido durante o aquecimento. O efeito da temperatura e do tempo de aquecimento variou dependendo da quantidade de xarope utilizado na mistura. A elevação de 10°C na temperatura de aquecimento resultou em marcado aumento da quantidade de CO_2 produzida. EOPECHINO e LEEDER prepararam também sistemas modelo contendo lactose, caseína e

gorduras isoladas do leite os quais foram processados da mesma forma que as misturas anteriormente citadas. Houve um aumento considerável na produção de CO_2 quando foram misturadas caseína e lactose. Os resultados obtidos mostraram que o aumento da temperatura e tempo de aquecimento resultaram numa aceleração da reação de escurecimento.

FERRETI, FLANAGAN e RUTH (65) estudaram o escurecimento não enzimático em sistemas modelo secos preparados com um mol de lactose para cada amino grupo livre da caseína. Foram isolados e identificados 40 compostos a partir de um extrato em diclorometano obtido do sistema de escurecimento lactose-caseína o qual foi preparado por liofilização da mistura. O resíduo sólido foi mantido durante 8 dias a 20°C e 75% de umidade relativa. Os compostos foram separados por cromatografia gas-liquida e identificados por cromatografia gasosa e pela espectrofotometria de massa e infravermelha.

BOBBIO (69) estudou a reação de Maillard investigando em sistemas modelo, o efeito da temperatura, do pH e de anions. O andamento da reação foi acompanhada pela medida da absorvância a 450 nm. Os sistemas modelo usados continham glicina (0,66M) e um dos seguintes açúcares (1,25M): xilose, frutose, glicose, maltose e sacarose. As soluções foram preparadas a pH inicial 2,2 e 6,2. Os anions utilizados foram citrato, fosfato e ftalato. Trabalhando a 47°C e pH 6,2 foi determinada a seguinte ordem de reatividade decrescente para os açúcares utilizados: xilose, glicose, frutose, maltose e sacarose. Os resultados obtidos indicaram que disacarídeos redutores podem dar a reação de Maillard por terem grupo carbonila livre enquanto os não redutores devem sofrer hidrólise para dar a reação. A reação de Maillard está sujeita a catálise geral ácido-base da água, mas o efeito da catálise básica é predominante. Este efeito é favorecido pela presença dos anions que aceleram a reação.

FERRETI e FLANAGAN (70) continuando seus trabalhos sobre reações de escurecimento não enzimático estudaram os componentes voláteis do sistema de escurecimento (tipo Maillard) formado por lactose e caseína nas mesmas condições citadas em trabalho anterior (65). Os resultados obtidos confirmaram a identificação de 40 compostos.

POWELL e SPARK(71) estudaram o efeito do pH na reação de Maillard, usando soluções 2,5M de glicose e 1,0M de glicina em presença de ions metálicos em diferentes concentrações. As misturas foram incubadas a 50 e 60°C e o progresso da reação de escurecimento foi medido pelo aumento da absorvância a 450 nm. Os referidos autores concluíram que o efeito do pH é explicado pela sua influencia no equilíbrio de ionização dos amino ácidos.

A reação de Maillard com os monosacarídeos componentes da sacarose e lactose tem sido objeto de elevado número de publicações que foram revistas e comentadas por HODGE (27); ELLIS (37); REYNOLDS (42) e REYNOLDS (49) não tendo sido feita a sua revisão neste trabalho por não serem diretamente pertinentes ao trabalho experimental por nós desenvolvido.

2.2. Hidrólise de Disacarídeos

Em 1930 HIBBERT e PERCIVAL (2) estudaram e compararam a hidrólise de alguns di e polisacarídeos numa solução ácida contendo cloreto de zinco - ácido clorídrico mantida a 239C. A velocidade de hidrólise foi medida por polarimetria. Foram assim calculados os seguintes valores da constante de hidrólise, k:

	$k \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$
celulose	0,61
celobiose	1,00
amido	2,45
maltose	2,40
lactose	2,84

Pelos resultados obtidos HIBBERT e PERCIVAL concluíram que, nas mesmas condições experimentais, maltose (ligação hemiacetálica α) é hidrolizada duas vezes mais rapidamente que celobiose (ligação hemiacetálica β) enquanto que lactose (ligação hemiacetálica β) é hidrolizada mais rapidamente que maltose. Portanto não pode ser feita nenhuma generalização no que diz respeito a velocidade de hidrólise em relação ao tipo de união dos monômeros nas moléculas dos disacarídeos. Foi também calculada a constante de velocidade, k, para a hidrólise da sacarose numa solução 0,105N de ácido oxálico mantida a 659 C. O valor de k obtido foi de $6,50 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$.

FLOYD (3) estudou a influência de eletrólitos fortes na hidrólise da sacarose (0,1M) catalizada por ácido clorídrico 0,1N. O referido autor verificou que a presença de cloretos (NaCl e BaCl_2) aumentava a velocidade de hidrólise, acontecendo o contrário na presença de sulfatos (MgSO_4 e K_2SO_4). FLOYD calculou os seguintes valores para a constante de hidrólise da sacarose em meio ácido à temperatura de 259C.

Solvente	$k \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$
Livre de sais	79,35
2N NaCl	175,67
1,97N BaCl ₂	150,93
2N MgSO ₄	25,94

HAMMETT e PAUL (4) verificaram que a velocidade de hidrólise da sacarose, catalizada por vários ácidos fortes em concentrações até 7M, pode ser relacionada com o que chamaram de função acídica, H_0 , ou seja com a medida da acidez dada por um simples indicador básico.

KRIEBLE (5) determinou as constantes de velocidade para a hidrólise da sacarose em solução 0,146M, utilizando como catalizadores ácido clorídrico, ácido sulfúrico e ácido bromídrico em diferentes concentrações. Todas as experiências foram estudadas a 20°C. Seus resultados estão representados na seguinte tabela:

Solvente	$k \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$
1,05m HCl	0,24
1,07m H ₂ SO ₄	0,27
1 N HB _r	0,27

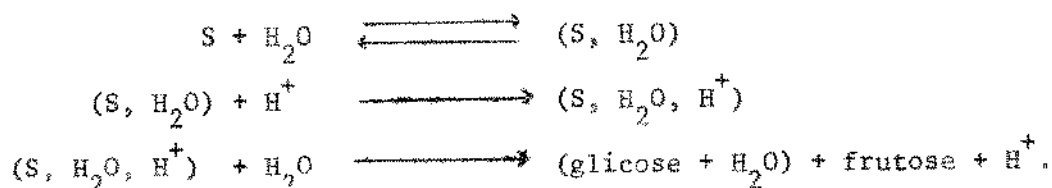
O referido autor verificou que no caso do ácido clorídrico ou ácido sulfúrico as constantes de velocidade não eram diretamente proporcionais as concentrações dos ácidos ou a atividade do íon hidrogênio. Em base aos dados obtidos, KRIEBLE apresentou a hipótese de que a hidrólise da sacarose com ácido é parcialmente catalizada pelo íon hidrogênio e parcialmente pela molécula de ácido clorídrico ou de ambos os seus íons.

LEININGER e KILPATRICK (7) verificaram que a energia de ativação para a hidrólise da sacarose variava com a temperatura (0 a 35°C) e com a concentração de ácido clorídrico.

Continuando seus estudos da inversão da sacarose LEININGER e KILPATRICK (8) investigaram o efeito da temperatura entre 0 e 40°C e da concentração do ácido clorídrico na constante de velocidade, k . No mesmo trabalho foram também determinados os valores da constante de velocidade em relação à concentração do ácido ($K_{H_3O^+}$). Os referidos autores constataram que no intervalo de variação de temperatura utilizado $K_{H_3O^+}$ é uma função da concentração do ácido, aumentando com a elevação da concentração do ácido. O aumento na concentração da sacarose também aumentou o valor de $K_{H_3O^+}$. A adição de cloreto de sódio afetou o valor de $K_{H_3O^+}$, mas o aumento nunca foi superior ao correspondente a adição de igual quantidade de ácido. A energia de ativação, E_a , calculada a partir da equação de Arrhenius, mostrou que E_a diminuía com a elevação da concentração do ácido clorídrico ou da sacarose. LEININGER e colaboradores (9) também confirmaram o decréscimo da E_a com a elevação da temperatura de 0 a 30°C (dE/dT se aproxima de zero quando a temperatura aumenta acima de 30°C).

PEARCE e THOMAS (9) estudaram a velocidade de hidrólise da sacarose catalizada pelo ácido clorídrico na presença de sais, nas temperaturas de 25 e 35°C. Todos os sais utilizados aumentaram a velocidade da reação e a ordem decrescente de atividade foi: $Al(NO_3)_3$; $BaCl_2$; $LiCl$; $NaCl$ e KCl . O efeito catalítico dos sais foi atribuído ao decréscimo da camada de moléculas do solvente ao redor dos reagentes. O mecanismo da hidrólise foi explicado através da adição de íon de oxônio, H_3O^+ , à molécula de sacarose formando um complexo cuja velocidade de decomposição determinaria a velocidade de inversão da sacarose.

Continuando os estudos sobre a velocidade de hidrólise da sacarose DUBOUX e ROCHAT (10) concluíram que a constante de hidrólise, k , "é quase proporcional" ao produto das atividades dos íons hidrogênio e da água. Baseados nos resultados obtidos apresentaram o seguinte mecanismo para a hidrólise:



Segundo os referidos autores a reação de hidrólise se daria em duas fases: 1) reação lenta na qual a sacarose monohidratada reage com o ion H^+ para formar um ion complexo instável. 2) o ion complexo reage instantaneamente com uma molécula de água para formar os produtos de hidrólise e regenerar o ion H^+ .

MATUMOTO (11) preparou misturas de ácido cítrico (2%) e sacarose (7%) as quais foram mantidas a 30°C. Depois de 144 horas foi verificado (em base a determinações com solução de Fehling) que 92% de sacarose tinha sido hidrolizada. O citado autor também verificou que a velocidade de hidrólise variava inversamente com o pH.

Fazendo estudos sobre a hidrólise da sacarose HEIDT e PURVES (12) constataram que a velocidade de hidrólise da sacarose em presença de ácido clorídrico, quando determinada pelo teor de açúcares redutores produzidos, é ligeiramente maior que a velocidade previamente obtida pelo método dilatométrico nas mesmas condições de reação. A energia de ativação E_a , para a reação foi calculada em 25,9 Kcal e em oposição ao constatado por LEINIGER e KILPATRICK (8) E_a não variou significativamente com a temperatura entre 0 e 30°C. HEIDT e PURVES (12) também verificaram que os logaritmos das constantes de velocidade, medidas a 0°C, são uma função linear da variação de concentração de ácido clorídrico entre as concentrações 0,1 e 4,4N.

RAMSDELL e WEBB (14) estudaram os fatores que afetam a hidrólise ácida da lactose. Verificaram que a constante de velocidade da reação variava com o tempo, temperatura de hidrólise e com a concentração do ácido e da lactose na solução. Comparando a catálise induzida pelo ácido clorídrico e, pelo ácido cítrico verificaram que o ácido clorídrico é um catalizador mais efetivo. Durante a hidrólise houve destruição progressiva da lactose e das hexoses recém formadas, esta destruição foi acelerada pelas condições de alta temperatura ou prolongado aquecimento e quando foram utilizadas altas concentrações de açúcar ou de ácido.

MAFFEI (17) publicou os seguintes valores experimentais obtidos para a constante de velocidade de hidrólise, k em h^{-1} , de soluções de sacarose em

concentrações acima de 40%.

Ácidos	229C	289C	409C	509C	609C
Tartárico	$0,45 \times 10^{-3}$	$0,68 \times 10^{-3}$	$1,9 \times 10^{-2}$	$0,66 \times 10^{-1}$	0,29
Cítrico	$0,22 \times 10^{-3}$	$0,30 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-2}$	$0,60 \times 10^{-1}$	0,24
Fosfórico	$1,2 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-1}$	0,88
Clorídrico		$27,6 \times 10^{-2}$			2,2

Em seu trabalho MAFFEI também apresentou os valores do semi-período de hi
drólise, admitindo que a hidrólise da sacarose se processava como uma rea
ção de primeira ordem.

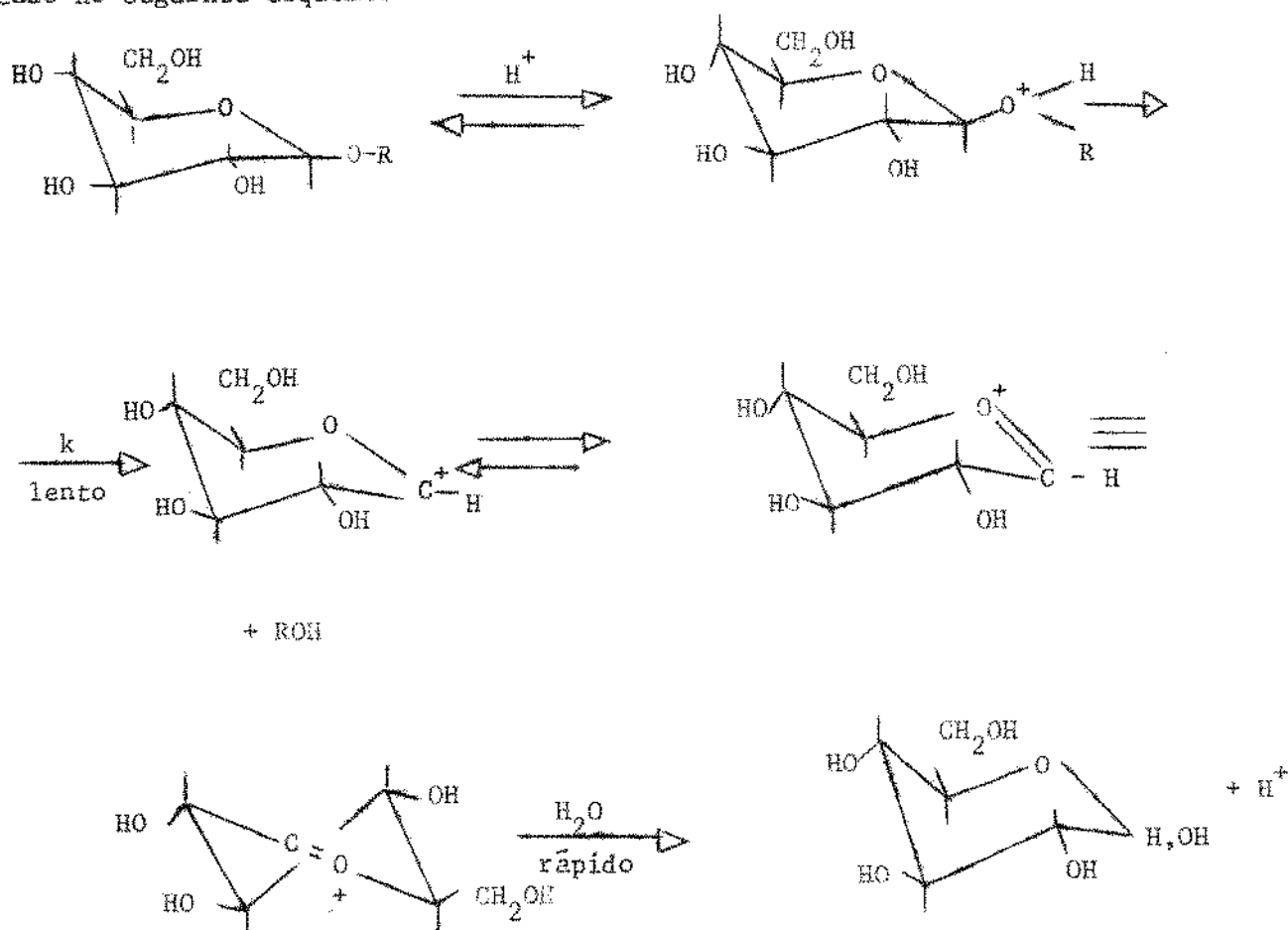
BODAMER e KUNIN (20) estudaram a hidrólise catalítica heterogenea da saca
rose utilizando resinas trocadoras de cations do tipo sulfonico e carboxi
la. As medidas foram feitas a várias temperaturas (25, 50, 75 e 1009C) e
as velocidades de reação obtidas foram comparadas as da reação de hidrôli
se homogenea. Os resultados dos referidos autores indicaram que a resina
do tipo sulfonico é catalizador mais efetivo que a do tipo carboxila; po
rém ambas foram menos efetivas que uma quantidade equivalente de ácido for
te. A velocidade de inversão em ambos os tipos de resinas aumentou com o
decrêscimo do tamanho das suas partículas e com o aumento da porosidade.
BODAMER e KUNIN também verificaram que a constante de velocidade aumentava
com o aumento da quantidade de resina ou da concentração inicial de saca
rose.

HEIDT, SOUTHAM e SULLIVAN (23) trabalharam com soluções de sacarose, manti
das a 75 e 959C, contendo ácido clorídrico em várias concentrações. Seus
resultados indicaram a existencia de auto-catalise na reação de hidrólise,
os mencionados autores observaram que a hidrólise era acompanhada por de
crêscimo do pH na mistura de reação e que o aumento da acidez correspondia
quantitativamente ao aumento da velocidade. Verificaram também que a exten
ção da auto-catalise é aumentada por: a) % de sacarose hidrolizada; b) con
centração inicial de sacarose; c) temperatura na qual a hidrólise é efetua
da e d) decrêscimo da concentração inicial de ácido.

MALYOTH e STEIN (24) estudaram a hidrólise da lactose na presença de diferentes concentrações (2 - 36%) de ácido clorídrico. Os referidos autores verificaram, pela cromatografia em papel, a formação de glicose e galactose somente nas soluções contendo ácido clorídrico 36%.

Continuando os estudos da ação de cloretos inorgânicos na hidrólise ácido-catalizada da sacarose, GRANDCHAMP-CHAUDUM (32) verificou que a velocidade de hidrólise em soluções 0,1N de HCl aumentava na presença de KCl, LiCl, NaCl, NH_4Cl . Segundo o referido autor o íon cloreto, Cl^- , pode desempenhar um importante papel na reação.

Em 1964 TIMELL (45) determinou as constantes de velocidade de primeira ordem e as energias e entropias de ativação para a hidrólise ácido-catalizada de grande número de metil D- glicopiranosídeos e dissacarídeos, usando ácido sulfúrico 0,5 M como catalizador. Todas as entropias de ativação determinadas indicaram um mecanismo de reação unimolecular conforme ao indicado no seguinte esquema:



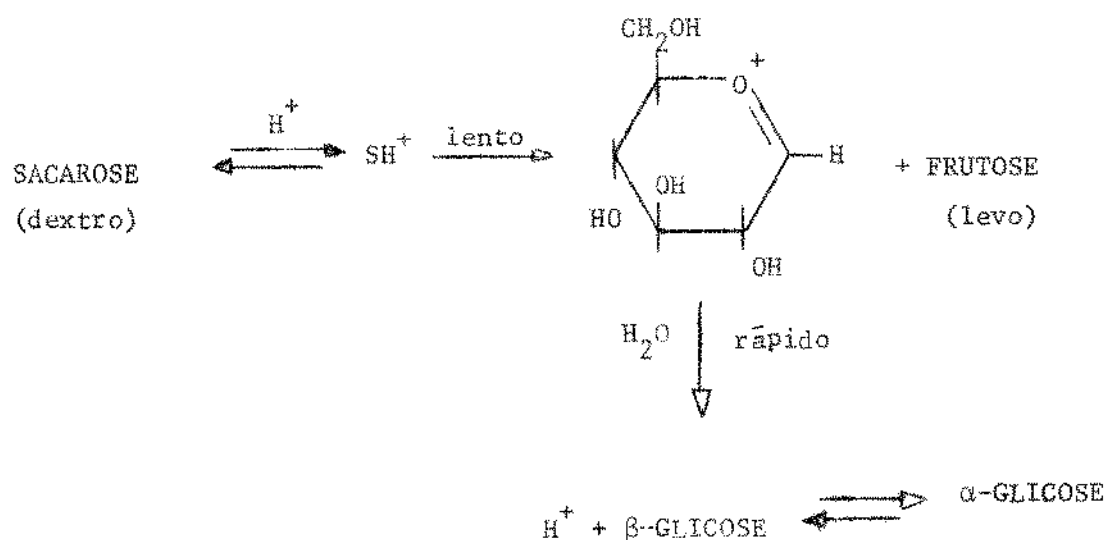
Os valores das constantes de hidrólise calculadas por TIMELL (45) estão resumidos na seguinte tabela:

Açúcar	$k \times 10^6 \text{ seg}^{-1}$	Condições
Maltose	5,56	H_2SO_4 0,5 M: 60°C
Celobiose	2,72	" "
Gentiobiose	1,29	" "
Manobiose	4,06	" "
Lactose	5,45	" "
Melibiose	4,95	" "
Xilobiose	19,0	" "
Sacarose	19,6	H_2SO_4 0,005 M: 50°C
Sacarose	58,3	H_2SO_4 0,005 M: 60°C

GOTO e HYONO (51) estudaram a ação catalítica de vários ions metálicos na hidrólise da lactose. Verificaram que há pouca hidrólise quando soluções aquosas e neutras de lactose são aquecidas a 100°C durante 20 horas. No entanto, traços de Cu^{++} e Ni^{++} aceleraram consideravelmente a hidrólise. Ions de Ca^{++} , Al^{+++} , Pb^{++} mostraram-se inativos. Segundo GOTO e HYONO o efeito catalítico do Cu^{++} e Ni^{++} é devido a coordenação desses ions aos grupos hidroxilas secundários do radical galactosila na molécula de lactose: isto é seguido por um deslocamento eletrônico e consequente rompimento das ligações C - OH e C - O, o qual finalmente conduz ao rompimento da ligação glucosídica.

VUKOV (52) estudou alguns aspectos cinéticos da hidrólise da sacarose tendo derivado fórmulas empíricas para o cálculo da constante de velocidade. VUKOV verificou que em soluções aquosas a velocidade de hidrólise da sacarose, catalizada por eletrólitos, pode ser calculada como a soma das velocidades das reações catalizadas por ions hidrogênio, hidroxilas e por sais. As equações estabelecidas por VUKOV são válidas para diferentes temperaturas até 120°C e a pH e p(OH) acima de 1 quando a concentração das soluções usadas não excede 55° Bx.

DAWBER, BROWN e REED (54) fizeram estudos a respeito do mecanismo da reação de hidrólise da sacarose catalizada por ácido clorídrico. A velocidade da reação foi estudada a 20°C e a concentração do ácido variou entre 0,25 e 3,0 M. As soluções de sacarose usadas continham 10 g de sacarose por 100 ml de solução acidificada. Os resultados obtidos indicaram que a reação segue um mecanismo unimolecular conforme o seguinte esquema:



AFANAS'EV e GORIKOVA (57) utilizando métodos polarimétricos estudaram a ação de certas aminas, amino ácidos e polihidroxifenóis, na cinética de hidrólise da sacarose. Para isto foram preparadas soluções aquosas dos diversos componentes, as quais foram mantidas a 35; 50; 70°C e a temperatura da água em ebulição. AFANAS'EV e GORIKOVA verificaram que na presença de aminas alifáticas, amino ácidos e amino alcoóis não há apreciável aceleração na hidrólise da sacarose e que a hidrólise procede de acordo ao mecanismo da catálise ácida específica.

SCHOBEL, TANNENBAUM e LABUZA (61) estudaram a reação de hidrólise da sacarose em sistemas contendo baixos teores de água. Os mencionados autores

publicaram os valores obtidos da constante de hidrólise, em especial para uma solução saturada de sacarose em ácido clorídrico 0,001 N (pH 2,76), mantida a 37°C, o valor calculado da constante de hidrólise, k, foi: $1,67 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ($4,64 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1}$). SCHOEDEL e colaboradores concluíram que a hidrólise da sacarose pode ocorrer em sistemas nos quais a atividade da água é baixa (3.1g H₂O / 100g de sólidos) e que a água de cristalização não é disponível para esta reação.

KARL e WIROTAMA (66) investigaram a hidrólise da lactose utilizando técnicas de cromatografia em papel e em camada delgada. Para isto os referidos autores prepararam soluções aquosas de lactose (5%) a pH inicial 4,7. KARL e WIROTAMA não detectaram hidrólise nas soluções de lactose após 5 horas de aquecimento a 90°C.

BARNETT e O' CONNOR (68) determinaram a velocidade de hidrólise da sacarose em soluções 0,003 M na presença dos ácidos clorídrico (1 - 8,5 M); sulfúrico (1 - 9 M); perclórico (1 - 7 M) e fosfórico (1 - 11 M) utilizando temperaturas de 0,5 a 25,0°C. Seus resultados são consistentes com um mecanismo de hidrólise que não envolve água na etapa determinante da velocidade de reação.

Pela revisão bibliográfica pode-se verificar que não são numerosas as publicações especificamente relacionadas com a reação de Maillard em dissacarídeos ou com a hidrólise desses carboidratos. Deve ser ressaltado que a diversidade de condições experimentais torna especialmente difícil a comparação dos dados apresentados por diferentes autores.

Especialmente significativa é a falta de dados sobre efeito catalítico de anions, tanto na hidrólise como na reação de Maillard, apesar de que tal efeito poderia ter grande importância econômica especialmente para a sacarose.

3. MATERIAL

3.1. Reagentes

Todos os açúcares utilizados: sacarose, β - lactose monohidratada, glicose, frutose e galactose, eram produtos puros para análise, das marcas Merck ou Carlo Erba.

O amino ácido utilizado: glicina era produto quimicamente puro marca C. Erba.

Todos os demais reagentes como ácido 3,5 dinitrosalicílico, ácido clorídrico, hidróxido de sódio, fosfato de potássio e outros, eram produtos puros para análise das marcas Merck, C. Erba ou Baker.

Para a medida da hidrólise da lactose foi utilizado GLUCOSTAT (44), o qual é um reagente específico para a determinação colorimétrica quantitativa da glicose, em base as reações conjuntas das enzimas glucose oxidase e peroxidase.

A água utilizada em todas as experiências foi previamente destilada e desionizada.

3.2. Aparelhos

As reações foram feitas em banho provido de agitador e termostato com sensibilidade $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

Todas as densidades óticas foram medidas em espectrofotometro U.V. -visível Varian Techtron, modelo 635.

Os potenciômetros utilizados para medida do pH foram das marcas Metrohm modelo E 512 e Orion Research modelo digital 701, ambos com microeletrodo combinado.

Para o preparo das diferentes soluções todas as amostras foram quantitativamente pesadas em balança METTLER, modelo H10.

A desionização da água destilada foi feita em desionizador CORNING modelo LD-2a.

4. MÉTODOS

4.1. Determinação da Pureza dos Açúcares

A pureza dos açúcares utilizados (sacarose, β - lactose, glicose, galactose e frutose) foi determinada por cromatografia em papel, usando-se para cada composto amostras de 10 μ l de uma solução a 5%.

Os cromatogramas foram desenvolvidos com propanol-acetato de etila-água (65:10:25:V:V) e após a secagem a temperatura ambiente, foram revelados com solução de nitrato de prata em acetona.

Em todos os cromatogramas foi encontrada somente uma mancha característica do açúcar examinado.

4.2. Medida do Escurecimento das Soluções de Lactose e de Sacarose:

Foram preparadas soluções 0,5M de sacarose e de lactose em água desionizada (pH 6,20 e 3,00), em tampão citrato (pH 6,20 e 3,00) (31) e em tampão fosfato (pH 6,20) (31). O pH da água e das soluções tamponadas foi corrigido com soluções 2,0N, 0,1N e 0,01N de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. A concentração dos ions citrato e fosfato nas soluções usadas foi de 0,05M.

As soluções foram distribuídas em tubos de vidro com tampa de rosca contendo cada tubo aproximadamente 10,0 ml de solução. Os tubos foram aquecidos em banho de água a temperatura de $50 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

O pH e a densidade ótica, a 450 nm, de cada solução foram medidos antes das soluções serem colocadas no banho e posteriormente em diversos intervalos de tempo. Todas as medidas foram feitas em duplicata.

4.3. Reação de Maillard com Sacarose e com Lactose

Foram preparadas soluções contendo sacarose - glicina (0,5M e 0,25M respectivamente) e lactose - glicina (0,5M e 0,25M respectivamente) nos mesmos solventes e nas mesmas condições utilizadas em 4.2.

As soluções foram distribuídas em tubos de vidro com tampa de rosca, e aquecidas em banho de água a $50 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ durante tempos que variaram de 330 a 528 horas conforme o açúcar usado (Tabelas 7, 8, 9 e 10).

O escurecimento progressivo de cada solução foi medido pela variação da absorvância, a 450 nm, em intervalos de tempo que variaram para cada solução. Também foi medida a variação do pH de cada solução. Todas as medidas foram feitas em duplicata.

4.4. Hidrólise da Lactose e da Sacarose

Para a determinação da hidrólise da lactose e da sacarose foram usadas soluções 0,5M de lactose ou de sacarose preparadas com os diferentes solventes e a pH diferentes do mesmo modo como foi descrito em 4.2. As soluções foram aquecidas a $50 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ exatamente como em 4.2.

A hidrólise da lactose foi medida pelo teor de glicose livre determinada enzimaticamente, Glucostat especial (44).

A hidrólise da sacarose foi medida pelo teor de redutores presentes determinados colorimetricamente com ácido 3,5 dinitrosalicílico (43). Em ambas as determinações foram usadas amostras em triplicatas.

4.5. Reação de Maillard dos Produtos de Hidrólise da Lactose.

Foram preparadas misturas de glicose-galactose-glicina nas concentrações especificadas na tabela 1.

TABELA 1

açúcares + Gly (0,25 M)	Solvente	
	t. fosfato - pH 6,2	t. citrato - pH 6,2
glicose + galactose	11,8 µM + 11,8 µM	10,0 µM + 10,0 µM

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Material e Métodos

No presente trabalho foram usados sacarose e lactose como modelos para disacarídeos em função da sua estrutura e importância em alimentos. Tais açúcares tem sido relativamente pouco estudados em relação ao escurecimento não enzimático, sendo na maioria dos casos, poucas as informações precisas de como atuam e até que ponto são importantes no escurecimento de alimentos, seja por si mesmos ou por seus produtos de hidrólise.

A escolha da glicina como amino ácido modelo prendeu-se a presença desse amino ácido em praticamente todos os alimentos e a sua estrutura simples.

Para estudar o efeito de sais foram escolhidos fosfato e citrato comumente encontrados em alimentos, seja naturalmente ou seja por adição em função do processamento ou modificações do sabor natural.

A temperatura em que foram feitas todas as experiências, 50°C, foi escolhida atendendo as condições de trabalho em laboratório e a extrapolação de dados para casos práticos. Assim, como a reação de Maillard pode ocorrer durante o armazenamento de alimentos, 50°C permitiria extrapolação de conclusões para condições de armazenamento feito a temperaturas ambiente elevadas. Permitiria também uma observação melhor da reação na sua face inicial sob condições de reação brandas mas não ao ponto de retardar a reação.

A escolha do pH em que as reações foram estudadas foi baseada em estudos anteriores da reação de Maillard (WOLFROM, KOLB e LANGER (29) SAUNDERS e JERVIS (56) BOBBIO (69) POWELL e SPARK (71)) e pelo fato de que tanto pH 3,00 como pH 6,20 são valores que se encontram na faixa de pH própria de vários alimentos seja naturais ou processados.

A técnica empregada para a execução da hidrólise e da reação de escurecimento em sistemas modelo baseou-se em trabalhos anteriores (CAWLEY;

SPEAR e KENDALL (36); BRUNER (43); BOBBIO (69), onde a mesma foi padronizada mostrando-se eficiente e permitindo a obtenção de resultados facilmente comparáveis.

As técnicas analíticas empregadas são de execução relativamente simples e permitiram acompanhar o andamento da reação de Maillard e da hidrólise dos disacarídeos dentro da precisão e exatidão desejadas uma vez tomadas as precauções usuais de padronização dos métodos nas condições deste trabalho.

A medida da absorvância, a 450 nm, como parâmetro para avaliar o andamento do escurecimento não enzimático foi amplamente discutida em trabalhos anteriores, entre outros os de WOLFROM, KOLB e LANGER (29); BOBBIO (69) e POWELL e SPARK (71).

A hidrólise da lactose foi estudada utilizando-se o método da glicose-oxidase ("GLUCOSTAT Special") o qual permitiu a determinação quantitativa e específica de um dos produtos de hidrólise, glicose, pois não havia no meio de reação substâncias que reconhecidamente interferissem na determinação. Foram feitos ensaios para determinar a concentração mínima de glicose determinável pelo GLUCOSTAT e verificou-se que 1,0 µg/ml pode ser determinado com uma exatidão de $\pm 2,5\%$ o que está na faixa de erro do método determinada por SAIFER e GERSTENFELD (35).

Para a sacarose, o teor de redutores provenientes da hidrólise foi determinado utilizando o ácido 3,5 - dinitrosalicílico (DNS). Este método mostrou-se mais rápido e menos sensível as variações de condições de reação do que o método de SOMOGY e NELSON (13), ou seja houve maior precisão no método do DNS sobre o de SOMOGY e NELSON e suficiente exatidão para nossos fins. Experimentalmente verificou-se que o método do DNS obedece a lei de Lambert e Beer na faixa de concentrações de redutores (glicose) compreendida entre 10,0 e 50,0 µg/ml.

5.2. Escurecimento das Soluções de Lactose e de Sacarose

Após 400 horas de reação não foi verificado aumento na absorvância das soluções de lactose e de sacarose preparadas nos diferentes solventes e pH

conforme descrito em 4,2, demonstrando assim que nas condições experimentais utilizadas não se deram reações de caramelização.

Nas soluções tamponadas de ambos os açúcares o pH inicial conservou-se estável pelo menos até 400 horas de reação, enquanto que nas soluções não tamponadas o pH inicial de 6,20 sofreu diminuição gradativa atingindo o valor de 5,4 para a sacarose e 5,6 para a lactose no mesmo período de reação antes mencionado. Esta variação do pH pode ser atribuída a decomposição dos açúcares com formação de compostos com grupos ácidos que seriam responsáveis pelo pequeno abaixamento do pH.

5.3. Hidrólise da Lactose em Água, em Tampão Fosfato e em Tampão Citrato a pH 6,20

Os resultados obtidos com tampão fosfato e citrato estão representados na tabela 2 e no gráfico 1.

TABELA 2

Hidrólise da lactose em diferentes meios de reação a pH 6,20.

Lactose/tampão fosfato		Lactose/tampão citrato	
tempo (horas)	conc. de glicose μg/ml	tempo (horas)	conc. de glicose μg/ml
0	0,000	0	0,000
97	0,997	115	0,994
146	1,470	150	1,220
162	1,593	162	1,276
187	1,800	189	1,451
240	2,120	210	1,62
		240	1,800
$k = 0,251 \times 10^{-10} \text{ seg}^{-1}$		$k = 0,205 \times 10^{-10} \text{ seg}^{-1}$	

Quando o solvente usado foi água desionizada verificou-se que até 260 horas de reação as concentrações de glicose eram muito baixas, sendo menores do que a concentração mínima (1 µg/ml) determinável pelo método utilizado (44), apesar do abaixamento do pH para 5,8.

Examinando os dados da tabela 2, e considerando que não houve hidrólise mensurável na solução em água desionizada, pode-se admitir que houve considerável efeito catalítico do tampão citrato e do tampão fosfato na velocidade de hidrólise da lactose. Os dados da tabela 2 indicam que a velocidade de hidrólise é decrescente na ordem: tampão fosfato, tampão citrato, e água desionizada. Como não houve variação do pH nas soluções tamponadas onde a concentração dos anions citrato e fosfato é a mesma, os resultados indicam a existência de um efeito catalítico sobre a velocidade de hidrólise que é dependente da natureza do anion. Um efeito portanto semelhante aquele observado por TATEO (67) ao estudar a hidrólise da sacarose em presença de ácido cítrico e clorídrico e por FLOYD (3) ao investigar o efeito dos anions sulfato e cloreto na velocidade de hidrólise.

5.4. Hidrólise da Lactose em Água e em Tampão Citrato a pH 3,00

Os resultados obtidos estão representados na tabela 3 e gráfico 2.

TABELA 3

Hidrólise da lactose em diferentes meios de reação a pH 3,00.

Lactose/H ₂ O		Lactose/tampão citrato	
tempo (horas)	conc. de glicose µg/ml	tempo (horas)	conc. de glicose µg/ml
0	0,000	0	0,000
90	1,046	41	0,928
139	1,560	90	1,494
162	1,903	162	2,665
240	2,661	240	3,550
336	3,295	336	4,707
528	4,615	478	5,825
-	-	504	5,972
-	-	528	6,115
k = 0,272 x 10 ⁻¹⁰ seg ⁻¹		k = 0,377 x 10 ⁻¹⁰ seg ⁻¹	

Desde que a pH 3,00 há hidrólise mensurável em água desionizada ao contrário do observado a pH 6,20, a diferença nos dois casos é atribuível a presença de íons de hidrogênio. Os dados obtidos a pH 3,00 e 6,20 (tabelas 2 e 3) indicam que também existe um efeito catalítico das demais espécies presentes, pois apesar de que na solução de lactose em água o pH inicial 6,20 diminuiu para 5,8 após 240 horas, mesmo assim a hidrólise foi praticamente inexistente enquanto que em presença de anions onde o pH 6,20 conservou-se invariável a hidrólise foi mensurável.

A pH 3,00 não pode ser introduzido o conceito de efeito específico de anion por falta de dados comparáveis como a pH 6,20 onde é possível usar um tampão fosfato eficiente.

Considerando que a pH 3,00 a concentração de ácido cítrico não dissociado é consideravelmente superior aquela presente a pH 6,20 onde predomina a concentração do anion, os dados das tabelas 2 e 3 indicam que na hidrólise da lactose a catálise em presença de tampão citrato é devida ao efeito das tres espécies presentes: íons de hidrogênio, anions citrato e ácido cítrico. O efeito catalítico total seria a soma dos efeitos catalíticos parciais sendo desprezível, se houver, o efeito catalítico do cation Na^+ . Resumindo teríamos de acordo com o preconizado por VUKOV (52) a possibilidade de expressar o efeito catalítico total pela seguinte soma: $\alpha C_1 + \beta C_2 + \gamma C_3$, sendo C o efeito catalítico de cada espécie e α , β e γ constantes de proporcionalidade dependentes do pH, da temperatura e da composição da espécie. A pH 6,20 predomina o efeito catalítico do anion citrato presente em concentração elevada em relação as outras espécies. A pH 3,00 predomina o efeito do cation de hidrogênio e da molécula de ácido cítrico.

5.5. Hidrólise da Sacarose em Água, em Tampão Citrato e em Tampão Fosfato a pH 6,20.

Os dados obtidos estão representados na tabela 4 e gráfico 3.

TABELA 4

Hidrólise da sacarose em diferentes meios de reação a pH 6,20

Sacarose/H ₂ O		Sacarose/t. fosfato		Sacarose/t.citrato	
Tempo (horas)	aç.redutores µg / ml	Tempo (horas)	aç.redutores µg / ml	Tempo (horas)	aç.redutores µg / ml
0	0,0	0	0,00	0	0,00
98	17,6	70	20,0	70	18,8
117	18,4	98	24,0	98	21,6
165	24,2	117	27,5	117	25,2
194	29,0	165	37,4	165	32,0
240	38,0	194	44,4	217	41,2
		217	48,8	240	46,2
		240	54,5		
$k = 0,258 \times 10^{-9} \text{ seg}^{-1}$		$k = 0,349 \times 10^{-9} \text{ seg}^{-1}$		$k = 0,285 \times 10^{-9} \text{ seg}^{-1}$	

Pela tabela 4 nota-se que o efeito catalítico do solvente aumenta na seguinte ordem: solução não tamponada, tampão citrato e tampão fosfato. A maior atividade de ion fosfato em relação ao ion citrato evidencia um efeito catalítico aniônico específico como foi demonstrado para a lactose (5.3.). Baseado nos mecanismos de hidrólise propostos por TIMELL (45) e por DAWBER, BROWN e REED (54), os anions presentes poderiam atuar no sentido de diminuir a energia de ativação envolvida na formação do complexo ativado SH^+ .

5.6. Hidrólise da Sacarose em Água e em Tampão Citrato a pH 3,00

Os resultados obtidos estão representados na tabela 5 e no gráfico 4.

TABELA 5

Hidrólise da sacarose em diferentes meios de reação a pH 3,00.

Sacarose/H ₂ O		Sacarose/tampão citrato	
tempo (horas)	aç. redutores µg/ml x 10 ²	tempo (horas)	aç. redutores µg/ml x 10 ²
0	0,0	0	0,00
22	30,8	22	34,8
46	57,6	46	61,2
70	78,4	70	86,4
98	99,4	98	103,0
165	120,6	165	131,0
217	131,6	194	137,6
240	135,0	217	142,6
		240	146,5
k ₀₋₁₀₀ h = 0,152 x 10 ⁻⁶ seg ⁻¹		k ₀₋₁₀₀ h = 0,152 x 10 ⁻⁶ seg ⁻¹	
k ₁₀₀₋₂₄₀ h = 0,437 x 10 ⁻⁷ seg ⁻¹		k ₁₀₀₋₂₄₀ h = 0,536 x 10 ⁻⁷ seg ⁻¹	

Pelos dados da tabela 5 verifica-se que na etapa inicial da reação (até 100 horas) em ambos os solventes as concentrações de açúcares são semelhantes, indicando que a pH 3,00 no início da reação haveria predominância do efeito catalítico dos íons de hidrogênio, o que pode ser comprovado pelos valores das relações entre as constantes de hidrólise (apêndice II). Após a etapa inicial da reação, os dados da tabela 5 indicam a existência de um aumento na velocidade de hidrólise (apêndice II) que seria produzida pelos demais componentes presentes na solução: ânions citrato e moléculas não dissociadas de ácido cítrico. Como a pH 3,00 predomina o equilíbrio $\text{Ac. cítrico} \rightleftharpoons \text{citrato}^{-1}$ ($\text{pK}_1 = 3,09$) (A); e a pH 6,20 predomina o equilíbrio $\text{citrato}^{-2} \rightleftharpoons \text{citrato}^{-3}$ ($\text{pK}_3 = 5,41$) (B), o sistema (A) é possivelmente um catalizador mais efetivo que o sistema (B) para a hidrólise da sacarose.

Os resultados obtidos por HIBBERT e PERCIVAL (2) mostram que não há ou pelo menos ainda não foi encontrada uma relação simples entre tipo de ligação glicosídica e velocidade de hidrólise. Os dados por nós obtidos indicam maior facilidade de hidrólise para a ligação hemiacetálica da sacarose e que essa ruptura é mais sensível a catálise do íon hidrogênio do que a ligação hemiacetálica da lactose.

5.7. Valores da Constante de Hidrólise, k em seg^{-1} da Lactose e Sacarose nos Diferentes Solventes e pH Utilizados.

Em todos os casos, após a etapa inicial, fazendo-se o gráfico do tempo vs $\log (a-x)$ (onde a é a concentração inicial do açúcar (g/l), x é a concentração dos produtos de hidrólise (g/l) após os diversos períodos de tempo) foi obtida uma reta. Isto indica que a reação de hidrólise da lactose e da sacarose se comporta como reação de primeira ordem, o que está de acordo aos resultados anteriormente obtidos por outros autores TIMELL, (45) DAWBER, BROWN e REED (54). Os valores da constante de hidrólise, k em seg^{-1} , estão representados na tabela 6.

TABELA 6

Solvente	H ₂ O	t.citrato	t.fosfato
pH	6,20	3,00	6,20
Lactose	0,272 x 10 ⁻¹⁰	0,209 x 10 ⁻¹⁰	0,231 x 10 ⁻¹⁰
Sacarose	0,258 x 10 ⁻⁹ k ₀ -100h=0,152x10 ⁻⁶ k _{100-240h} =0,437x10 ⁻⁷	0,285 x 10 ⁻⁹ k ₀ -100h=8,152x10 ⁻⁶ k _{100-240h} =0,536x10 ⁻⁷	0,349 x 10 ⁻⁹

5.8. Reação de Maillard no Sistema Lactose-Glicina em Água, em Tampão Fosfato e em Tampão Citrato a pH 6,20.

Os resultados obtidos estão representados na tabela 7 e no gráfico 5.

TABELA 7

Reação de Maillard do sistema lactose-glicina em diferentes solventes a pH 6,20.

Lactose - Gly - água		Lactose -Gly t.fosfato		Lactose-Gly-t.citrato	
Tempo (h)	D.O. x 10^{-3}	Tempo (h)	D.O. x 10^{-3}	Tempo (h)	D.O. x 10^{-3}
0	0,000	0	0,000	0	0,000
138	11	20	8	17	6
159	14	42	15	44	35
184	22	68	22	73	75
206	27	97	35	115	171
232	32	139	54	137	210
303	48	162	68	162	313
326	53	186	88	186	346
351	61	211	106	215	487
446	87	241	139	281	689
		362	326	337	841
$k^* = 0,685 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1}$ $k^* = 3,00 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1}$ $k^* = 8,06 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1}$					

No período de reação a solução não tamponada sofreu uma diminuição gradativa do pH de aproximadamente 1,0 unidade; nas soluções tamponadas a diminuição foi de 0,2 unidades. De acordo com FRANKEL e KATCHALSKY (6) e WOLFROM, KOLB e LANGER (29) esta diminuição de pH é resultante da reação entre o amino ácido e o açúcar e consequente diminuição dos amino grupos livres na solução.

Os dados da tabela 7 indicam considerável ação catalítica por parte dos anions, sendo a ordem decrescente de atividade: tampão citrato, tampão fosfato e água. O efeito dos anions traduziu-se numa diminuição semelhante dos períodos "indutivos" da reação (fase premelanoidina), isto é: o tempo decorrente do início da experiência até o começo do escurecimento, indicando que os anions presentes atuaram efetivamente sobre a formação dos compostos da etapa inicial da reação de Maillard. Nesta fase dada a semelhança do efeito dos dois anions, torna-se difícil distinguir efeito catalítico específico. Porém quando o aparecimento de melanoidinas começa a ser mais intenso, verifica-se que o sistema contendo tampão citrato escurece mais rapidamente do que o sistema contendo tampão fosfato e desde que as outras variáveis são iguais nos dois sistemas, o resultado indica a existência de efeito catalítico específico de cada anion na formação de cor.

Por outro lado, os dados da tabela 2 mostram que apesar da hidrólise da lactose ter sido insignificante em água e muito pequena nas soluções tamponadas ($k_{\text{citrato}} = 0,205 \times 10^{-10} \text{ seg}^{-1}$; $k_{\text{fosfato}} = 0,251 \times 10^{-10} \text{ seg}^{-1}$), houve um aumento significativo da absorvância (gráfico 5) indicando que a reação de Maillard com lactose não depende da sua hidrólise, podendo o dissacarídeo reagir pelo grupo carbonila livre que contém.

Considerando os valores calculados para as constantes de hidrólise e de escurecimento (ver apêndice II e III) podemos expressar numericamente os fenômenos acima discutidos pela relação entre os valores das constantes, assim temos que:

$$\frac{k_{\text{fosfato}}}{k_{\text{citrato}}} = 1,22 ; \quad \frac{k^*_{\text{fosfato}}}{k^*_{\text{citrato}}} = 0,37$$

Os valores obtidos mostram claramente que apesar da hidrólise ser mais rápida em fosfato o anion citrato é melhor catalizador da reação de escurecimento.

5.9. Reação de Maillard no Sistema Lactose-Glicina em Água e em Tampão Citrato a pH 3,00

Os resultados obtidos estão representados na tabela 8 e no gráfico 6.

TABELA 8

Reação de Maillard do sistema lactose-glicina em diferentes solven
tes a pH 3,00

Lactose -Gly - H ₂ O		Lactose - Gly - t. citrato	
tempo (h)	D.O x 10 ⁻³	Tempo (h)	D.O x 10 ⁻³
0	0,00	0	0,00
312	3	258	5
336	4	310	8
377	8	336	9
425	12	377	16
475	15	402	20
528	23	425	27
		475	37
		528	47
$k^* = 0,275 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1}$		$k^* = 0,497 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1}$	

Em ambos os solventes houve um aumento gradativo do pH de 0,2 unidades até o início do escurecimento. Uma vez iniciado o escurecimento o pH ficou estável durante todo o período restante da reação.

Os dados da tabela 8 mostram que de modo semelhante ao discutido em 5.8., houve um efeito catalítico dos componentes da solução tampão no sentido de diminuir o período de "indução" e aumentar a velocidade da reação de escurecimento.

O escurecimento da lactose verificado a pH 6,20 (tabela 7) foi maior do que a pH 3,00 (tabela 8), o que mostrou que a diminuição do pH retardou mas não inibiu o escurecimento, indicando que apesar da maior hidrólise a pH 3,00 do que a pH 6,20 (tabela 6) naquele pH prevalece o efeito negativo da protonação do amino ácido, diminuindo a caráter nucleofílico do amino grupo.

De acordo com os resultados de outros autores (SAUNDERS e JERVIS (56); BOBBIO (69)), sabemos que na reação de Maillard com monossacarídeos o íon fosfato é catalizador mais efetivo que o citrato, nos dissacarídeos inverte-se esse efeito o que vem confirmar que a molécula de lactose é a responsável pelo escurecimento. Tal resultado também indica a possibilidade de que citrato e fosfato atuem através de mecanismos diferentes na reação de Maillard com mono e dissacarídeos.

5.10. Reação de Maillard dos Produtos de Hidrólise de Lactose.

Pela tabela 7 verifica-se que a pH 6,20 há apreciável aumento da absorvância nos sistemas tamponados de lactose: no entanto não foi verificado escurecimento em sistemas tamponados (t. fosfato ou citrato) contendo glicose e galactose na concentração equivalente, para cada sistema, aquela produzida pela hidrólise da lactose após 240 horas de reação (tabela 1). Os resultados desta experiência comprovam que a molécula de lactose participa da reação de Maillard, sem necessidade de hidrólise previa.

5.11. Reação de Maillard no Sistema Sacarose-Glicina em Água, em Tampão Fosfato e em Tampão Citrato a pH 6,20

Os resultados obtidos estão representados na tabela 9 e gráfico 7.

TABELA 9

Reação de Maillard do sistema sacarose-glicina em tampão fosfato a pH 6,20.

Sacarose - Gly - t. fosfato	
Tempo (h)	D.O x 10 ⁻³
0	0,0
72	5
96	7
121	11
161	14
168	15
192	20
234	26
262	31
330	39
357	42
401	49
426	53
$k^* = 0,387 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1}$	

Não foi verificado aumento da absorvância na solução não tamponada e na solução de tampão citrato, o que indica que a molécula de sacarose é incapaz de produzir escurecimento confirmando os resultados obtidos anteriormente por outros autores (FRAENKEL e KATCHALSKY (6), KRETOVICH e TOKAREVA (15)) de que a presença no açúcar de um grupo carbonila livre é necessária para a formação de melanoidinas.

Por outra parte, verificou-se pequeno escurecimento no sistema contendo ions fosfato (tabela 9) o qual é devido: (a) à maior ação catalítica do ion fosfato na hidrólise da sacarose, quando comparamos com os sistemas não tamponados e tampão citrato (tabela 6). (b) ao fato de que os ions fosfatos são melhores catalizadores na reação de Maillard com monosacarídeos.

Comparando-se os dados das tabelas 7 e 9 verifica-se que, a pH 6,20 e em iguais condições experimentais, o aumento da absorvância nos sistemas contendo lactose foi sempre maior do que nos sistemas contendo sacarose, apesar da velocidade de hidrólise do segundo sistema ser consideravelmente maior do que o primeiro (tabela 6), o que também vem demonstrar que, ao contrário da lactose, a sacarose só sofre escurecimento devido aos seus produtos de hidrólise quando a concentração dos mesmos atinge valores mínimos. No sistema contendo ions fosfato o valor mínimo seria da ordem de 20 µg/ml.

5.12. Reação de Maillard no Sistema Sacarose-Glicina em Água e em Tampão Citrato a pH 3,00.

Os resultados obtidos estão representados na tabela 10 e gráfico 8.

TABELA 10

Reação de Maillard do sistema sacarose-glicina em diferen
tes solventes a pH 3,00

Sacarose - Gly - água		Sacarose -Gly-t.citrato	
Tempo (h)	D.O. x 10^{-3}	Tempo (h)	D.O. x 10^{-3}
0	0,0	0	0,00
121	3	96	3
161	5	121	6
192	7	168	13
234	11	193	18
262	17	234	31
330	32	262	41
357	39	330	78
381	50	357	94
401	58	381	119
426	71	426	155
$k^* = 0,868 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1}$		$k^* = 1,633 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1}$	

O pH de ambas as soluções permaneceu estável.

De modo semelhante ao que foi verificado em 5.9. para lactose, os dados da tabela 10 mostram que o escurecimento medido em tampão citrato é aproximadamente o dobro daquele verificado na solução não tamponada (ver apêndice III). O efeito catalítico dos componentes da solução tampão, em comparação com a solução não tamponada, é demonstrado pelo início do escurecimento com menor concentração de redutores (tampão citrato 11.0 µg/ml: solução não tamponada 12 µg/ml)

Comparando-se os dados das tabelas 9 e 10, verifica-se que o aumento da absorvância das soluções contendo sacarose foi consideravelmente maior a pH 3,00 do que a 6,20 ao contrário do que já foi observado para a lactose (5.9.). Pelos dados das tabelas 9 e 10 verifica-se também que a pH 3,00 o escurecimento produzido pelos sistemas contendo sacarose foi sempre maior do que o escurecimento produzido pelos sistemas contendo lactose. Tanto trabalhos anteriores (WOLFROM, KOLB e LANGER (29); POMERANZ, JOHNSON e SHELLENBERGER (40); COLE (53); SAUNDERS e JERVIS (56)) como os resultados aqui apresentados mostram a ação retardadora do abaixamento do pH sobre a reação de Maillard, assim deve-se considerar que os resultados obtidos indicam que o maior escurecimento da sacarose a pH 3,00 do que a 6,20 é devido a maior hidrólise desse dissacarídeo em pH ácido. Também deve ser levado em conta que nos sistemas não tamponados a pH 3,00 a velocidade de hidrólise da sacarose, no início da reação, é 5588 vezes maior do que a velocidade de hidrólise da lactose (ver apêndice IV). Como consequência, nas soluções de sacarose a pH 3,00 há grande aumento da concentração de monossacarídeos redutores o que compensaria em parte o efeito contrário do pH baixo. Portanto os resultados obtidos também indicam menor velocidade de escurecimento por parte da lactose em relação aos monossacarídeos glicose e frutose.

5.13. Valores da Constante de Velocidade de Escurecimento, k^* em seg^{-1} , dos Sistemas Lactose-Glicine e Sacarose-Glicine nos diferentes solventes e pH Utilizados.

Os valores obtidos para as constantes de velocidade de escurecimento, k^* em seg^{-1} , estão representados na tabela 11.

TABELA 11

Valores da constante de escurecimento, k^* em seg^{-1} , dos sistemas lactose-glicina e sacarose-glicina nos diferentes solventes e pH utilizados;

pH 6,20		pH 3,00	
Solvente	H ₂ O	tampão fosfato	tampão citrato
Lactose-glicine	$k_{138-446}^* = 0,685 \times 10^{-7}$	$k_{90-362}^* = 3,00 \times 10^{-7}$	$k_{73-337}^* = 8,06 \times 10^{-7}$
		$k_{336-528}^* = 0,275 \times 10^{-7}$	$k_{310-528}^* = 0,497 \times 10^{-7}$
Sacarose-glicine		$k_{96-426}^* = 0,387 \times 10^{-7}$	$k_{234-426}^* = 0,368 \times 10^{-7}$
			$k_{193-426}^* = 1,693 \times 10^{-7}$

Nota: a - Os valores de k^* foram calculados graficamente pelas curvas de escurecimento de cada um dos açúcares.

b - Os sub-índices de k^* indicam os intervalos de tempo para os quais os valores foram calculados.

Considerando que a medida da absorvância é proporcional à concentração de melanoidinas produzidas na reação de Maillard, (gráfico 5, 6, 7 e 8), graficamente pode-se calcular o valor da constante de primeira ordem da reação de Maillard.

6. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos conclue-se que:

- 1 - Soluções 0,5 M de lactose e sacarose em água, em tampão citrato (pH 6,20 e 3,00) e em tampão fosfato (pH 6,20), mantidas a 50°C durante 400 horas, não produzem escurecimento por reações de caramelização.
- 2 - Na hidrólise da lactose e da sacarose a pH 6,20, há efeito catalítico do solvente o qual é crescente na ordem: solução não tamponada, tampão citrato, tampão fosfato. Manifestando-se também efeito catalítico dependente da natureza das espécies contidas no solvente.
- 3 - Na hidrólise da lactose a pH 3,00, o efeito catalítico do solvente é crescente na ordem: solução não tamponada, tampão citrato.
- 4 - Na hidrólise da sacarose a pH 3,00, no início da reação há predominância do efeito catalítico dos íons de hidrogênio, em comparação com os componentes do tampão citrato. O efeito catalítico dos componentes da solução tamponada manifesta-se somente após a etapa inicial da reação.
- 5 - A ligação hemiacetálica da sacarose é mais facilmente hidrolizada e mais sensível ao efeito catalítico do pH, do que a ligação hemiacetálica da lactose.
- 6 - Na reação de Maillard do sistema lactose-glicina a pH 6,20 há considerável ação catalítica por parte do solvente, sendo a ordem crescente de atividade: solução não tamponada, tampão fosfato, tampão citrato. Verificou-se também que na formação de cor há efeito catalítico específico dos anions contidos no solvente. Os anions presentes diminuíram o período de "indução" da reação de escurecimento.

- 7 - No sistema lactose-glicina a pH 6,20, o escurecimento é iniciado pela molécula do disacarídeo e não pelos seus produtos de hidrólise.
- 8 - No sistema lactose - glicina, a diminuição do pH retarda mas não inibe o escurecimento.
- 9 - Existe a possibilidade de que os ions citrato e fosfato atuem através de mecanismos diferentes na reação de Maillard com mono e disacarideos.
- 10 - No escurecimento do sistema lactose-glicina a pH 3,00, há efeito catalítico dos componentes do tampão citrato, em relação à solução não tamponada, no sentido de diminuir o período de "indução" e aumentar a velocidade da reação de escurecimento.
- 11 - A molécula de sacarose é incapaz de produzir a reação de Maillard, sendo que o escurecimento produzido na presença deste açúcar é devido aos seus produtos de hidrólise.
- 12 - A pH 3,00 na presença de glicina os sistemas contendo sacarose produziram maior escurecimento do que os sistemas contendo lactose, o que é devido à maior velocidade de hidrólise da sacarose em comparação com a lactose.
- 13 - O escurecimento produzido pelos sistemas contendo - sacarose - glicina foi maior a pH 3,00 do que a 6,20, o que é devido a maior velocidade de hidrólise da sacarose a pH 3,00 em comparação com pH 6,20.
- 14 - Os resultados aqui obtidos indicam que no processamento dos alimentos o escurecimento não enzimático (reação de Maillard) é facilitado pela presença de espécies iônicas (fosfatos no caso de leite).

15 - Na fabricação da sacarose a presença de anions provenientes dos diver
sos tratamentos ou por efeito de adubações pode ser fator importante
no rendimento do açúcar produzido, pelo efeito catalítico que os
anions teriam sobre a formação de melanoidinas do melaço e sobre a ve
locidade de hidrólise da sacarose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. VAN SLYKE, D.D. J. Biol. Chem. 83: 425, 1929 (c. f. CONRAT-FRAENKEL, J. COOK, B. B. & MORGAN, A. F. - The determination of certain properties of β -lactoglobulin and its lactose derivatives. Arch. Biochem. Biophys. 35: 157-70, 1952).
2. HIBBERT, H. & PERCIVAL, E. G. V. - Carbohydrates and poly saccharides. xxx. Comparative hydrolysis of some disaccharides and polysaccharides. J. Am. Chem. Soc. 52: 3995-- 4005, 1930.
3. FLOYD, W. W. - The influence of strong electrolytes upon the catalytic inversion of sucrose by hydrochloric acid at 309. J. Phys. Chem. 35: 2968 - 84, 1931.
4. HAMMETT, L.P. & PAUL, H.A. - The relation between the rates of some acid - catalyzed reactions and the acidity function, Ho. J. Am. Chem. Soc. 56: 830 - 32, 1934.
5. KRIEBLE, V. K. - Activities and the hydrolysis of sucrose with concentrated acids. J. Am. Chem. Soc. 57: 15 - 19, 1935.
6. FRAENKEL, M. & KATCHALSKY, A. - The Interaction of α - amino acids and peptides with sugars in aqueous solution. Biochem. J. 31: 1595 - 1604, 1937.
7. LEININGER, P. M. & KILPATRICK, M. - Hydrolysis of sucrose. J. Am. Chem. Soc. 60: 1268, 1938.
8. _____ & _____, Inversion of sucrose. J. Am. Chem. Soc. 60: 2891 - 99, 1938.

9. PEARCE, J. N. & THOMAS, M. E. - The influence of neutral salts on the inversion of sucrose. J. Phys. Chem. 42: 455 - 67, 1938.
10. DUBOUX, M. & ROCHAT, J. - Relation between the velocity of inversion of sucrose and activity of hydrogen ions in a concentrated solution of pure hydrochloric acid or mixed with a chloride. Helv. Chim. Acta 22: 563 - 79, 1939.
11. MATUMOTO, S. - Biochemical studies of the satsuma orange. J. Chem. Soc. Japan 60 : 1127 - 48, 1939. (c. f. Chem. Abs. 36 (20) : 6256, 1942.).
12. HEIDT, L. J. & PURVES, C. B. - The inversion of sucrose. J. Am. Chem. Soc. 62: 1006 - 09, 1940.
13. NELSON, N. - A photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153: 375, 1944.
14. RAMSDELL, G. A. & WEBB, B. H. - Acid hydrolysis of lactose and the preparation of hydrolyzed lactose sirup. J. Dairy Sci. 28: 677 - 86, 1945. (c. f. Chem. Abs. 39 (22): 5354, 1945).
15. KRETOVICH, V. L. & TOKAREVA, R. - Interaction of amino acids and sugars at high temperatures. Biokhimiya 13: 508-15, 1948. (c.f. Chem. Abs. 43: 4501, 1949).
16. LEA, C. H. - The reaction between milk protein and reducing sugar in the dry state. J. Dairy Res. 15: 369 - 76, 1948.
17. MAFFEI, F. J. - A velocidade de inversão da sacarose por alguns ácidos fracos. An. assoc. quim. Brasil 7, 98 - 105, 1948.
18. MOSTER, J. B. & CHAPMAN, R. A. - Browning reaction in dried milk powder. Can. J. Res. 27F, 429 - 34, 1949.

19. PATTON, S. J. Biol. Chem. 184: 131, 1950. (c. f. HODGE, J. E.; FISHER, B. E. & NELSON, E. C. - Dicarboxyls, reductones, and Heterocyclics produced by reactions of reducing sugars with secondary amine salts. Am. Soc. of Browing Chem. Proc. 84 - 92, 1963).
20. BODAMER, G. & KUNIN, R. - Heterogeneous catalytic inversion of sucrose with cation exchange resins. Ind. Eng. Chem. 43: 1082 - 85, 1951.
21. HAUGAARD, G.; TUMERMAN, L. & SILVESTRI, H. - The reaction of aldoses and amino acids. J. Am. Chem. Soc. 73: 4594 - 600, 1951.
22. CONRAT - FRAENKEL, J.; COOK, B. B. & MORGAN, A. F. - The determination of certain properties of β -lactoglobulin and its lactose derivatives. Arch. Biochem. Biophys. 35: 157 - 70, 1952.
23. HEIDT, L. J.; SOUTHAM, F. Wm. & SULLIVAN, E. A. - Autocatalyzed hydrolysis of sucrose by acid. J. Am. Chem. Soc. 74: 2377 - 78, 1952.
24. MALYOTH, G. & STEIN, H. W. - The scission of lactose. Angew. Chem. 64: 399, 1952. (c. f. Chem. Abs. 46: 11112, 1952).
25. PATTON, S. - Heated milk. IV. Browning. J. Dairy Sci. 35: 1053 - 66, 1952. (c. f. Chem. Abs. 47: 5569, 1953).
26. PICKETT, T. A. & HOLLEY, K. T. - Peanut roasting studies. Univ. of Georgia Agr. Expt. Sta. Tech. Bull. No. 1: 5 - 36, 1952. (c. f. Chem. Abs. 47: 12684, 1953).
27. HODGE, J. E. - Dehydrated foods - chemistry of browning reactions in model systems. Agr. and Food Chem. 1 (15): 928 - 43, 1953.

28. TAMAKI, Y. - Browning reaction of carbohydrate I. Influence of various kinds of ions and amino acids. J. Chem. Soc. Japan, Ind. Chem. Sect. 56: 460 - 61, 1953 (c. f. Chem. Abs. 48:11512, 1954).
29. WOLFROM, M. L.; KOLB, D. K. & LANGER Jr. A. W. - Chemical interactions of amino compounds and sugars. VII. pH dependency. J. Am. Chem. Soc. 75: 6471 - 73, 1953.
30. ZABRODSKII, A. G. & VITROVSKAYA V. A. - Conditions affecting the course of reaction taking place between amino acids and sugar. Biokhimiya 19: 738 - 48, 1954. (c. f. Chem. Abs. 49: 6337, 1955).
31. COLOWICK & KAPLAN - Methods in enzymology. New York, Academic Press, 1955. V. 1, p. 138.
32. GRANDCHAMP - CHAUDUN, A. - The effect of neutral salts in the hydrolysis of sugars by dilute acids. I. Action of alkali chlorides on the inversion of sucrose by hydrochloric acid. Compt. rend. 242: 690 - 92, 1956. (c. f. Chem. Abs. 50: 8301, 1956).
33. DUBOURG, J. & DEVILLERS, P. - Maillard reaction. Bull. soc. chim. France 333 - 36, 1957.
34. KAMADA, H. & SAKURAI, Y. - Browning reaction of amino acid-sugar mixture under mild conditions. Shokuryo Kenkyusho Kenkyu Hokoku (12): 51 - 4, 1957. (c. f. Chem. Abs. 57: 6377, 1962).
35. SAIFER, A. & GERSTENFELD, S. - The photometric micro determination of blood glucose with glucose oxidase. J. Lab. Clin. Med. 51: 448 - 59, 1958.
36. CAWLEY, L. P.; SPEAR, F. E. & KENDALL, R. M. T. - Ultramicro chemical analysis of blood glucose with glucose oxidase. Am. J. Clin. Path. 32 (2): 195 - 200, 1959.

37. ELLIS, G. P. - The Maillard reaction. In: WOLFROM, M. L. ed. -
Advances in Carbohydrate Chemistry. New York, Academic Press.
1959. V. 14, p. 63 - 134.
38. SHALLENBERGER, R. S.; SMITH, O. & TREADWAY, R. H. - Role of the
sugars in the browning reaction in potato chips. Agr. Food Chem.
7 (4): 274 - 76, 1959.
39. STENBERG, R. J. & GEDDES, W. F. - Accelerated browning in starch
pastes containing various bread ingredients. Cereal Chem. 37:
623 - 37, 1960.
40. POMERANZ, Y.; JOHNSON, J. A. & SHELLENBERGER, J. A. - Effect of
various sugars on browning. J. Food Sci. 27 (4): 350 - 54, 1962.
41. HODGE, J. E.; FISHER, B. E. & NELSON, E. C. - Dicarboxyls,
reductones, and heterocyclies produced by reactions of reducing
sugars with secondary amine salts. Am. Soc. of Brewing Chem.
Proc. 84 - 92, 1963.
42. REYNOLDS, T. M. - Chemistry of monenzymic browning. I. The reaction
between aldoses and amines. In: CHICHESTER, C. D.; MRAK, E. M.
& STEWART, G. F. eds. Advances in Food Research. New York,
Academic Press. 1963 V. 12, p. 1 - 52.
43. BRUNER, R. L. - Determination of reducing value. 3,5 -
dinitrosalicylic acid method. In: WHISTLER, R. L. ed. Methods
in Carbohydrate Chemistry. New York, Academic Press. 1964. V.4,
p. 67 - 71.
44. GLUCOSTAT^(R) - For the enzymatic determination of glucose.
Worthington Biochemical Corp., Freehold, New Jersey 07728, U.S.A.

45. TIMELL, T. E. - The acid hydrolysis of glycosides. I. General conditions and the effect of the nature of the aglycon. Can. J. Chem. 42 (6): 1456 - 72, 1964.

46. _____ Studies on non-enzymic browning. CSIRO. Division of Food Preservation. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. Sydney, Australia. Annual report 1964 - 1965, p. 13 - 15.

47. KOSHY, R. T.; DUVALL, R. N.; TROUP, A. E. & PYLES, J. W. - Factors involved in the browning of spray-dried lactose. J. Pharm. Sci. 54 (4): 549 - 54, 1965. (c.f. Chem. Abs. 63: 438, 1965).

48. NAKAZAWA, T. & TAMAKI, Y. - Browning reaction of carbohydrate; effect of phosphoric acid on the sugar solution. Nippon Daigaku Kogaku Kenkyusho Iho 27: 209 - 12, 1965. (c. f. Chem. Abs. 63: 10223, 1965).

49. REYNOLDS, T. M. - Chemistry of nonenzymic browning. II. In: CHICHESTER, C. O.; MRAK, E. M. & STEWART, G. F. Advances in Food Research. New York, Academic Press 1965. V. 14, p. 167 - 283.

50. RICHARDS, E. L. - Degradation of lactose by interaction with casein. Australian J. Chem. 18 (19): 1471 - 75, 1965.

51. GOTO, K. & HYOMO, M. - Catalytic action of several metallic ions for hydrolysis of lactose. Nippon Kagaku Zasshi 86 (4): 396 - 98, 1965. (c. f. Chem. Abs. 64: 6731b, 1966).

52. VUKOV, K. - Kinetic aspects of sucrose hydrolysis Intern. Sugar J. 67 (793): 172 - 75, 1965.

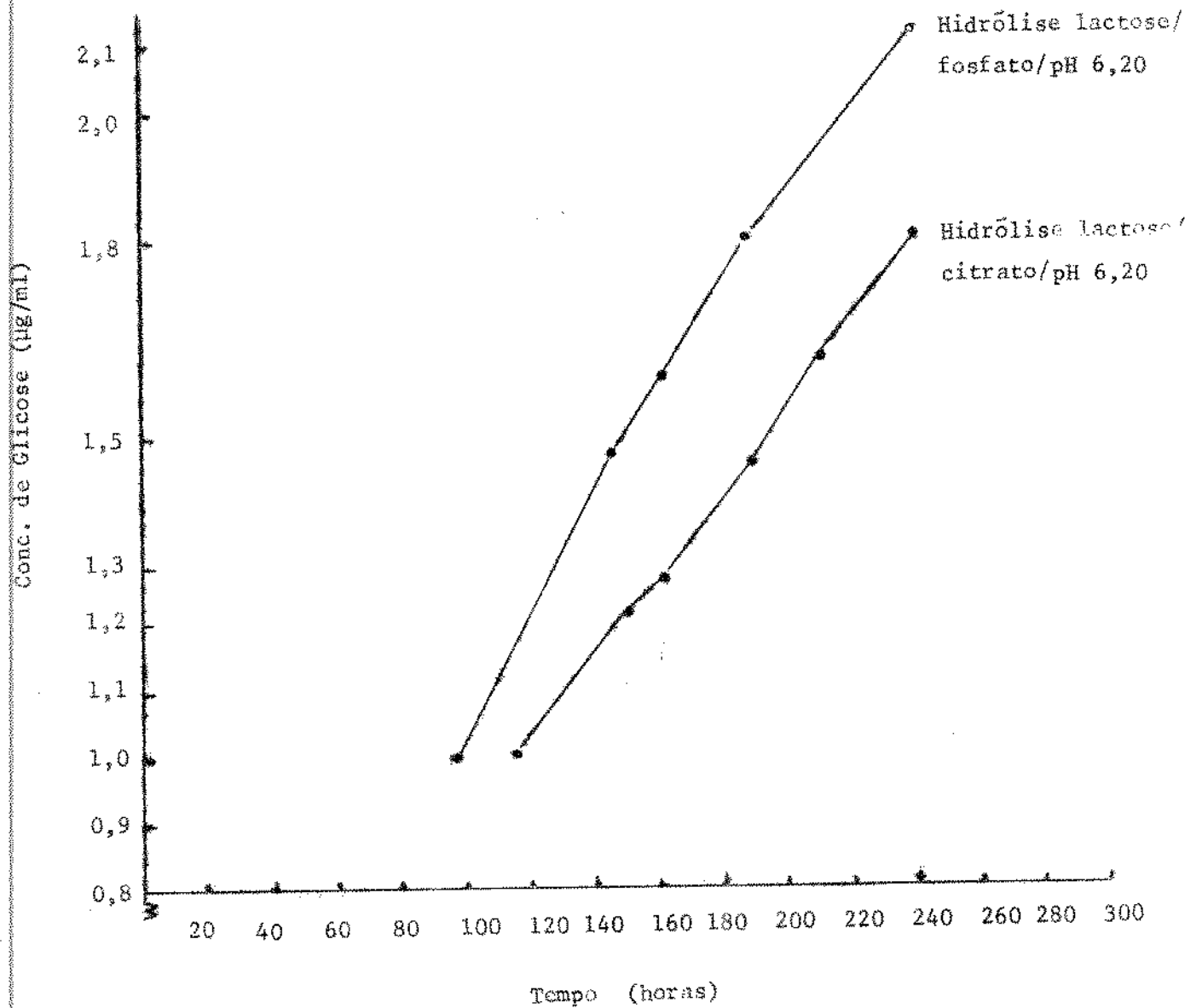
53. COLE, S. J. - The Maillard reaction in food products. Carbon dioxide production. J. Food Sci. 32 (3): 245 - 250, 1966.

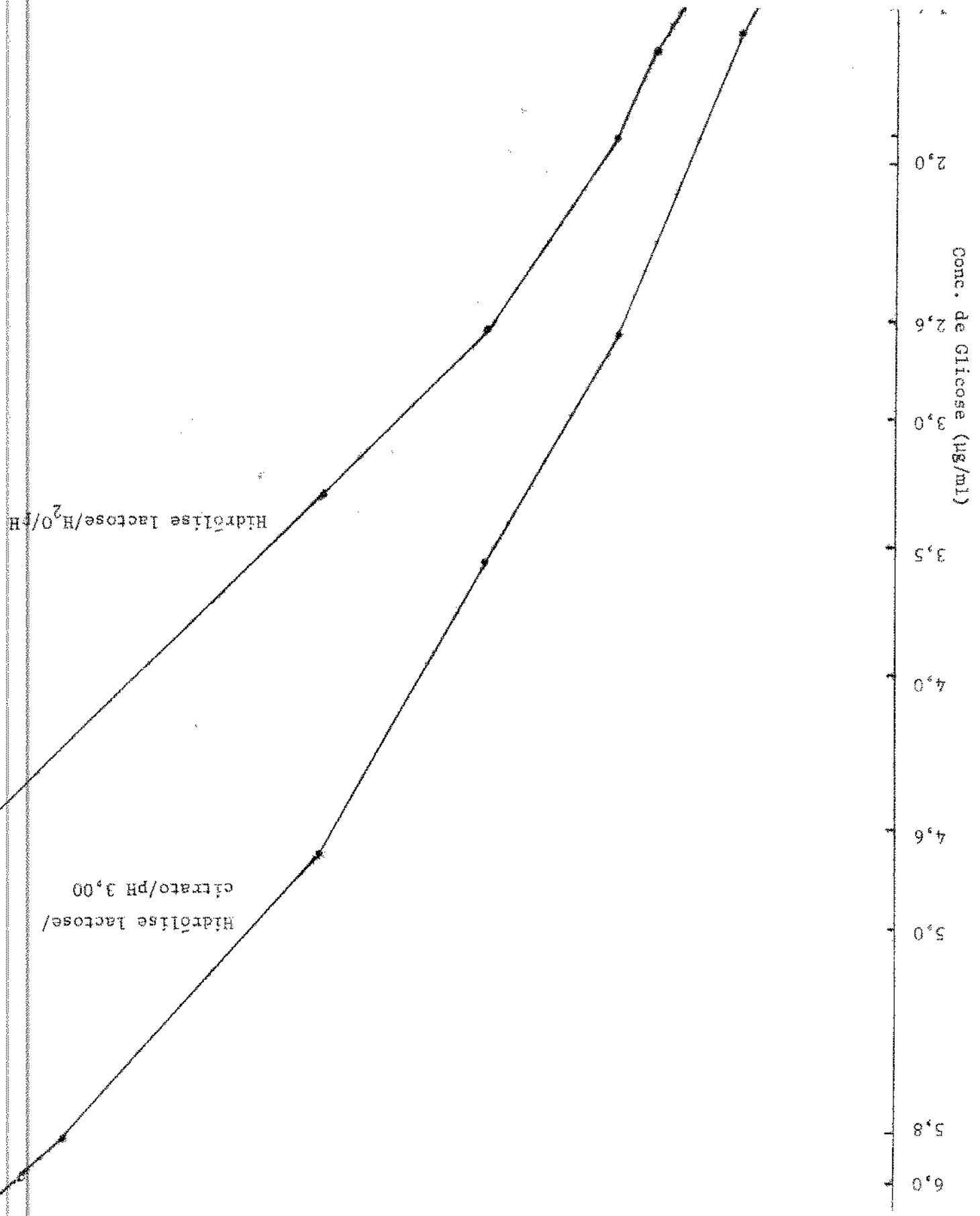
54. DAWBER, J. G.; BROWN, D. R. & REED, R. A. - Acid catalyzed hydrolysis of sucrose. *J. Chem. Educ.* 43 (1): 34 - 5, 1966.
55. EL'ODE, K. E.; DORNSEIFER, T. P.; KEITH, E. S. & POWERS, J. J. - Effects of pH and temperature on the carbonyls and aromas produced in heated amino acid - sugar mixtures. *J. Food Sci.* 31 (3): 351 - 58, 1966.
56. SAUNDERS, J. & JERVIS, F. - The rôle of buffer salts in non-enzymic browning. *J. Sci. Food Agric.* 17 (6): 245 - 49, 1966.
57. AFANAS'EV, V. A. & GORYKOVA, V. I. - Catalytic activity of nitrogen - containing compounds and polyhydric phenols in the hydrolysis of sucrose. *Inst. Org. Khim., Akad. Nauk Kirg SSR* 1967, 19 p.p. (RUSS). From Ref. Zh., Khim. 1968, Abstr No. 7Zh 451. (c. f. Chem. Abs. 60: 52442 q, 1968).
58. LANGER, E. H. & TOBIAS, J. - Isolation and characterization of ether - soluble sugar-amino acid interaction products. *J. Food Sci.* 32 (5): 495 - 502, 1967.
59. ROONEY, LL. W.; SALEM, A. & JOHNSON, J. A. - Studies of the carbonyl compounds produced by sugar - amino acid reactions. I. Model systems. *Cereal Chem.* 44 (5): 539 - 50, 1967.
60. MARCUS, K. & LABUZA, T. P. - Nonenzymic browning in model systems containing sucrose. *J. Agr. Food Chem.* 16 (5): 717 - 19, 1968.
61. SCHOEBEL, T.; TANNENBAUM, S. R. & LABUZA, T. P. - Reaction at limited water concentration. I. Sucrose hydrolysis. *J. Food Sci.* 34 (4): 324 - 29, 1969.
62. FREIMUTH, U. & TRUEBSBACH, A. - Maillard reaction. I. Reaction of β -lactoglobulin with lactose in the dry state. *Nahrung* 13 (3): 199 - 206, 1969.

63. _____ & _____ Maillard reaction. II.
Physicochemical changes of β -lactoglobulin after reaction with
lactose in the dry state. *Nahrung* 13 (3): 207 - 14, 1969.
64. EOPECHINO, A. A. & LEEDER, J. G. - Flavor modifications produced
in ice cream mix made with corn syrup. 2. CO_2 production
associated with the browning reaction. *J. Food Sci* 35: 398-402,
1970.
65. FERRETI, A.; FLANAGAN, V. P. & RUTH, J. M. - Nonenzymatic
browning in a lactose-casein model system. *Agr. and Food Chem.*
18 (1): 13 - 18, 1970.
66. KARL, N. H. & WIROTAMA, I. P. G. - Lactose hydrolysis. Z.
Lebensm. - Unters. - Forsch. 143 (2): 93 - 5, 1970. (c. f. *Chem.*
Abs. 73 (21): 108424n, 1970).
67. TATEO, F. - Sucrose inversion speed and HMF formation. 1.
Quantitative study of the phenomenon in citric acid. *Ind. Aliment.*,
Pinerolo, Italy, 9 (64): 63 - 7, 1970.
68. BARNETT, J. W. & O'CONNOR, CH. - Solvent effects on the acid-
catalyzed inversion of sucrose. *J. Chem. Soc. B* (6): 1163 - 65,
1971.
69. BOBBIO, P. A. - Escurecimento não enzimático em alimentos - reação
de Maillard. Campinas S.P., 1971. 88p. Tese (Livre Docência) -
Faculdade de Tecnologia de Alimentos - UNICAMP.
70. FERRETI, A. & FLANAGAN, V. P. - Lactose casein (Maillard)browning
system: volatile components. *J. Agr. Food Chem.* 19 (2): 245 -
49, 1971.
71. POWELL, R. C. & SPARK, A. A. - Effects of zirconium and aluminium
compounds and pH on the Maillard reaction. *J. Sci. Food Agr.*
22 (Nov.): 596 - 99, 1971.

G R Á F I C O S

GRÁFICO 1





Y-axis label (rotated)

X-axis label (rotated)

GRAFICO 3

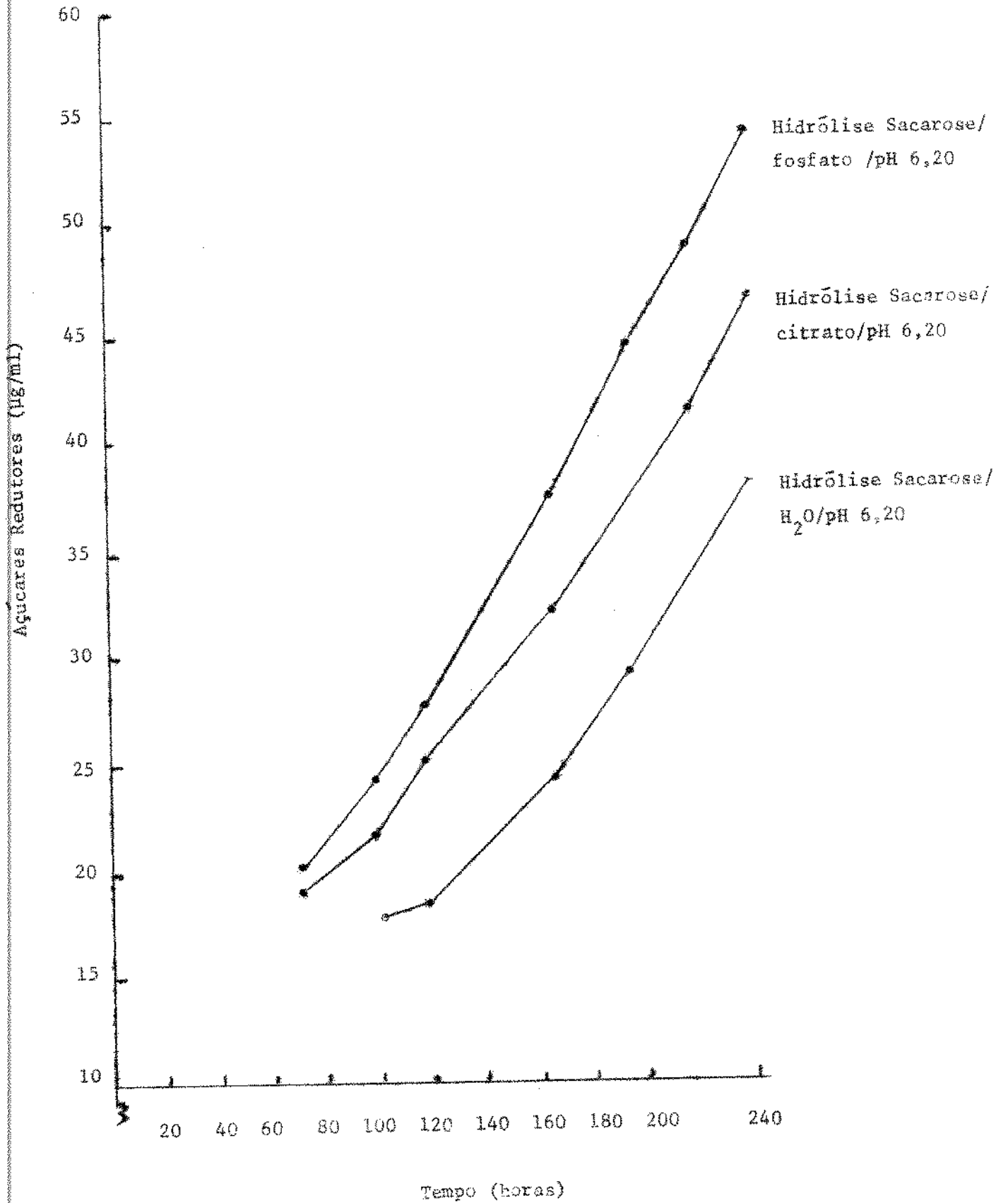


GRÁFICO 4

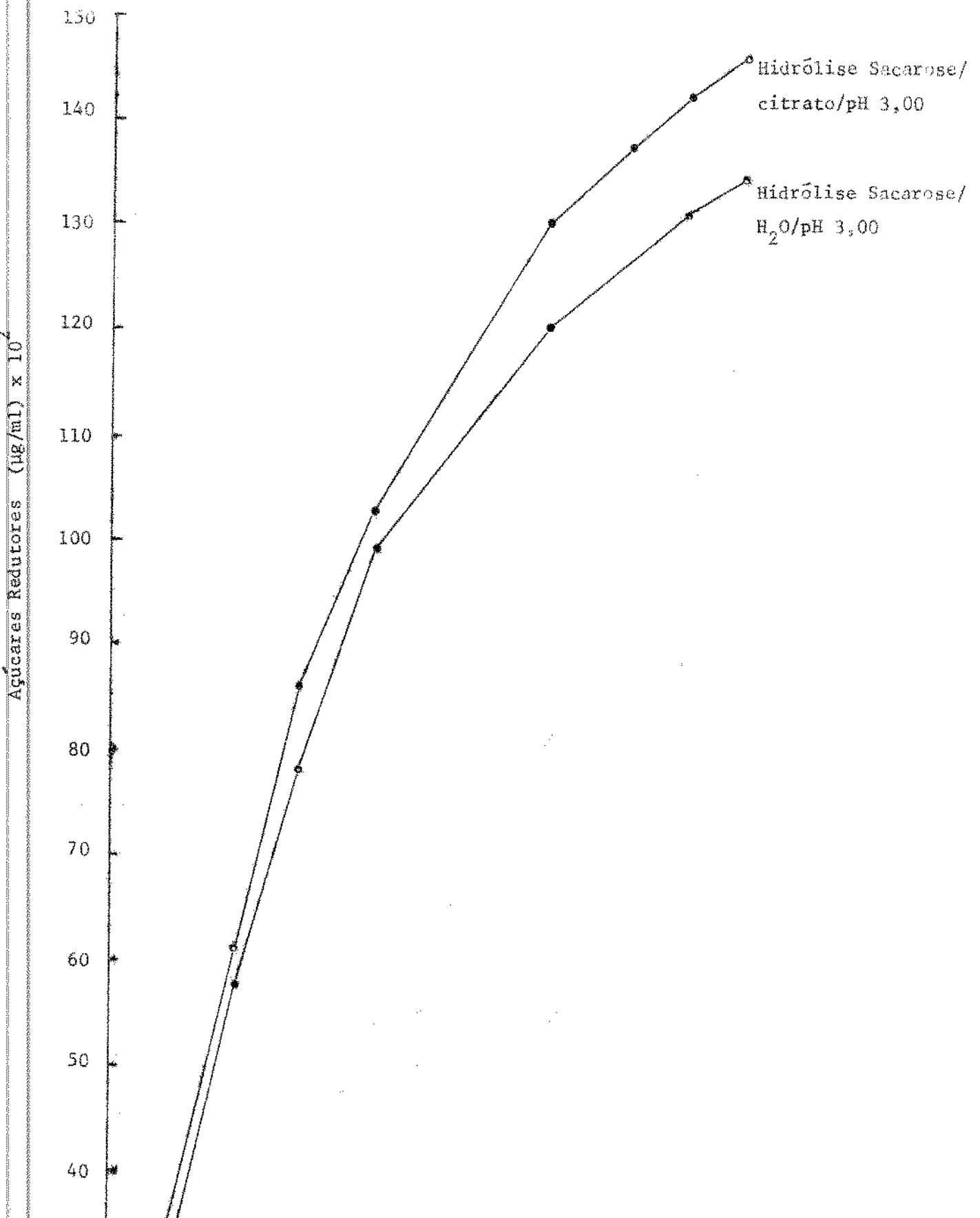
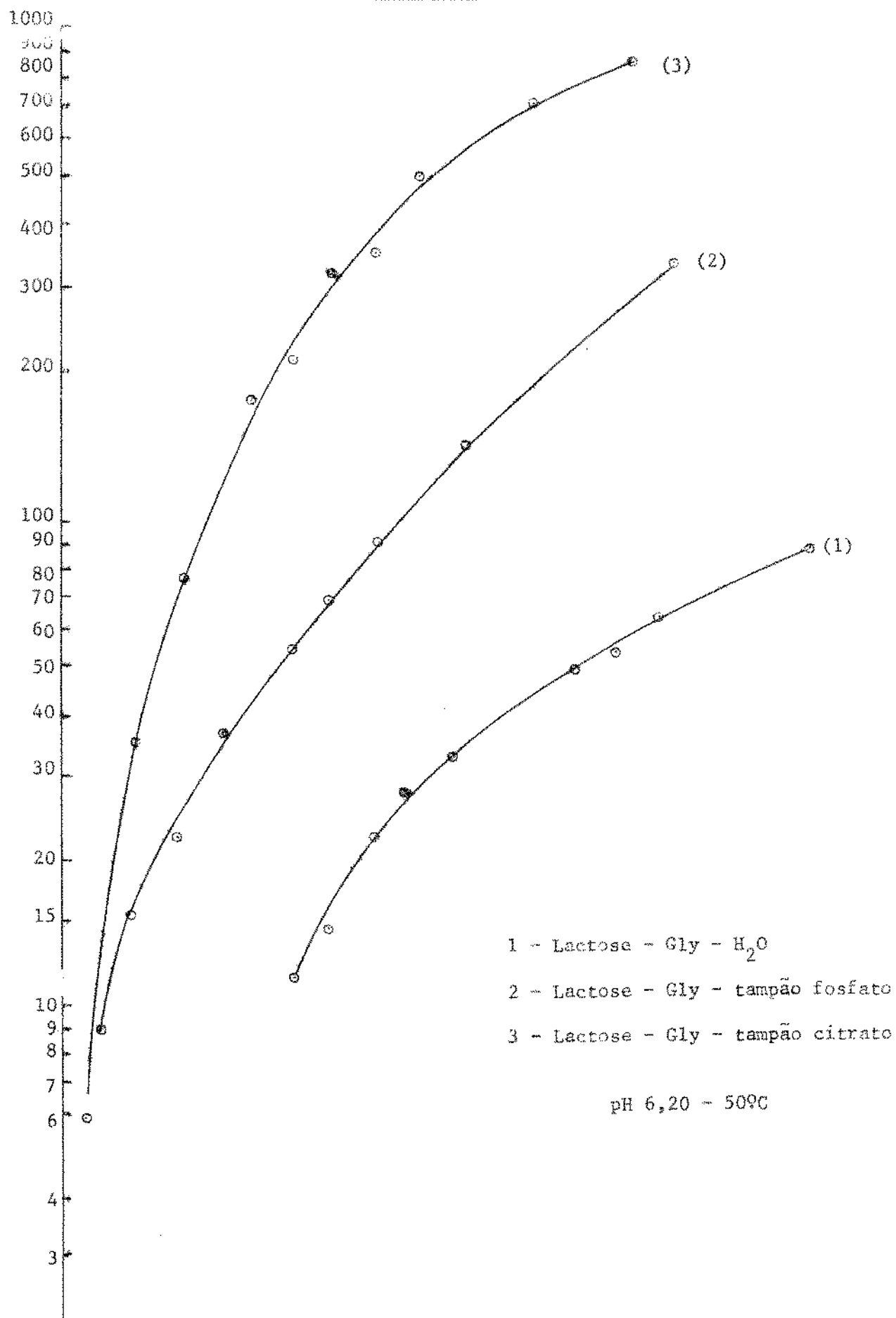


GRÁFICO 5



VI-

Ind. (p. 10)

GRÁFICO 6

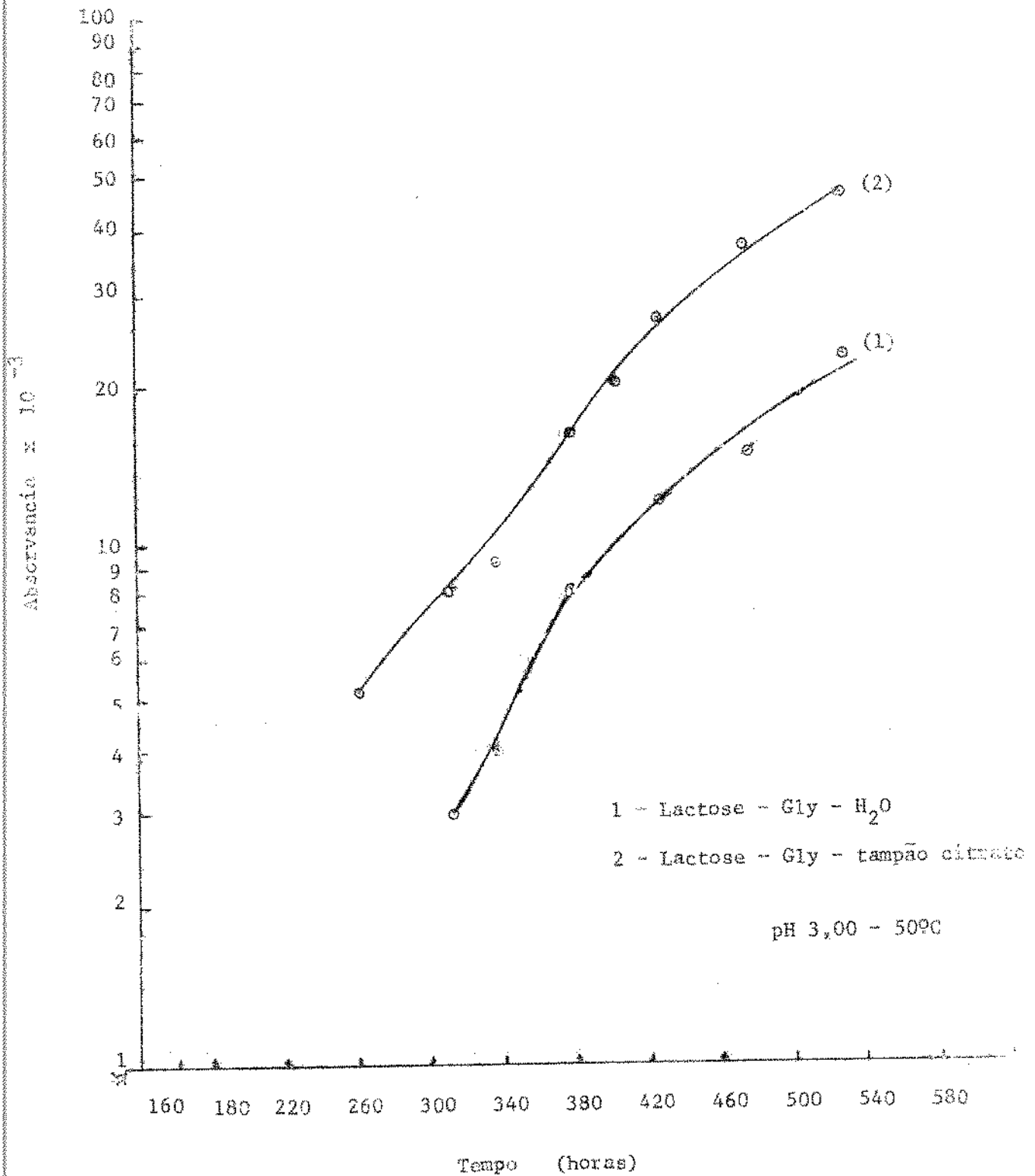


GRÁFICO 7

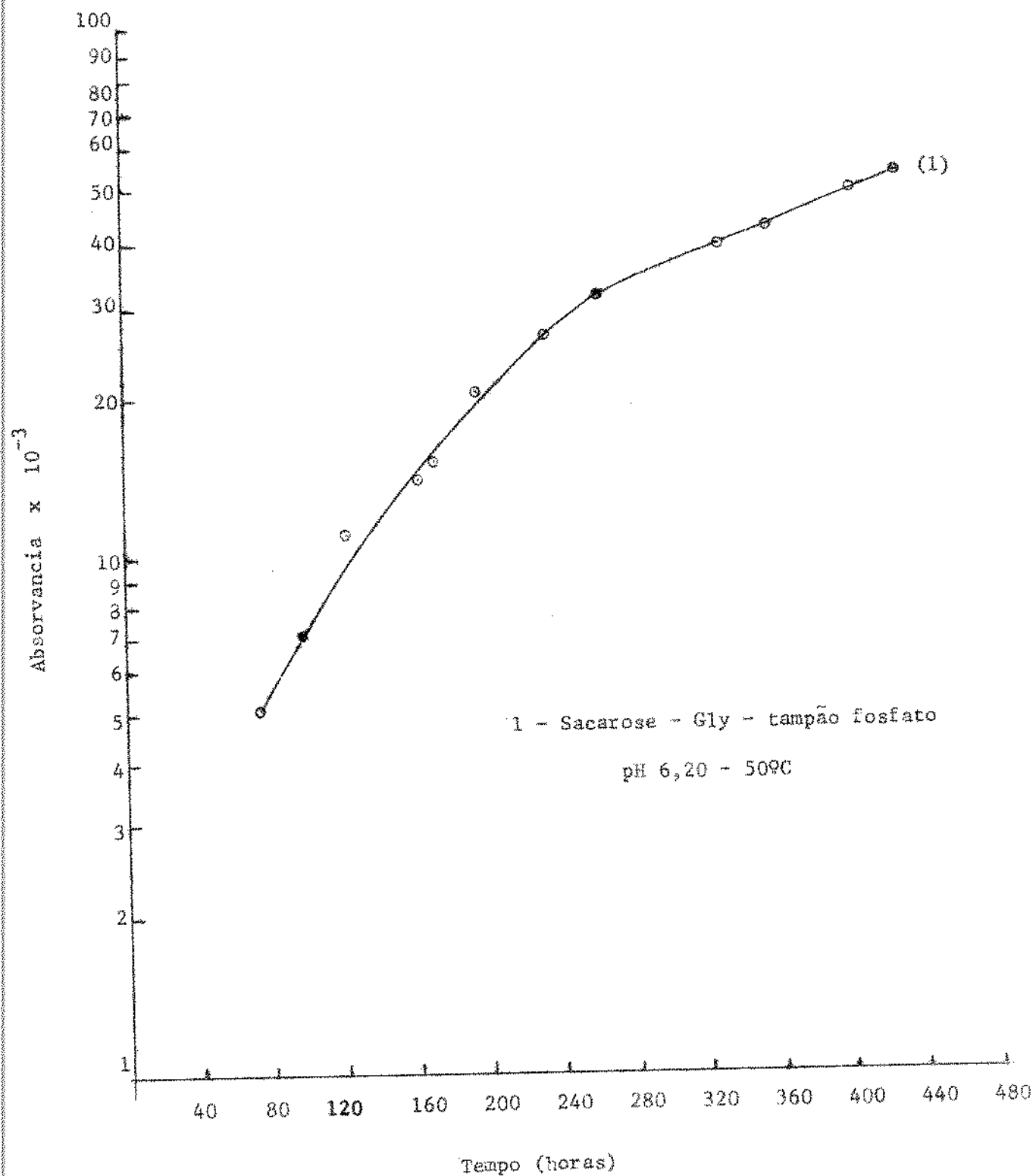
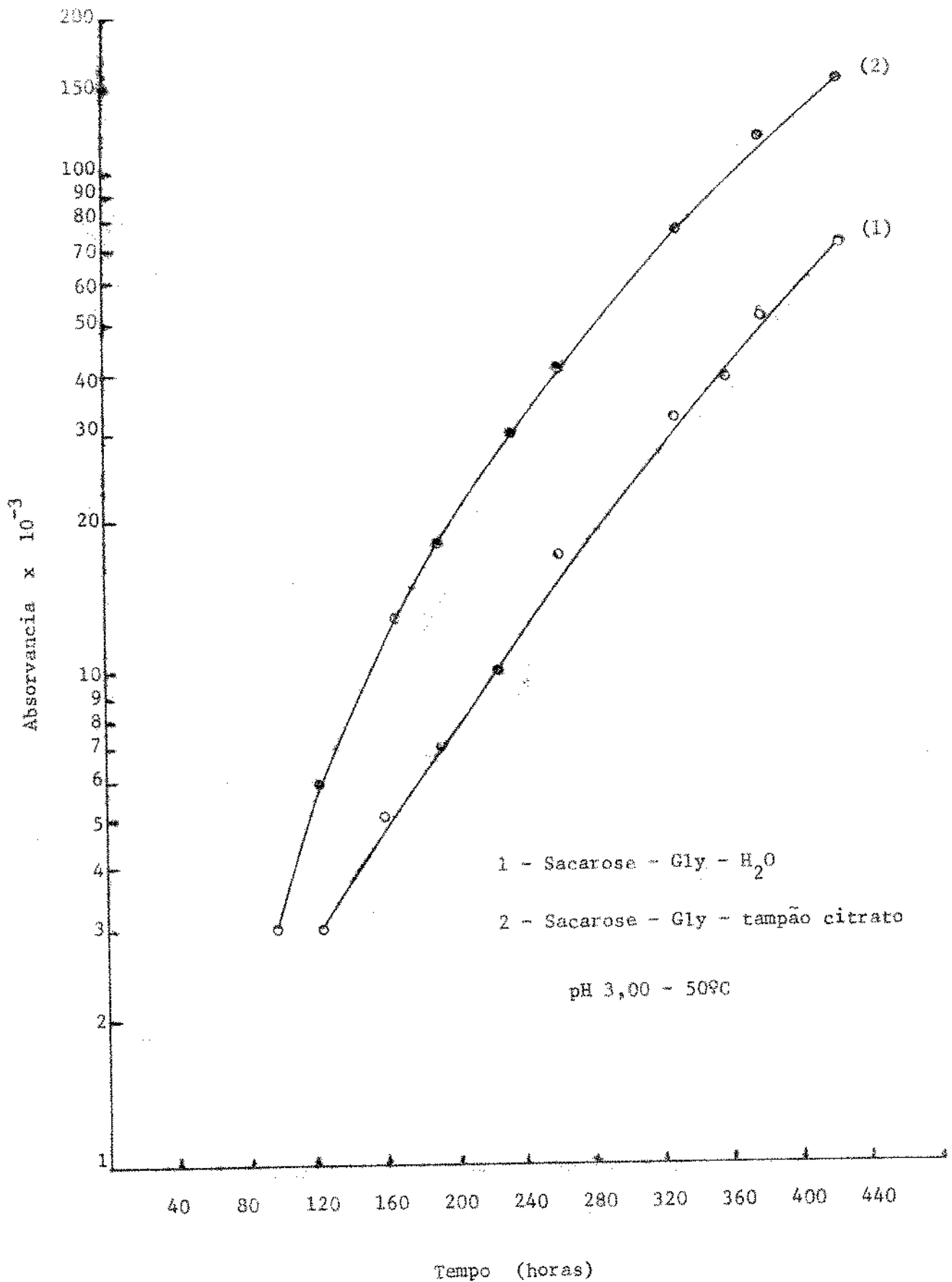


GRÁFICO 8



A P P E N D I C E

APÊNDICE I

Cálculo da constante de hidrólise

$$k = \frac{2,303}{t_2 - t_1} \log \frac{a - x_1}{a - x_2}$$

t_1 e t_2 = tempo

a = concentração inicial do açúcar (g/1000 ml)

x_1 e x_2 = concentração dos produtos de hidrólise (glicose + frutose ou glicose + galactose) em g/1000 ml nos tempos t_1 e t_2 respectivamente.

Cálculo da constante de escurecimento

$$k^* = \frac{D.O._2 - D.O._1}{t_2 - t_1}$$

t_1 e t_2 = tempo

$D.O._1$ e $D.O._2$ = absorvância medida nos tempos t_1 e t_2 respectivamente.

APÊNDICE II

Cálculo do efeito dos ânions na hidrólise:

Lactose/pH 6,2: $k_{\text{fosfato}} = 0,251 \times 10^{-10} / \text{seg}^{-1}$ entre 97h e 240 h
 $k_{\text{citrato}} = 0,205 \times 10^{-10} / \text{seg}^{-1}$ entre 115 h e 240 h

$$\frac{k_{\text{fosf}}}{k_{\text{citrato}}} = \frac{0,251}{0,205} = 1,22$$

Lactose/pH 3,0: $k_{\text{H}_2\text{O}} = 0,272 \times 10^{-10} \text{ seg}^{-1}$ (valor médio)
 $k_{\text{citrato}} = 0,377 \times 10^{-10} \text{ seg}^{-1}$ (valor médio)

$$\frac{k_{\text{citrato}}}{k_{\text{H}_2\text{O}}} = \frac{0,377}{0,272} = 1,39$$

Sacarose/pH 6,2: $k_{\text{H}_2\text{O}} = 0,258 \times 10^{-9} \text{ seg}^{-1}$ entre 117h e 240h
 $k_{\text{fosf}} = 0,349 \times 10^{-9} \text{ seg}^{-1}$ entre 98h e 240h
 $k_{\text{citrato}} = 0,285 \times 10^{-9} \text{ seg}^{-1}$ entre 98h e 240h

$$\frac{k_{\text{fosf}}}{k_{\text{H}_2\text{O}}} = \frac{0,349}{0,258} = 1,35$$

$$\frac{k_{\text{citrato}}}{k_{\text{H}_2\text{O}}} = \frac{0,285}{0,258} = 1,1$$

Sacarose/pH 3,0: $k_{H_2O} = 0,152 \times 10^{-6}$ entre 22h e 98h

$k_{H_2O} = 0,437 \times 10^{-7}$ entre 98h e 240h

$k_{citrat} = 0,152 \times 10^{-6}$ entre 22h e 98h

$k_{citrat} = 0,536 \times 10^{-7}$ entre 98h e 240h

$$\frac{k_{citrat}}{k_{H_2O}} = \frac{0,152}{0,152} = 1 \text{ entre 22h e 98h}$$

$$\frac{k_{citrat}}{k_{H_2O}} = \frac{0,536}{0,437} = 1,23 \text{ entre 98h e 240h}$$

APÊNDICE III

Cálculo do efeito dos anions na reação de Maillard

Lactose/pH 6,2: $k^*_{H_2O} = 0,685 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1}$ entre 138h e 446h

$k^*_{fosf} = 3,00 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1}$ entre 90h e 362h

$k^*_{citrat} = 8,06 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1}$ entre 73h e 337h

$$\frac{k^*_{fosf}}{k^*_{H_2O}} = \frac{3,00}{0,685} = 4,38$$

$$\frac{k^*_{citrat}}{k^*_{H_2O}} = \frac{8,06}{0,685} = 11,77$$

$$\frac{k^*_{fosf}}{k^*_{citrat}} = \frac{3,00}{8,06} = 0,37$$

Lactose/pH 3,0: $k^*_{H_2O} = 0,275 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1}$ entre 336h e 528h

$k^*_{citrat} = 0,497 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1}$ entre 310h e 528h

$$\frac{k^*_{citrat}}{k^*_{H_2O}} = \frac{0,497}{0,275} = 1,81$$

Sacarose/pH 6,2: $k^*_{fosf} = 0,387 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1}$ entre 96h e 426h

Sacarose/pH 3,0: $k^*_{H_2O} = 0,868 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1}$ entre 234h e 426h

$k^*_{citrat} = 1,633 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1}$ entre 193h e 426h

$$\frac{k^*_{citrat}}{k^*_{H_2O}} = \frac{1,633}{0,868} = 1,88$$

APÊNDICE IV

Cálculo do efeito do pH na hidrólise:

Lactose: $k_{H_2O} (pH\ 3,0) = 0,272 \times 10^{-10} \text{ seg}^{-1}$ (valor médio)

$k_{citrat} (pH\ 3,0) = 0,377 \times 10^{-10} \text{ seg}^{-1}$ (valor médio)

$k_{citrat} (pH\ 6,2) = 0,205 \times 10^{-10} \text{ seg}^{-1}$ entre 115h e 240h

$$\frac{k_{citrat} (pH\ 3,0)}{k_{citrat} (pH\ 6,2)} = \frac{0,377}{0,205} = 1,84$$

Sacarose: $k_{H_2O} (pH\ 3,0) = 0,152 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1}$ entre 22h e 98h

$k_{citrato} (pH\ 3,0) = 0,152 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1}$ entre 22h e 98h

$k_{H_2O} (pH\ 6,2) = 0,258 \times 10^{-9} \text{ seg}^{-1}$ entre 117h e 240h

$k_{citrat} (pH\ 6,2) = 0,285 \times 10^{-9} \text{ seg}^{-1}$ entre 98h e 240h

$$\frac{k_{H_2O} (pH\ 3,0)}{k_{H_2O} (pH\ 6,2)} = \frac{0,152 \times 10^{-6}}{0,258 \times 10^{-9}} = 589.1$$

$$\frac{k_{citrat} (pH\ 3,0)}{k_{citrat} (pH\ 6,2)} = \frac{0,152 \times 10^{-6}}{0,285 \times 10^{-9}} = 533.3$$

$$\frac{k_{sacarose} (H_2O\ pH\ 3,0)}{k_{lactose} (H_2O\ pH\ 3,0)} = \frac{0,152 \times 10^{-6}}{0,272 \times 10^{-10}} = 5588$$

APÊNDICE V

Cálculo do efeito do pH na reação de Maillard

$$\text{Lactose: } k^*_{\text{H}_2\text{O}} (\text{pH } 6,2) = 0,685 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1} \text{ entre } 138\text{h e } 446\text{h}$$

$$k^*_{\text{citrat}} (\text{pH } 6,2) = 8,06 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1} \text{ entre } 73\text{h e } 337\text{h}$$

$$k^*_{\text{H}_2\text{O}} (\text{pH } 3,0) = 0,275 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1} \text{ entre } 336\text{h e } 528\text{h}$$

$$k^*_{\text{citrat}} (\text{pH } 3,0) = 0,497 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1} \text{ entre } 310\text{h e } 528\text{h}$$

$$\frac{k^*_{\text{H}_2\text{O}} (\text{pH } 6,2)}{k^*_{\text{H}_2\text{O}} (\text{pH } 3,0)} = \frac{0,685}{0,275} = 2,49$$

$$\frac{k^*_{\text{citrat}} (\text{pH } 6,2)}{k^*_{\text{citrat}} (\text{pH } 3,0)} = \frac{8,06}{0,497} = 16,2$$

AGRADECIMENTOS

Somos gratos à Organização dos Estados Americanos pela concessão de uma bolsa de estudos através do Programa Multinacional de Tecnologia de Alimentos.

Ao Professor André Tosello agradecemos as facilidades que permitiram a realização deste trabalho.

Nossa gratidão ao orientador desta Tese, Professor Paulo A. Bobbio.

Agradecemos a colaboração de todos os colegas e funcionários da Faculdade de Tecnologia de Alimentos pela colaboração prestada.