

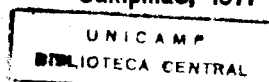
PAULO A. BOBBIO

Bacharel em Química
Professor Colaborador Contratado
Universidade Estadual de Campinas

**ESCURECIMENTO NÃO ENZIMÁTICO EM
ALIMENTOS - REAÇÃO DE MAILLARD**

Tese apresentada à Faculdade de Tecnologia
de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas
para a obtenção do Título de Livre Docente.

Campinas, 1971



A

FLORA

e

MONICA

ÍNDICE

1 - Introdução	1
2 - Revisão da Literatura	2
3 - Material	27
3.1. - Reagentes	27
3.2. - Aparelhos	27
4 - Métodos	28
4.1. - Efeito do pH 6,2 e 2,2 e de íons citrato sôbre xilose, frutose, glicose, maltose e sacarose	28
4.2. - Efeito de pH 6,2 e 2,2 e de íons citrato sôbre glicina	28
4.3. - Purificação da maltose	29
4.4. - Hidrólise de maltose e de sacarose a 47°C	29
4.5. - Reação de Maillard com maltose e com sa- carose	30
4.6. - Efeito da temperatura	31
4.7. - Reação de Maillard com frutose, glicose e xilose a pH 2,2	33
4.8. - Efeito do íon fosfato a pH 6,2	35
4.9. - Efeito do íon citrato a pH 6,2	36
4.10.- Efeito do íon ftalato a pH 6,2	38
4.11.- Efeito da concentração de íons citrato a pH 6,2	40
4.12.- Efeito do íon ftalato a pH 2,2.	41
4.13.- Efeito do íon citrato a pH 2,2	43
4.14.- Efeito de mistura de tampões citrato e fosfato	44
4.15.- Formação de furfural	45

4.16.- Escurecimento de furfural a pH 2,2 e	
6,2	.46
4.17.- Reação de furfural e glicina a pH 2,2	
e 6,2	.46
4.18.- Formação de 5-hidroximetil-furfural	
(HMF)	.47
4.19.- Escurecimento de 5-hidroximetil-furfu-	
ral (HMF)	.47
4.20.- Reação de HMF e glicina a pH 6,2 e 2,2.	.47
5 - Resultados e Discussão	.49
5.1. - Métodos e Material.	.49
5.2. - Resultados	.53
6 - Resumo e Conclusões	.60
7 - Summary	.63
8 - Referências bibliográficas	.64
9 - Agradecimentos	.68
10 - Gráficos	
1	.69
2	.70
3	.71
4	.72
5	.73
6	.74
7	.75
8	.76
9	.77
10	.78
11	.79
12	.80
13	.81
14	.82

1583

1684

11 - Apêndices

I85

II85

III86

1 - Introdução

A importância da reação de Maillard para a tecnologia de alimentos deve-se a sua incidência generalizada em alimentos industrializados e ao aumento crescente do consumo de tais produtos.

A reação de Maillard que inicialmente foi estudada pelo seu efeito sobre a cor e sabor dos alimentos, é hoje problema nutricional pelos seus produtos, possivelmente tóxicos, e pelo seu efeito negativo sobre o valor proteico dos alimentos em que ocorre.

Tal reação vem sendo estudada há quase 100 anos e o grande número de trabalhos publicados sobre o assunto apresentam consideráveis diferenças nos resultados, e conclusões dos diferentes autores. A complexidade da reação de Maillard e a própria natureza dos alimentos, dificulta o seu estudo diretamente em produtos alimentícios. É porém, possível usar sistemas modelo de carboidratos e amino-ácidos, e estudar a reação evitando-se grande número de variáveis, difíceis de controlar, que teríamos usando os produtos naturais ou industrializados.

As conclusões assim obtidas podem formar um conjunto de dados extrapoláveis para problemas similares em produtos usados para a alimentação.

O objetivo deste trabalho é estudar o efeito de diferentes carboidratos, pH, temperaturas e de ânions na reação de Maillard especialmente, e quando possível, na sua fase inicial, de modo sistemático e comparativo.

2 - Revisão da literatura

As transformações químicas através das quais se dá o escurecimento nos alimentos, são hoje comumente denominadas de reação de Maillard, nome proveniente do primeiro pesquisador que realizou uma investigação sistemática dessas transformações. MAILLARD (1, 2 e 3) em 1912 e em anos subsequentes, publicou os resultados de seus estudos demonstrando que amino-ácidos e açúcares reductores podiam ser responsáveis pelo escurecimento não enzimático de alimentos. MAILLARD aqueceu soluções aquosas 0,5M de glicina, alanina, valina, leucina, tirosina, sarcosina e ácido glutâmico, com soluções 3M de glicose a diferentes temperaturas e pH. As temperaturas variavam de 34^{da} a 150^oC e os pH variavam de 3,2 a 6,1. Através da observação da intensidade da cor em cada reação, MAILLARD avaliou o andamento da reação. Com esse processo o autor estabeleceu a seguinte série decrescente de reatividade de amino-ácidos em relação à glicose: alanina, valina, glicina, ácido glutâmico, leucina, sarcosina, tirosina. Em reações de diferentes açúcares com glicina, a ordem decrescente de reatividade segundo o autor, foi: xilose, arabinose, frutose, galactose, manose, glicose, lactose e maltose. Com sacarose mesmo após 4h de reação, não houve formação de cor. MAILLARD estava interessado no processo de formação de ácidos húmicos através da reação entre açúcares e amino-ácidos, isto é, pigmentos pretos denominados melanoidinos por SCHNIEDDERBERG (4); assim em seus trabalhos, MAILLARD visava em primeiro lugar a obtenção e estudo dos pigmentos e consequentemente as técnicas de

preparação e observação empregadas são relativamente drásticas e imprecisas.

Procurando estudar a reação de Maillard, evitando a observação pura e simples da cor desenvolvida, GRUBBUT e WHEEL (5), em 1921, determinaram a rotação ótica específica de misturas contendo amino-ácidos e açúcares. Foram usadas soluções aquosas 0,125M em relação a cada componente e as misturas foram repetidamente evaporadas a seco. Usando como medida da reação a variação da rotação ótica específica, os autores estabeleceram a seguinte ordem decrescente de reatividade para os carboidratos: arabinose, glicose, galactose e frutose. Dos amino-ácidos, o ácido glutâmico mostrou-se mais reativo do que a glicina.

HEUBERG e KOELL (6) e HEUBERG e SINGL (7), publicaram os resultados de suas investigações sobre a reação de Maillard entre 1925 e 1927. Foi usada polarimetria para medir a reação entre soluções de frutose, glicose e maltose numa concentração variável de 0,5 a 1,5M e soluções aquosas de alanina, ácidos glutâmico e aspártico (0,5 a 1,0M) e arginina (0,33M).

As reações foram feitas à temperatura ambiente e o pH inicial de cada reação foi corrigido para 7, exceptuando-se a alanina onde o pH não foi corrigido. O critério de HEUBERG et al., para medir a reação apresenta pelo menos uma grande dificuldade, que é a pequena variação da rotação ótica das soluções. Esses valores variaram entre 0,01 e 0,90° com excepção da frutose onde essa variação ficou entre 3,05 e 3,47°. Os resultados dos referidos autores, indicam que a frutose seria mais rea

tiva do que glicose.

VON EULER e JOSEPHSON (8), em 1926, também usaram polarimetria como medida da reação entre glicina e glicose em solução aquosa 1M, a temperatura ambiente e com pH variando de 5,9 a 9,6.

Após aproximadamente 12h de reação a variação encontrada para a mistura a pH 8,4 foi de somente 1,31% e após 24h a pH 9,6 de 6,75%. Para pH inferiores a 8,4 a variação foi ainda menor. VON EULER e JOSEPHSON verificaram que glicose pura a pH 8,3 não apresentava alteração de rotação ótica após 24h à temperatura ambiente.

Usando o método de VAN SLYKE (9) para medir o nitrogênio amínico, BORSOOK e WASTENEYS (10) estudaram a reação entre glicose (0,05M) e glicina (0,06M) a 37°C. Usando tampão de fosfato para corrigir o pH a 7,8 os referidos autores verificaram uma perda máxima do nitrogênio amínico de uma solução de glicina pura, a pH 11,0 não sofreu alteração após 48h a 37°C.

A reação entre amino-ácidos e açúcares em meio alcalino foi estudada por WATANABE (11) que usou soluções 0,05M de glicose e 0,03M de alanina em tampão fosfato a 50°C e com pH variando de 9,2 a 11,9. WATANABE acompanhou o andamento da reação pela determinação de carboidratos redutores e do nitrogênio amínico nas diversas reações. Após 7h a pH 9,2, 25,7% da glicose e 25,3% da alanina haviam sido transformadas. A pH 10,4 as perdas foram respectivamente de 76,1 e 39,9%. Após 2h de reação a pH 11,9 foi verificada uma perda de 15,8% de amino-ácido e 92,3% de glicose. Soluções puras de glicose nas mesmas condições sofreram as seguintes transformações em

relação ao teor original: a pH 9,2: 25,7%; a pH 10,4: 77,8%; a pH 11,9: 97,9%.

FRANKEL e KATCHALSKY (12), em 1937, estudaram a reação entre vários açúcares (aldoses, cetoses, dissacarídeos) e, amino-ácidos através de medidas potenciométricas e também através do volume de NaOH 0,1N que deveria ser adicionado à reação para manter o pH inicial. Os valores do pH inicial variaram entre 4,0 e 11,0.

Os autores consideraram que a reação deve-se dar na proporção de 1 mol de açúcar para 1 mol de amino-ácido. A reação de combinação do grupo amina do amino-ácido com o grupo carbonilo do açúcar deveria provocar uma diminuição de pH e a curva de variação de pH deveria apresentar um máximo. Os autores constataram que a frutose, sacarose e refinose não reagiram com glicina ou alanina e concluíram que só aldoses reagem com amino-ácidos. A faixa de pH onde ocorreu a reação variou para cada tipo de carboidrato e amino-ácido, mas está dentro dos limites 4,5 - 11,0. A ordem decrescente de reatividade observada foi: carboidratos cíclicos, monossacarídeos e dissacarídeos redutores.

Foram observadas reações em pH neutros, fracamente ácidos e fracamente alcalinos; a pH 11,0 a reação foi inibida. Os autores mostraram a possibilidade de que a pH alcalina ocorra outra reação não envolvendo o amino-ácido e portanto não alterando sensivelmente o pH do sistema. Os produtos dessa reação, compostos redutores, reagiram com os amino-ácidos dando produtos de cor escura. Em trabalhos subsequentes (13 e 14), FRANKEL e KATCHALSKY estudaram a cinética da reação e verificaram que a diminuição do pH variava com a concentração dos reagentes nos

sistemas usados e era proporcional à concentração de ni trogênio amínico. No intervalo de pH entre 7,0 e 9,0 a constante de equilíbrio da reação binolecular é prática mente independente das variações de concentração dos reagentes. As porcentagens de amino-ácido e de açúcar combinados no ponto de equilíbrio eram pequenas quando o pH da reação era menor do que o ponto isoeletrico do respectivo amino-ácido. Essa porcentagem aumentava com o pH, atingindo valor máximo a pH alcalino. Para glicina e glicose esse pH é aproximadamente 10,0.

A cinética da reação de escurecimento foi também estudada por HAUGAARD et al. (15). Este trabalho é baseado na hipótese de que há formação de base de Schiff entre o amino-ácido e o açúcar; em seus cálculos os autores admitiram que as constantes de reação deveriam ser calculadas levando em conta a concentração da forma aldeídica do açúcar em diferentes pH, temperaturas e concentrações, mas a determinação desses valores não foi conseguida e portanto os mesmos deixaram de ser considerados. Confirmando deduções anteriores de FRANKEL e RITCHALSKY (12, 13 e 14) HAUGAARD et al. verificaram que o efeito do pH na reação (pH 9,2; 9,6 e 8,65) é dependente do efeito desse pH sobre a ionização do amino-ácido na reação. Os referidos autores concluíram através da cinética da reação binolecular, que a reação de escurecimento seria devida a interação entre os amino-ácidos e os produtos da degradação dos carboidratos em pH alcalino.

O efeito de ácidos carboxílicos sobre a reação de escurecimento foi estudado em 1949 por LEWIS et al. (16) que aqueceram durante 70h a 100°C soluções 0,125M

de vários ácidos orgânicos e de glicose. As experiências foram feitas em atmosfera de nitrogênio. Em cada sistema foi medido o CO_2 produzido e a densidade ótica a 400nm. Os dados foram comparados com os valores obtidos de uma mistura de glicose e glicina nas mesmas condições. As reações foram feitas a pH 7,2 corrigido com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico. Os autores verificaram que não há uma correlação direta entre intensidades da cor e produção de CO_2 . Dos ácidos usados, acético, oxálico, fúmarico, cítrico, tartárico e láctico, o que produziu maior intensidade da cor foi o ácido cítrico, superior a glicina; ácido láctico produziu a maior quantidade de CO_2 mas menos de 50% da coloração produzida por ác. cítrico.

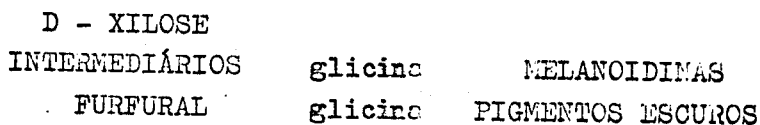
Os mesmos autores (16) estudaram o efeito do oxigênio sobre a reação entre glicose e glicina, e entre glicose e os ácidos láctico, cítrico e acético a um pH inicial de 7,2. Com glicina em presença de oxigênio os autores observaram que a intensidade da cor era praticamente 100% maior do que o valor obtido em atmosfera de nitrogênio. Com os demais ácidos o aumento só pode efetivamente ser medido a comprimentos de onda acima de 500nm. Disso LEWIS et al. (16), concluíram que o efeito do oxigênio na reação entre carboidratos e ácidos orgânicos, faz-se sentir mais na alteração da estrutura dos pigmentos do que na aceleração da fase inicial da reação de escurecimento.

LIVINGSTON (17) em 1953, aqueceu a 60-70°C soluções de glicose, frutose e sacarose contendo entre outros os seguintes ácidos orgânicos: málico, ascórbico, levulínico, pirúvico, succínico, tartárico e dihidroximalco. Sob as mesmas condições foram feitas reações de

glicose, frutose e sacarose com 5-hidroximetil-furfural. LIVINGSTON verificou que após 48h a reação de escurecimento se dava somente com frutose e ácido málico. Na reação entre frutose e ácido málico formou-se quantidade considerável de 5-hidroximetil-furfural que reagiu com ácido málico, dando escurecimento rápido. Segundo o autor é necessário a presença de um grupo-OH em ao grupo carboxila nos ácidos para que a reação se dê.

Aquecendo soluções equimolares de glicina ou ácido glutâmico e glicose e seus metil derivados, WOLFROM et. al (18), em 1947, concluíram que em pH fracamente alcalino 7,5, obtido com tampão fosfato a reação de escurecimento envolve a enolização e decomposição do açúcar e que a pH 7,3 a reação envolve somente o amino grupo do amino-ácido. A presença de grupos metila na molécula de glicose, produzem inibição da reação de Maillard. Segundo WOLFROM et al. a formação de derivados do furfural precede o escurecimento.

Em novo trabalho TAN e WOLFROM (19) estudaram a formação de melanoidinas a partir de sistemas xilose glicina e de furfural - glicina. Em ambos os sistemas foi observado formação de pigmentos escuros que foram isolados e estudados. Baseados na análise elementar de C,H, N e O, na solubilidade e nos espectros de absorção na região visível e ultra-violeta, os autores sugeriram a semelhança dos produtos obtidos de xilose e do furfural com glicina. TAN e WOLFROM propuzeram o seguinte esquema para explicar a ação do furfural na reação de Maillard:



Segundo WOLFROM e ROONEY (20), misturas de xilose e glicina na proporção de 1 mol : 5 moles, quando aquecidas à 65°C sob nitrogênio, não sofreram escurecimento quando o teor de água é 0% ou acima de 90%. O escurecimento atingiu intensidade máxima com 30% de água na reação. Estas observações foram feitas pela medida da densidade ótica a 400nm em amostras aquecidas durante 4h, 6h e 8h.

WOLFROM et al. (21), estudaram o efeito do pH na reação entre glicina e xilose aquecendo a 100°C e 65°C soluções aquosas equimolares (0,025M) dos reagentes; o pH inicial foi corrigido para valores entre 0,70 e 8,45 com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio e a reação foi seguida pela medida da variação do pH e pela densidade ótica. Segundo WOLFROM et al., há um forte efeito catalítico de bases entre pH 6,5 e 8,5 e uma ação catalítica fraca devida ao solvente ou à base, entre pH 3,0 e 5,0. Abaixo de pH 3,0 há inibição da reação por ácidos. A pH inferiores a 2,0 os autores encontraram consideráveis quantidades de furfural que seria então o responsável pelo escurecimento por polimerização e não por reação com o amino-ácido.

SCHROEDER et al., em 1955 (22), estudaram as reações entre glicose e: glicina, ácido glutâmico, lisina, arginina, valina, leucina e dois peptídios: glicil - valina e glicil - leucina. As condições usadas foram: aquecimento por 30 minutos em autoclave a 120°C. As reações foram feitas usando-se misturas de cada amino-ácido e glicose na relação 1:1 e com cada um dos reagentes separadamente, afim de se verificar se a reação se dava sem

amino-ácido ou sem açúcar.

Para estudar o efeito da água e do pH foram feitas reações a seco e em presença de água e de tampão fosfato. Os autores usaram cromatografia de papel para comparar os produtos da reação e foi determinado o nitrogênio amínico, nos sistemas usados afim de se verificar a intensidade da reação.

Segundo SCHROEDER et al., em base dos resultados analíticos e cromatográficos, a reação a seco provocou diminuição do nitrogênio amínico e diminuição do carbohidrato. Em presença de água, 25ml por amostra, não houve perda de nitrogênio amínico, mas houve decréscimo da glicose. Estudando o efeito do pH, foram feitas reações a pH 6,0; 3,2 e 9,0. Para a reação com lisina foram empregados pH 8,0 e 11,0.

Comparando os resultados obtidos com soluções não tamponadas e com soluções dos componentes puros nas mesmas condições, SCHROEDER et al. concluíram que o escurecimento era devido ao efeito do pH sobre o açucar sem interferência do amino-ácido. Em pH ácido não houve perda de nitrogênio em qualquer das reações, houve porém perda de açúcar e o escurecimento era acompenhado por uma diminuição do pH. Em solução de tampão alcalino foi observado abaixamento do pH, formação de produtos escuros e diminuição de teor de nitrogênio amínico. A intensidade da cor e queda de pH foi semelhante para soluções de glicose pura e solução de glicose e amino-ácido. Baseados nos dados experimentais os autores (22) consideraram que a reação de Maillard e o escurecimento são duas reações distintas e que podem se dar independente-

mente uma da outra, dependendo da temperatura e pH. A reação entre carboidrato e amino-ácido somente se dá em meio alcalino (pH 9,7) e ausência de água. Por outro lado o escurecimento é principalmente devido ao efeito do pH sobre os açúcares que se decompõem dando produtos coloridos mesmo na ausência de amino-ácidos.

SMIRNOV e GEISPIIS (23) constatarem que soluções de glicose e glicina aquecidas a 100°C por 15h apresentavam escurecimento somente quando o pH era superior a 4,0.

Procurando verificar o efeito da água sobre a reação de escurecimento OLCOTT e DUTTON (24) armazenaram misturas de glicose e glicina secas, por vários dias a 50°C. Em nenhuma amostra foi observada alteração de cor. Quando quantidades crescentes de água (2,5 a 10%) foram juntadas às misturas, foi constatado o aparecimento de coloração típica da reação de Maillard. A amostra contendo 10% de água apresentou o escurecimento mais intenso. GRAHAM et al. (25) em 1949, verificaram que soluções de metionina e glicose aquecidas sob pressão a 125°C apresentavam um escurecimento máximo com 8% de água presente na reação. A reação diminuía, pela observação da coloração, quando o teor de água aumentava.

KAMADA e SAKURAI (26), estudando o escurecimento em milho de soja e em sistemas modelo com ácido ascórbico, furfural, glioxal e açúcares redutores concluíram que a reação com glicina e compostos carbonílicos é diferente para cada composto pelo menos na fase inicial e que a formação de furfural e HMF só se dava sob condições de reação drásticas.

WILLIAMS et al. (27) fizeram reagir glicose (0,025M) com ácido glutâmico, alanina e lisina (0,125M) aquecendo as soluções durante 20' a 114°C variando o pH para cada sistema entre 3,0 e 9,0 com tampão fosfato.

A reação foi seguida pela medida da absorbância a 500nm. Nessas condições glicose pura deu uma absorbância de 0,18 a pH 8,0 e 0,48 a pH 9,0. Com alanina e glicose os resultados obtidos foram: absorbância 0,14 0,20 e 0,33 para pH 7,0, 8,0 e 9,0 respectivamente. Com ácido glutâmico a pH 7,0 a absorbância foi 0,02; a pH 8,0 e 9,0 os valores da absorbância 0,12 e 0,50. Com lisina a pH 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0 os valores da absorbância foram 0,16, 0,35, 0,65 e 0,89 respectivamente. Em todos os casos examinados a absorbância máxima correspondia ao pH mais alto.

SCHWINNER e LICOTT (28) fizeram reagir glicina com glicose e frutose em solução de tampão fosfato 0,33M e a pH 6,5 durante 18h a 70°C. Nas mesmas condições foram feitas reações entre glicina e: glicose, frutose-6-fosfato, glicose-1-fosfato, frutose-1,6-difosfato. Segundo os autores, medindo-se a densidade ótica das soluções a 420nm, e atribuindo-se ao sistema glicose-glicina-fosfato valor 100, a glicose-6-fosfato apresentou valor 146 e a frutose-6-fosfato 82, enquanto frutose-glicina-fosfato apresentava uma intensidade de coloração correspondente a 28.

REYNOLDS (29) estudou o efeito de tampão de fosfato e malato sobre o escurecimento de xaropes de glicose ou frutose com 75% de sólidos aos quais foi adicionada glicina na proporção de 8 partes de glicose para

1 parte de glicina. O pH inicial foi de 3,5 e os xaropes foram aquecidos a 50°C durante 10 dias. Pelos resultados obtidos REYNOLDS concluiu que fosfato e malato aceleram a reação de escurecimento em presença de glicina e o aumento de velocidade é proporcional à raiz quadrada da concentração de íons fosfato ($H_2PO_4^-$) e malato ($C_4H_5O_5^-$).

HOLTERMAN (30) em 1963, estudou a reação de Maillard e o efeito do oxigênio sobre a reação usando soluções 0,1M de glicose, frutose e manose com soluções 1M de glicina, alanina e ácidos aspártico e glutâmico. A reação foi feita a 80°C e o pH inicial foi corrigido para 2,3 e 9,6 com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio.

O decorrer da reação foi seguido pela determinação do teor residual de redutores e pela medida da intensidade da cor em colorímetro. Houve boa correlação entre as duas determinações. HOLTERMAN verificou que em meio ácido após 200h o teor de redutores tinha sido reduzido a 85% do inicial e a pH 9,6 após 100h os redutores haviam sido completamente consumidos.

Pelos resultados obtidos HOLTERMAN concluiu que a influência do oxigênio foi praticamente nula. Não foram verificadas diferenças sensíveis no comportamento dos três açúcares a pH 2,3 e 9,6. Segundo o autor, dos açúcares usados, a frutose mostrou-se a mais reativa e aparentemente em meio alcalino a reação predominante é a decomposição do açúcar com formação de produtos de menor peso molecular.

IATC (31) em 1956, fazendo reagir glicina com xilose e glicose, e xilose com N-metil-anilina a pH respectivamente 5,6, 11,6 e 4,4 constatou que o oxigênio não

exerceu qualquer efeito sobre a reação de escurecimento após aquecer as misturas durante 60' a 100°C e acompanhando a reação pela medida de sua densidade ótica a 450nm.

KATO (31) demonstrou que fosfatos aceleram a reação de escurecimento, usando soluções 1/15 de tampão fosfato para fazer a reação entre glicose, xilose, lactose e glicina, alanina e n-butilamina. A ação do fosfato mostrou-se particularmente intensa a pH entre 5,0 e 9,0.

KATO et al. em 1969, (32), em um extenso trabalho, investigou o mecanismo da reação de Maillard usando soluções de frutose e glicose com glicina. Em seu trabalho, os autores examinaram a reação a vários pH iniciais corrigidos com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. Foram também usadas diferentes concentrações de reagentes e foram comparados os efeitos da adição de ânions como fosfato, citrato, acetato e malato. As reações foram feitas a 100°C e o seu andamento seguido por medidas de densidade ótica até um tempo máximo de 5h. Pelos resultados obtidos os autores verificaram que no período inicial da reação o escurecimento era mais intenso na frutose. Em concentrações de glicina superiores a 0,4M a glicose mostrou-se mais reativa do que a frutose.

Ainda KATO et al. (32) usando soluções equimolares de glicose, frutose e glicina (1M), observaram que nas duas primeiras horas a frutose reagiu mais rapidamente do que a glicose. Após 2h a velocidade da reação invertia-se. Nas condições acima os autores verificaram que ao contrário da frutose, a glicose tem um período de indução de aproximadamente 1 hora.

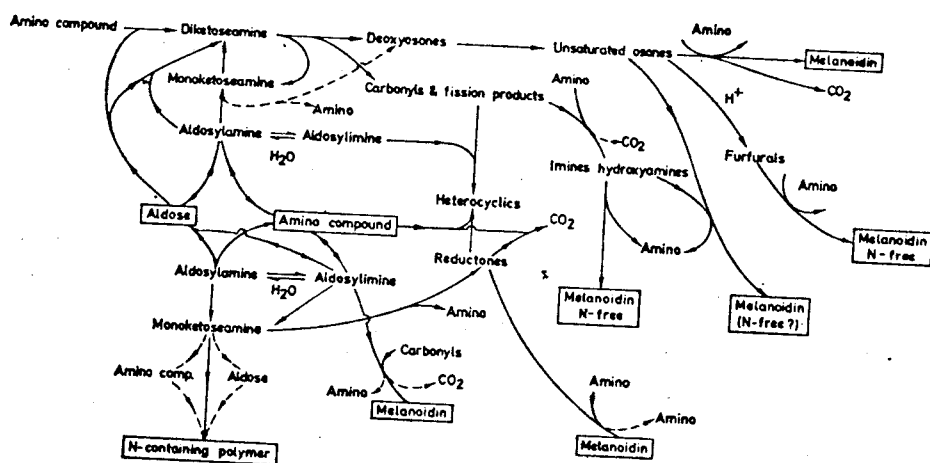
A adição de íons acetato, fosfato, citrato e

malato às soluções de glicose e frutose sem glicina e a pH 5,5 provocou um aumento na velocidade da reação de caramelização dos açúcares. A aceleração foi da ordem de 10 a 20 vezes maior para glicose do que para a frutose. Quando em presença de glicina o efeito dos ânions sobre o escurecimento traduziu-se no aumento da intensidade da reação, mas de modo variável. Assim, ácido acético 0,1M teve praticamente o mesmo efeito sobre glicose e frutose, mas na concentração de 0,5M o efeito sobre a glicose foi duas vezes maior do que aquele sobre a frutose. Ácido cítrico 0,1M mostrou-se mais ativo sobre a glicose do que sobre a frutose, enquanto ácido fosfórico mostrou efeito inverso. Não foi notada qualquer ação sinérgica dos ânions citrato, fosfato e acetato. Por outro lado o efeito maior do ácido acético a pH 5,5 do que 4,0 levou os autores a admitir que o agente catalizador seria o ânion. Pelos resultados obtidos concluíram que o mecanismo de degradação da frutose e o da reação de glicose com glicina apresentavam-se substancialmente diferentes a pH 5,5. Para a frutose, LATH et al. verificaram a formação por caramelização de deoxi-D-eritrohexulose, 5-hidroxi-etil-furfural e aldeído pirúvico. Esses produtos reagiriam ou com amino-ácidos, ou entre si dando em ambos os casos melanoidinas. Segundo os referidos autores a formação de produtos reativos através da enolização em 1,2 seria o caminho principal na degradação da frutose em presença de grupos carboxílicos, mas na glicose o mecanismo seguiria outras vias, possivelmente através da formação de derivados como glicosil-L-amino-ácido.

SHARK (33) em 1969, investigou o efeito dos carboidratos na perda de nitrogênio amínico da glicina. Os açúcares usados por SHARK (33) foram: xilose, manose, galactose, glicose, frutose, sorbose, (todas em concentração 1,25M), sacarose e maltose (concentração 1M). A glicina foi usada na concentração de 0,66M. As reações foram feitas a pH 6,2 em tampões acetados a 50°C, num máximo de 2000h e o escurecimento foi acompanhado pela determinação da densidade ótica a 450mμ. SHARK também determinou a concentração de amino grupos livres pelo método de VAN BLYSS (9). A perda de glicina foi determinada cromatograficamente. Segundo SHARK a reação com sacarose é duas vezes mais rápida do que com maltose e todas os açúcares mostraram um período inicial de indução curto e a ordem decrescente de reatividade foi: xilose, manose, galactose, glicose, sorbose, frutose, sacarose e maltose. Estudando o efeito do pH, o autor adicionou às misturas de açúcares e glicina, soluções tampão de fosfato com pH 6,2 nas concentrações de 5 e 10% do volume da mistura de açúcar e glicina. A adição de tampão acelerou a reação sendo essa aceleração pouco maior com 10% do que 5% de fosfato. Deve-se ressaltar que o efeito do tampão sobre o pH não vai além das primeiras 50h de reação, caindo depois de aproximadamente 150h para 5,1 - 5,2. Após 1500h o pH atinge aproximadamente 4,2. SHARK verificou que a perda de nitrogênio amínico caía rapidamente quando o pH atingia valores próximos de 5. Em seu trabalho SHARK propôs o esquema de reação reproduzido na pg. 17.

BURTON e LO WERY (34) em 1963, observaram que a presença de fosfatos causou um aumento na velocidade da

ESQUEMA DE SPARK (33)



produção de coloração no início da reação entre aldeídos e amino-ácidos. Em soluções de lecitina e amino-ácidos o fosfato retarda a reação. Segundo os referidos autores o íon fosfato diminuiria a estabilidade da aldose no início da reação.

BURTON e MC WEEY (34), relacionaram a fase inicial da reação de Maillard com a maior ou menor concentração da forma acíclica dos açúcares em solução. Assim as pentoses têm maior velocidade de reação pela instabilidade maior da sua forma cíclica. O mesmo princípio seria aplicável à frutose, e os outros citam a glicose como tendo menor velocidade de reação do que frutose inicialmente, mas as fases posteriores da reação seriam dependentes da configuração cis ou trans inicial dos grupos hidroxilas, e que permitiria a formação de hexulosos insaturados com maior ou menor facilidade e então nessa fase a velocidade da reação seria dependente da maior ou menor quantidade de intermediários reativos que se poderia formar.

SAUNDERS e JERVIS (35) em 1966, estudaram o efeito do fosfato e citrato na reação entre glicina e glicose. As reações foram feitas aquecendo as misturas a 120°C durante 2h. As quantidades de glicose e glicina usadas variaram entre 0,0 e 0,5M. As soluções de fosfato usadas eram soluções 0,25M de fosfato de sódio e pH 7,5. As soluções de citrato de sódio empregadas nas experiências tinham concentração variável de 0,0 a 0,5M e pH inicial de 3,0 a 8,0. Pelos resultados obtidos SAUNDERS e JERVIS concluíram que fosfato e citrato têm efeito catalítico pronunciado e o seu efeito é aditivo. Ambos mostram

ram-se ativos em pH ácido e básicos.

SONG e CHICHESTER (36 e 37) em 1966, estudaram a cinética da reação glicose e glicina sob catalizadores e a temperaturas de 53°C, 57°C, 69°C, 80,5°C, 89,5°C e 99°C. Os autores observaram que: 1. durante a reação, hidroximetil furfural acumula-se; 2. a adição de hidroximetil - furfural não eliminou o período de indução; 3. açúcares como tetroses e trioses não podem produzir hidroximetil furfural ou outros furanos e 4. a formação de hidroximetil furfural é muito maior em pH ácido, no qual entretanto a reação de Maillard é retardada.

Assim os autores consideraram que a reação de Maillard não envolveria o hidroximetil furfural e não ser como uma reação secundária enquanto a principal seria devido à produtos α , β - insaturados (reductonas), formados por desidratação da molécula de açúcar.

Os autores consideraram que a reação é dependente de catálise ácido-base. Baseadas na similaridade da ação do pH nas reações entre glicose ou frutose e glicina, concluíram que ambos os sistemas têm o mesmo comportamento em relação à catálise de bases. Segundo SONG e CHICHESTER, a fase inicial compreenderia a transformação da glicopiranosose em glicose acíclica, esta sofrerá um ataque nucleófilo do grupo $-NH_2$ e consequente rearranjo de Amadori. O derivado enolaldimino formado sofreria então desidratação e os produtos formados seriam os intermediários na produção de melanoidina. Os produtos intermediários teriam duplas ligações conjugadas como se depreenderia, entre outras, do fato que a pH alcalino, onde pouco hidroximetil furfural é formado, a absorbência de

sistema glicose-glicina a 283nm, parece ser devido a transição típica de conjugação na cadeia carbônica. A hipótese de BUNG e CHICKENBERR sobre a formação de enolaldeidinas é rejeitada por MC WELLY et al. (38) que contestaram a validade das conclusões de BUNG e CHICKENBERR baseadas nos espectros de absorção.

BURMAN et al. (39) estudando a inibição da reação de Maillard por SO_2 concluíram que o escurecimento provocado por compostos carbonílicos saturados é pouco intenso, enquanto compostos carbonílicos insaturados são os mais ativos. Quando a insaturação conjugada é parte de 1 anel a velocidade de escurecimento diminui.

MC WELLY e BURTON (40) estudando a ação inibidora de SO_2 concluíram que a pH entre 5,5 e 6,0 e a 50°C, o escurecimento através da formação de hidroximetil furfural era muito lento. MC WELLY e BURTON concluíram que com aldoses e amino-ácidos os compostos de Anaduri e seus produtos de decomposição são os responsáveis pela rapidez da reação de escurecimento.

HEYLIS et al. (41) estudaram a reação entre glicose e frutose com glicina e valina, usando soluções 4M de açúcar e 1M de amino-ácido a 65°C. A variação do teor de amino-ácidos e de intermediários foi determinada com analisador automático de amino-ácido.

Segundo HEYLIS et al. os principais produtos da reação, resultantes da combinação do amino-ácido com o grupo carbonílico dos açúcares e resultantes do rearranjo de Anaduri ou Heyns foram os seguintes: de glicose, glicose-glicina (2-desoxi-2-glicina-D-glicose), frutose-glicina (1-desoxi-1-glicina-D-frutose) e difrutose-glicina;

da frutose, glicose-glicina, manose-glicina (2-desoxi-2-glicina-D-manose). A manose-glicina a freu decomposição mais rápida do que as demais compostas.

POHLER et al. (42) estudaram o efeito de vários amino-ácidos e açúcares em biscoitos e em soluções modelo de açúcares e amino-ácidos. A ordem decrescente de reatividade nas pentoses foi: ribose, xilose, arabinose. Os autores não chegaram a conclusão sobre a ordem de reatividade das hexoses, mas verificaram que galactose era a mais reativa. Dissacarídeos redutores reagiram pouco e não redutores não reagiram.

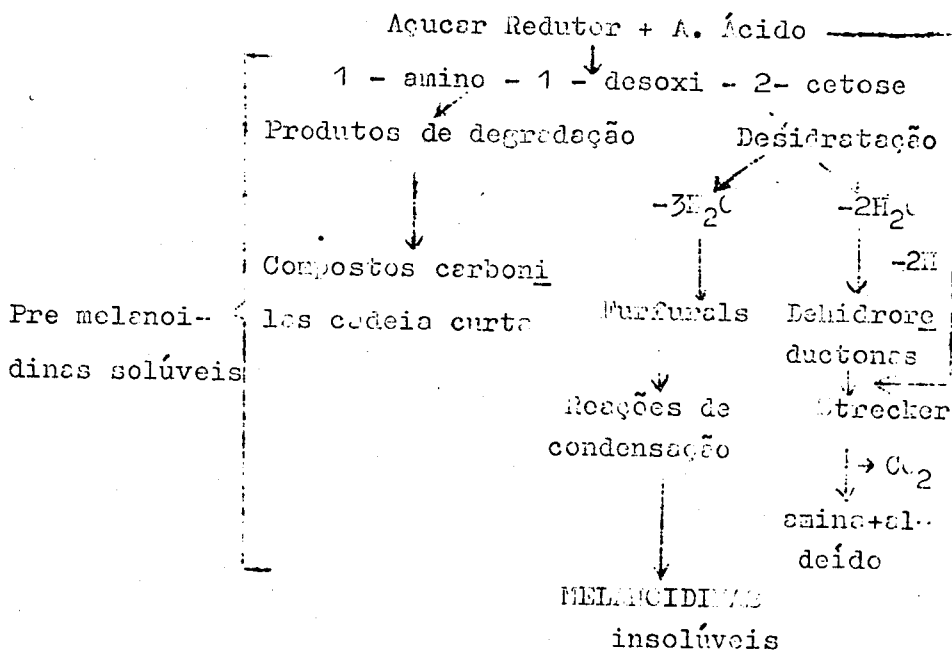
A formação de furfural e de 5-hidroxiacetil-furfural por degradação alcalina de frutose foi verificada por SHAW et al. (43).

TATUM et al. (44) encontraram em suco de laranja desidratado, entre outros compostos, furfural e hidroxiacetil furfural. Os mesmos compostos também foram isolados por TATUM et al. de sistemas modelos com frutose em meio ácido (45).

KANADA e SAKURAI (46), estudaram o escurecimento de misturas de glicina e furfural. Usando soluções com 1% de furfural e 1% de glicina a 20°C e 25°C os autores verificaram que após 20 dias o escurecimento era o mesmo nas duas temperaturas. A 38°C o escurecimento foi três vezes maior. Variando o pH e a temperatura de 38°C, os autores verificaram que a pH de 2,5 a 6,5 o escurecimento aumenta com o pH. Usando soluções a 1% de furfural sem amino-ácido KANADA e SAKURAI verificaram que o escurecimento é lento a pH próximo de 6, mas é mais rápido a pH 9,0.

ARROYO e LILLARD (47), estudando os compostos voláteis produzidos por aquecimento a 100°C de soluções 0,001M de glicose e de cisteína, cistina e metionina identificaram mercaptanos, sulfetos e dissulfetos ao lado de etanal, propanal, propanona e furfural.

Os efeitos fisiológicos dos produtos da reação de Maillard, constituem campo ativo de pesquisa principalmente pelo aumento de consumo de produtos alimentícios já industrializados. LEWIS e ADRIAN (48) entre outros mostraram o efeito da reação de Maillard sobre a lisina e outros amino-ácidos com considerável perda do valor proteico do alimento. Segundo LEWIS e ADRIAN na reação de Maillard formam-se produtos tóxicos não só para microorganismos mas para mamíferos também. Nesse trabalho os referidos autores fazem uma revisão crítica da química da reação de Maillard e propõe o seguinte esquema para a reação.



A importância e principalmente a extrema complexidade do problema da reação de Maillard são testemunhadas pelo número de artigos de revisão publicados em periódicos e na série dos *Advances in Food Research* e *Advances in Carbohydrates*.

O primeiro artigo de revisão sobre a reação de Maillard foi publicado por DUNN e FIDELL (49) e contém um resumo da literatura sobre interação de açúcares e amino-ácidos e proteínas até 1950 sendo a maioria dos trabalhos porém anteriores à 1950.

Em 1953 HODGE (50), restringindo o campo dos trabalhos resumidos, fez a revisão crítica de 201 trabalhos publicados entre 1940 e 1953. Com base em seus próprios trabalhos e em dados da literatura HODGE propôs o esquema representado na página 24 e até hoje ainda usado, para explicar em termos gerais o mecanismo de formação das melanoidinas.

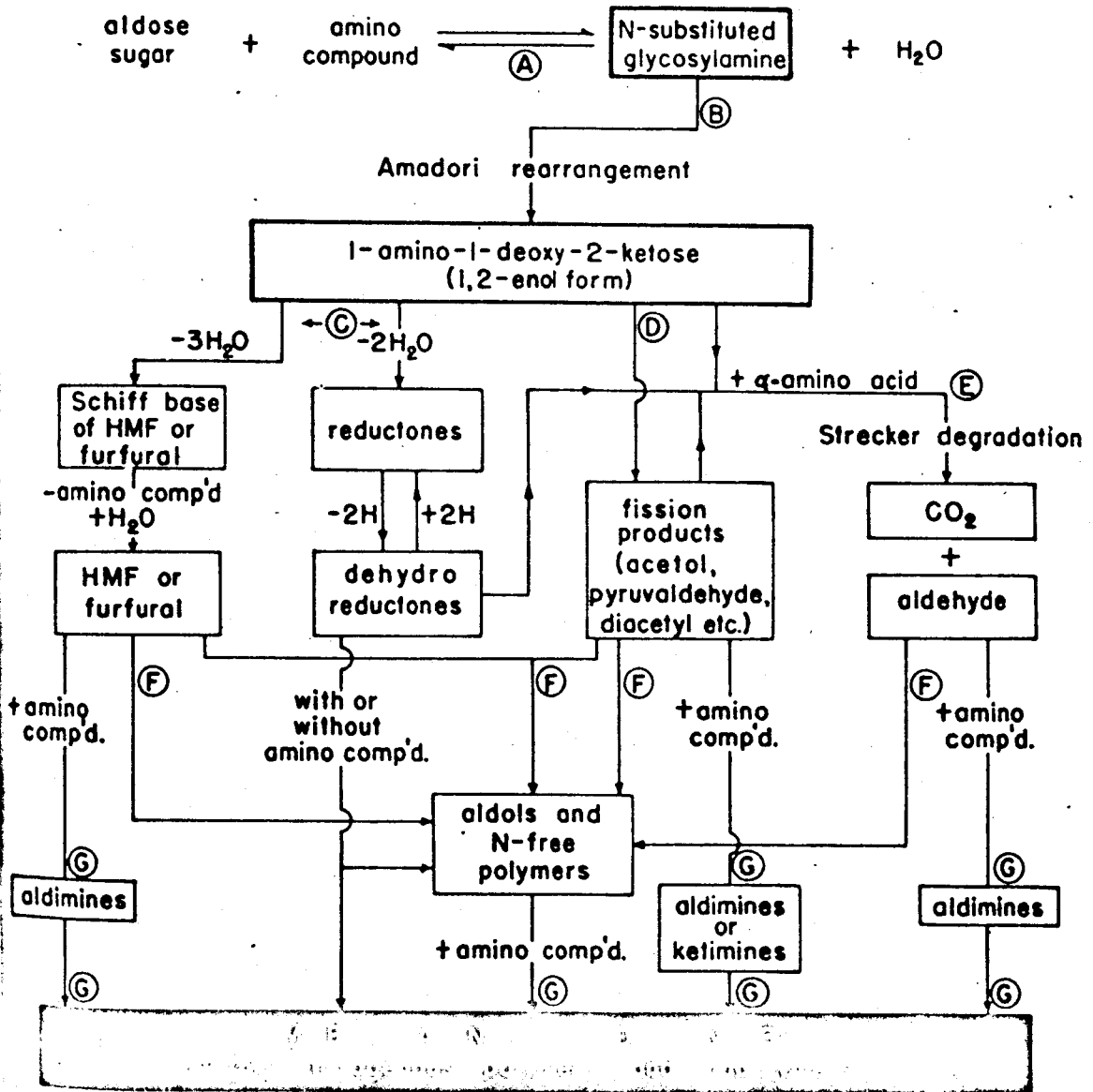
Ainda HODGE (51) publicou uma revisão crítica da literatura, sobre a reação de Maillard, focalizando o rearranjo de Amadori e cobrindo a literatura publicada até 1955.

ELLIS (52) publicou em 1959, uma revisão da literatura sobre a reação de Maillard em que são discutidos entre outros os efeitos da temperatura, do pH, água, fosfatos e cátions.

Segundo ELLIS, pelos dados da literatura até 1959, já era possível distinguir entre os pesquisadores a tendência à considerar dois tipos de mecanismos para a reação de escurecimento:

a. - reação entre amino-ácido e açúcar, dando

ESQUEMA DE HODGE(50)



as glicosilaminas que por rearranjo ou desidratação dão os intermediários furanic e ou enólicos precursôres das melanoidinas;

b. - reação dos produtos da degradação das carboidratos pelo efeito do pH distinta da reação de Maillard que só se dá em meio alcalino, e presença de aminoácidos.

REYNOLDS (53 e 54) publicou em 1963 e 1965, dois trabalhos de revisão de literatura sobre a química da reação de escurecimento.

Em seu primeiro trabalho REYNOLDS examinou principalmente a reação entre aldoses e aminoácidos, e na segunda parte (54) REYNOLDS discutiu a reação de escurecimento com proteínas, lipídeos e ácidos graxos bem como sua inibição.

Em 1969, REYNOLDS (55), apresentou uma nova revisão crítica sobre a reação de Maillard, incluindo literatura publicada até 1968. Nesta revisão, REYNOLDS, deu ênfase particular ao considerável número de problemas relativos à reação de Maillard e ainda não estudados.

A presente revisão bibliográfica não tem e nem poderia ter a pretensão de ser completa, pois o número de publicações sobre a reação de Maillard está hoje próximo à 2000. Nesses trabalhos há que distinguir os que estão mais diretamente ligados ao tratamento que procuramos dar à reação de Maillard nesta tese e assim foi necessário apresentar uma amostra da literatura publicada que esperamos seja representativa e possa ser considerada como alicerce deste trabalho. Também procuramos mostrar com a revisão feita que o problema está ainda longe de ser

lução completa e que os trabalhos publicados mostram as
vêzes resultados conflitantes e condições experimentais
bastante diversas, o que nos leva a concluir que as pre-
sentes teorias sobre a reação de Maillard ainda não fo-
ram suficientemente comprovadas.

Deve ser considerada também a possibilidade de
alguma confusão quanto a nomenclatura usada por diferen-
tes autores. Assim neste trabalho a reação de escureci-
mento não enzimática (non-enzymic browning) se refere a
reação de Maillard que é especificamente a reação entre
compostos amínicos e compostos com o grupo funcional car-
bônico. As transformações de açúcares ou ácidos orgâni-
cos hidroxilados com formação de produtos coloridos sem
interferência de compostos amínicos diferem nas condições
e nos produtos de reação e deve pois propriamente rece-
ber o nome de caramelização.

3 - MATERIAL

3.1. - Reagentes.

Os açúcares usados: xilose, frutose, glicose, maltose e sacarose, eram produtos puros para análise ou quimicamente puros, das marcas Merck, C. Erba ou Fisher.

O amino-ácido usado: glicina, era produto Merck quimicamente puro.

Todos os demais reagentes como ácido clorídrico, hidróxido de sódio, italoato ácido de potássio, ácido cítrico, citrato de sódio, fosfato de potássio e outros usados menos frequentemente nas experiências feitas, eram todos produtos puros para análise, Merck, C. Erba ou Baker.

A cromatografia em camada delgada (C.C.D.) foi feita usando-se sílica gel G da Merck e os solventes orgânicos por nós empregados, ou foram purificados em nosso laboratório conforme métodos usuais ou eram quimicamente puros das marcas Merck, C. Erba ou Baker.

Em todas as experiências por nós feitas, a água empregada foi água destilada e deionizada.

3.2. - Aparelhos.

As reações foram feitas em estufa Panom modelo 306/2 com termostato, sensibilidade $\pm 1,020$.

As densidades óticas foram medidas em espectrofotômetro Beckmann D.B. e os pH foram medidos em potenciômetro Beckmann Leromatic ou Beckmann 72 com microeletrodo combinado.

A C.C.D. foi feita usando-se placas de sílica

gel 6, com espessura de 0,25mm, preparadas em aparelho Desaga.

4 - MÉTODOS

4.1. - Efeito do pH 6,2 e 2,2 e de íons citrato sobre xilose, frutose, glicose, maltose e sacarose.

Foram feitas soluções 1,25M desses açúcares em água a pH 6,2 corrigido com ácido clorídrico e hidróxido de sódio, e soluções 1,25M dos mesmos açúcares em tampão citrato pH 6,2.

As soluções foram aquecidas à 47°C. A D.C. das soluções não sofreu alteração após 200h.

Soluções 1,25M de xilose, frutose e glicose em água com pH corrigido para 2,2 e em solução de ácido cítrico 0,1M com pH corrigido para 2,2 com hidróxido de sódio e ácido clorídrico, foram aquecidas a 47°C. Não foi observada alteração na D.C. das soluções após 200h.

4.2. - Efeito do pH 6,2 e 2,2 e de íons citrato sobre glicina.

Foram preparadas soluções 0,66M de glicina em água e o pH corrigido com ácido clorídrico e hidróxido de sódio para 6,2 e 2,2.

Empregando-se tampão citrato pH 6,2 e solução de ácido cítrico 0,1M foram feitas soluções 0,66M de glicina corrigindo-se o pH das soluções para 6,2 e 2,2 com ácido clorídrico e hidróxido de sódio.

As soluções foram aquecidas a 47°C durante 32h não tendo sido observada alteração na D.C. das soluções.

4.3. - Purificação da maltose.

A 10g de maltose, quimicamente pura, foram adicionados 25ml de etanol 95%. A mistura foi agitada a 25°C durante 20' e filtrada. O tratamento foi repetido mais três vezes e a maltose foi seca a vácuo sobre clorato de cálcio anidro.

A pureza da maltose foi determinada por C.C.D. Para isso foram aplicados 10µl de uma solução 1,25% do produto purificado e não purificado em placa de sílica gel G ativada. A placa foi desenvolvida com propanol; acetato de etila: água (70:20:10;v:v)(56) e após secagem ao ar, a placa foi revelada com solução de anisaldeído e ácido sulfúrico (56). O produto purificado apresentou somente uma mancha e o não purificado duas. Sensibilidade do revelador: 0,05µg de açúcar (56).

4.4. - Hidrólise de maltose e de sacarose a 47°C.

Foram feitas soluções 1,25% de sacarose e de maltose em água e o pH corrigido para 6,2 com ácido clorídrico e hidróxido de sódio.

As soluções foram aquecidas a 47°C e as soluções de maltose foram cromatografadas como em 4.3. Nas soluções de sacarose, foram determinados redutores pelo método de Somogy e Nelson (57 e 58).

Para a maltose após 17h a cromatografia de 10ml da solução deu 1 mancha (maltose). Sensibilidade do revelador: 0,05µg de açúcar (56).

Para sacarose após 110h, o teor de redutores encontrados foi de 0,65%.

4.5. - Reação de Maillard com maltose e com sacarose.

Foram pesadas 42,78g de maltose e de sacarose, as quais foram dissolvidas em um mínimo de água. O pH dessas soluções foi corrigido para 6,2 com ácido clorídrico e hidróxido de sódio, ambas em solução 0,2N. As soluções foram quantitativamente transferidas para balões volumétricos de 100ml. As soluções de glicina foram preparadas pesando-se 4,95g de amino-ácido que foram dissolvidas em um mínimo de água e o pH da solução foi corrigido para 6,2 com solução 0,2N de hidróxido de sódio e ácido clorídrico. Após transferir as soluções quantitativamente para os balões volumétricos contendo as soluções de maltose e de sacarose, os volumes foram completados com água de pH 6,2. De cada sistema foram feitas três repetições.

As soluções contendo maltose e glicina e sacarose e glicina, foram distribuídas em tubos de ensaio Kimax com tampa plástica rosqueada, de modo que cada tubo continha aproximadamente 10ml de solução.

Os tubos foram colocados em estufa à temperatura de 47°C.

De cada série de tubos foram retiradas amostras de aproximadamente 4ml e a densidade ótica (D.O.) e pH medidos periodicamente desde 0 (zero) horas até um máximo de 240 horas.

Os resultados obtidos, média de 5 determinações estão representados na tabela 1 e no gráfico 1.

Tabela 1

maltose + glicina pH 6,2 - H ₂ O			sacarose + glicina pH 6,2 - H ₂ O		
47°C			47°C		
h	D.O.	pH	h	D.O.	pH
0	0,000	6,20	0	0,000	6,20
12	0,000	6,20	90	0,000	—
36	0,000	6,20	96	0,010	6,20
44	0,010	6,20	120	0,011	6,20
56	0,013	6,20	144	0,014	6,15
72	0,020	—	168	0,018	6,15
98	0,054	6,15	200	0,030	6,00
102	0,070	—	216	0,039	—
114	0,107	6,00	240	0,055	5,95
130	0,158	6,00			
140	0,201	6,00			
166	0,305	6,00			
220	0,590	5,95			
240	0,660	5,90			

4.6. - Efeito da temperatura.

Usando-se a mesma técnica empregada em 4.5. foram preparadas soluções de glicose (22,52g em 100ml) , de frutose (22,52g em 100ml) e de xilose (10,77g em 100ml) com glicina. Estas soluções foram aquecidas a 47°C e 57°C até um máximo de 240 horas.

As variações de D.O. e pH de cada sistema estão representados nas tabelas 2, 3 e 4 e nos gráficos 2, 3, 4 e 5.

Tabela 2					Tabela 3				
xilose + glicina pH 6,2, H ₂ O 47°C		xilose + glicina pH 6,2, H ₂ O 57°C			glicose + glicina pH 6,2, H ₂ O 47°C		glicose + glicina pH 6,2, H ₂ O 57°C		
h	D.O.	pH	D.O.	pH	h	D.O.	pH	D.O.	pH
0	0,000	6,20	0,000	6,20	0	0,000	6,20	0,000	6,20
8	0,008	6,20	0,198	6,15	8	0,000	6,20	0,019	6,15
12	0,065	6,15	0,680	6,10	12	0,000	6,15	0,020	—
21	0,335	6,10	2,200	6,00	30	0,006	6,10	0,168	6,10
24	0,480	—	3,890	6,00	48	0,022	6,05	0,206	6,00
28	0,825	6,05	4,500	5,85	72	0,070	5,95	0,500	6,00
48	3,150	5,75	13,440	5,10	96	0,215	5,90	0,730	5,85
72	5,600	5,50	20,400	5,00	120	0,380	—	1,070	—
96	8,150	5,30	29,000	5,00	144	0,650	5,60	1,416	5,55
120	11,90	5,10	43,000	5,00	168	0,920	5,30	2,276	—
144	17,00	4,90	63,810	4,80	192	1,300	5,30	2,780	5,20
					216	1,580	—	3,900	5,00
					240	1,820	5,20	4,265	4,80

Tabela 4

frutose + glicina pH 6,2 - H ₂ O 47°C			frutose + glicina pH 6,2 - H ₂ O 57°C	
h	D.O.	pH	D.O.	pH
0	0,000	6,20	0,000	6,20
12	0,000	6,20	0,036	—
24	0,007	6,00	0,089	5,80
30	0,017	5,75	0,118	5,70
40	0,041	—	0,180	5,50
48	0,083	5,60	0,253	5,30
60	0,128	5,40	0,325	—
72	0,183	5,20	0,422	5,10
80	0,240	5,15	0,460	—
96	0,262	—	0,580	—
100	0,280	5,10	0,620	5,05
120	0,361	—	0,800	—
130	0,420	—	0,920	5,00
144	0,520	4,85	1,110	—
160	0,650	—	1,400	4,95
168	0,741	4,70	1,570	—
192	0,880	—	1,840	4,80
220	1,100	—	2,220	—
240	1,310	4,55	2,540	4,60

4.7. - Reação de Maillard com frutose, glicose e xilose
a pH 2,2.

Foram usadas soluções de xilose, glicose e frutose com glicina preparadas exatamente como em 4.6., mas com o pH corrigido para 2,2 com soluções 0,2N de ácido clorídrico e hidróxido de sódio.

As experiências realizadas à temperatura de 47°C foram também feitas em triplicata estando as médias de 3 resultados representados na tabela 5 e gráfico 6.

xilose + glicina			Tabela 5			frutose + glicina	
pH 2,2 - H ₂ O			pH 2,2 - H ₂ O			pH 2,2 - H ₂ O	
h	D.O.	pH	h	D.O.	pH	D.O.	pH
0	0,000	2,20	0	0,000	2,20	0,000	2,20
3	0,000	2,20	21	0,000	2,20	0,000	2,20
8	0,000	2,15	28	0,000	2,20	0,000	2,20
28	0,002	2,10	34	0,000	—	0,010	2,20
34	0,014	2,10	45	0,000	2,20	0,020	2,20
45	0,027	2,10	48	0,000	—	0,026	2,20
52	0,035	2,10	52	0,000	2,20	0,028	2,20
69	0,072	2,10	69	0,004	2,20	0,045	2,20
80	0,139	2,10	72	0,007	2,20	0,049	2,20
94	0,340	2,10	76	0,009	2,20	0,052	2,20
120	1,501	2,10	94	0,019	2,20	0,076	2,20
141	5,075	2,10	120	0,029	2,20	0,143	2,15
160	6,900	2,10	142	0,044	2,20	0,159	2,15
			165	0,057	2,20	0,221	2,10
			180	0,082	2,20	0,289	2,05
			192	0,100	2,20	0,350	—
			216	0,111	2,20	0,396	1,95
			240	0,110	2,20	0,441	1,70

4.8. - Efeito do íon fosfato a pH 6,2.

a. - Preparação do tampão pH 6,2 (59).

Uma solução 0,2M de fosfato monobásico de potássio, KH_2PO_4 , foi obtida dissolvendo-se 27,228g. do sal em água e elevando-se o volume da solução a 100ml em balão volumétrico.

Uma solução de aproximadamente 0,2M de hidróxi-
do de sódio, foi obtida por dissolução de 8,0g de hidró-
xido de sódio em água, e elevando-se o volume a 100ml
em balão volumétrico.

Para a preparação da solução tampão de pH 6,2
foram misturados 50,0ml de solução de fosfato monobásico
de potássio e 8,55ml de solução de hidróxido de sódio e
o volume elevado a 200ml em balão volumétrico.

b. - Foram preparadas soluções de glicina com
frutose, glicose e xilose na concentração de 0,60M de
amino-ácido e 1,25M de açúcar, usando-se o tampão fosfa-
to em lugar de água. Em tais soluções a concentração de
íon fosfato, (calculado como H_2PO_4^-) corresponde a
0,475g/100ml de solução tampão, isto é, uma solução 0,05M.

As amostras foram aquecidas a 47°C e os resul-
tados, médias de 3 determinações, estão representados na
tabela 6 e gráficos 7, 3, 4 e 5.

Tabela 6

xilose + glicina pH 6,2 - fosfato			glicose + glicina pH 6,2 - fosfato			frutose + glicina pH 6,2 - fosfato	
h	D.O.	pH	h	D.O.	pH	D.O.	pH
0	0,000	6,20	0	0,000	6,20	0,000	6,20
3	0,016	6,15	10	0,020	6,20	0,028	6,20
8	0,495	6,10	24	0,056	6,20	0,111	6,20
12	1,715	5,90	28	0,072	6,20	0,134	6,20
21	5,255	5,90	45	0,260	6,20	0,315	6,20
28	10,445	5,70	52	0,430	6,20	0,430	—
34	12,092	5,50	69	1,180	6,10	0,750	6,10
45	15,475	5,30	76	1,830	6,05	0,860	6,10
52	18,451	5,25	94	2,900	5,95	1,100	6,10
69	27,495	5,20	120	5,600	5,90	1,571	6,05
93	33,500	5,05	140	6,790	5,80	1,840	6,00
117	41,100	4,90	165	8,800	5,55	2,260	5,90
141	55,275	4,80	192	10,270	5,50	2,600	5,80
			216	15,000	5,40	2,820	5,65
			240	18,200	5,35	3,250	5,50

4.9. - Efeito do íon citrato a pH 6,2.

a. - Preparação do tampão de citrato pH 6,2
(59).

Foram preparadas: uma solução 0,1M de citrato de sódio, dissolvendo-se 25,309g de citrato de sódio em

água e elevando-se o volume a 100ml em balão volumétrico; uma solução 0,2M de ácido cítrico dissolvendo-se 19,212g de ácido em água e elevando o volume a 100ml em balão volumétrico.

Foram misturados 72,0ml de solução 0,1M de citrato de sódio e 42,8ml de solução 0,1M de ácido cítrico e o volume elevado a 100ml em balão volumétrico.

b. - Foram preparadas soluções de glicina com xilose, frutose e glicose, nas concentrações 0,06M em amino-ácido e 1,25M em açúcar. As soluções foram feitas em tampão citrato pH 6,2. A concentração do íon citrato ($C_6H_7O_7^-$) correspondia a 0,955g/100ml de solução tampão ou seja uma solução 0,05M de íon citrato.

As amostras foram aquecidas a 47°C e os resultados, média de 5 determinações estão representados na tabela 7 e gráficos 2, 3, 4 e 5.

Tabela 7

xilose + glicina			glicose + glicina			frutose + glicina		
pH 6,2 - citrato			pH 6,2 - citrato			pH 6,2 - citrato		
h	D.O.	pH	h	D.O.	pH	D.O.	pH	
0	0,000	6,20	0	0,000	6,20	0,000	6,20	
3	0,011	—	10	0,014	6,20	0,020	6,20	
8	0,072	—	21	0,019	6,20	0,044	6,20	
12	0,265	6,10	28	0,026	—	0,064	—	
28	2,985	6,05	45	0,093	—	0,130	6,20	
34	5,095	5,85	52	0,127	6,20	0,180	6,20	
45	7,450	5,60	69	0,390	6,10	0,392	—	
48	10,010	—	76	0,693	6,10	0,461	6,15	
52	11,020	5,55	94	1,281	—	0,740	6,15	
69	16,000	5,45	120	2,393	6,10	0,972	—	
96	22,000	5,20	141	3,210	6,00	1,151	6,15	
120	29,100	5,05	165	4,550	5,90	1,420	6,10	
141	37,130	4,90	189	6,520	5,80	1,730	6,05	
			213	7,453	5,80	2,100	5,90	
			240	8,370	5,80	2,710	5,75	

4.10. - Efeito do íon ftalato a pH 6,2.

a. - Preparação de tampão ftalato pH 6,2(59).

Foram preparadas soluções 0,2N de ftalato ácido de potássio e 0,2N de hidróxido de sódio, dissolvendo-se 51,618 de ftalato ácido de potássio e 8,0g de hidróxido de sódio em água e elevando-se o volume a 1000ml em

balão volumétrico. Solução 0,2N de ácido clorídrico foi feita diluindo-se 50,0ml de ácido clorídrico 1N a 250ml em balão volumétrico.

Para a preparação do tampão pH 6,2 foram misturados 50ml da solução 0,2N de ftalato ácido de potássio e 47,0ml da solução de hidróxido de sódio e o volume elevado a 200ml em balão volumétrico.

b. -- Foram preparadas soluções de glicina com xilose, frutose e glicose, na concentração de 0,66M em amino-ácido e 1,25M em açúcar, em tampão ftalato pH 6,2.

Em cada solução a concentração de íon ftalato ($C_7H_5O_4^-$) foi correspondente a 0,826g/100ml de solução tampão, isto é, uma solução 0,05M de íon hidrogeno ftalato.

As amostras foram aquecidas a 47°C e os resultados, médias de 3 determinações, estão representados na tabela 8 e gráficos 9, 3, 4 e 5.

Tabela 8

xilose + glicina			glicose + glicina			frutose + glicina	
pH 6,2 - ftalato			pH 6,2 - ftalato			pH 6,2 - ftalato	
h	D.O.	pH	h	D.O.	pH	D.O.	pH
0	0,000	6,20	0	0,000	6,20	0,000	6,20
3	0,011	—	10	0,014	6,20	0,015	6,20
8	0,183	—	20	0,019	6,20	0,022	6,20
12	0,757	6,15	28	0,024	6,20	0,036	6,20
21	3,635	6,10	34	0,030	6,20	0,052	6,20
28	6,975	6,10	45	0,044	6,20	0,106	6,20
34	8,035	5,70	52	0,098	6,15	0,150	6,20
45	13,555	5,40	69	0,188	6,05	0,281	6,10
52	14,485	5,35	76	0,273	6,00	0,346	6,10
69	17,765	5,30	94	0,656	6,00	0,500	6,05
100	25,015	5,15	120	1,283	6,00	0,701	6,00
120	31,650	4,95	141	1,473	5,90	0,880	5,95
141	40,365	4,80	165	2,453	5,80	1,170	5,90
			189	3,403	5,70	1,380	5,80
			213	4,013	5,60	1,590	5,75
			240	6,410	5,50	1,880	5,60

4.11. - Efeito da concentração de íons citrato a pH 6,2.

Foram preparadas soluções de glicina com glicose na concentração de 0,66M e 1,25M respectivamente usando-se como solvente soluções tampão de citrato pH 6,2 diluído com água a pH 6,2 de modo a se obter uma con

concentração 0,025N; 0,005N e 0,0015N em citrato.

As soluções tiveram seu pH corrigido para 6,2 com hidróxido de sódio e ácido clorídrico 0,2N. As amostras foram aquecidas a 47°C e os resultados, média de 3 determinações estão representados na tabela 9 e gráficos 10 e 11.

Tabela 9

glicose + glicina citrato - H ₂ O 1:1			glicose + glicina citrato - H ₂ O 1:10			glicose + glicina citrato - H ₂ O 1:100		
pH 6,2			pH 6,2			pH 6,2		
h	D.O.	pH	D.O.	pH	D.O.	pH	D.O.	pH
0	0,000	6,20	0,000	6,20	0,000	6,20	0,000	6,20
8	0,013	6,20	0,012	6,20	0,000	6,20	0,000	6,20
12	0,016	6,20	0,013	6,20	0,000	6,20	0,000	6,20
22	0,023	6,20	0,017	6,20	0,003	6,20	0,003	6,20
31	0,034	6,20	0,025	6,10	0,015	6,10	0,015	6,10
44	0,064	6,10	0,044	5,85	0,027	5,85	0,027	5,85
62	0,125	6,10	0,063	5,80	0,047	5,80	0,047	5,80
80	0,234	6,10	0,100	5,80	0,069	5,80	0,069	5,80
96	0,420	6,10	0,140	5,80	0,089	5,80	0,089	5,80
120	0,911	5,90	0,220	5,80	0,130	5,80	0,130	5,80
160	1,618	5,90	0,455	5,80	0,241	5,80	0,241	5,80
210	2,730	5,75	0,990	5,65	0,536	5,70	0,536	5,70
240	3,520	5,75	1,521	5,60	0,810	5,60	0,810	5,60

4.12. - Efeito do íon ftalato a pH 2,2.

a. - Preparação do tampão itálate pH 2,2.(59).

Para a preparação do tampão pH 2,2 foram misturados 50,0ml de solução 0,2N de itálate ácido de potássio com 46,7ml de solução 0,2N de ácido clorídrico e o volume elevado a 200ml em balão volumétrico.

b. - Foram preparadas soluções 0,66N de glicina e 1,25N de xilose, glicose e frutose com tampão itálate 2,2 corrigindo-se o pH para 2,2 com ácido clorídrico e hidróxido de sódio. A concentração de ácido itálico nas soluções era de 0,05N.

As soluções foram aquecidas a 47°C e os resultados, médias de 5 determinações, estão representados na tabela 10 e gráfico 12.

Tabela 10

xilose + glicina			glicose + glicina			frutose + glicina	
pH 2,2 - itálate			pH 2,2 - itálate			pH 2,2 - itálate	
h	D.O.	pH	h	D.O.	pH	D.O.	pH
0	0,000	2,20	0	0,000	2,20	0,000	2,20
8	0,000	2,20	12	0,000	2,20	0,000	2,20
21	0,000	2,20	24	0,000	2,20	0,010	2,20
28	0,005	2,10	36	0,000	2,20	0,017	2,20
30	0,010	2,10	48	0,000	2,20	0,024	2,20
34	0,015	2,10	56	0,000	2,20	0,031	2,20
45	0,028	2,10	72	0,004	2,20	0,042	2,20
52	0,073	2,10	76	0,010	2,20	0,046	2,20
69	0,215	2,10	96	0,015	2,20	0,067	2,20
96	0,881	2,10	120	0,024	2,20	0,101	2,15
120	3,291	2,10	148	0,041	2,20	0,154	2,10
142	6,610	2,10	168	0,061	2,20	0,206	2,10
160	8,900	2,10	192	0,094	2,20	0,250	2,05
			216	0,100	2,20	0,306	2,00
			240	0,104	2,20	0,377	1,90

4.13. -- Efeito do íon citrato a pH 2,2.

Usando-se solução 0,1N de ácido cítrico, foram feitas soluções 1,25N de glicose, xilose e frutose e 0,66N de glicina. O pH foi ajustado a 2,2 com ácido clorídrico e hidróxido de sódio.

As soluções foram aquecidas a 47°C e os resultados, média de 3 determinações estão representadas na tabela 11 e gráfico 13.

Tabela 11

xilose + glicina pH 2,2 ácido cítrico			glicose + glicina pH 2,2 ácido cítrico			frutose + glicina pH 2,2 ácido cítrico	
h	D.O.	pH	h	D.O.	pH	D.O.	pH
0	0,000	2,20	0	0,000	2,20	0,000	2,20
8	0,013	2,20	20	0,000	2,20	0,000	2,20
12	0,015	2,20	24	0,000	2,20	0,010	2,20
20	0,020	2,20	34	0,000	2,20	0,015	2,20
24	0,023	2,15	40	0,000	2,20	0,019	2,20
30	0,040	2,15	50	0,000	2,20	0,028	2,20
38	0,089	2,15	69	0,000	2,15	0,049	2,20
45	0,180	2,15	96	0,000	2,15	0,084	2,15
60	0,580	2,10	120	0,010	2,10	0,128	2,10
76	1,600	2,10	140	0,022	2,10	0,181	2,05
100	3,510	2,05	160	0,032	2,10	0,230	2,00
120	4,980	2,00	180	0,041	2,10	0,286	2,00
140	7,010	2,00	210	0,069	2,10	0,399	2,00
160	9,300	2,00	240	0,088	2,10	0,541	2,00

4.14. - Efeito da mistura de tampões citrato e fosfato.

Volúmenes iguais de tampão fosfato 6,2 e tampão citrato 6,2 foram misturados e essa solução foi usada como solvente para a preparação de soluções de glicina (0,66M) com xilose, com frutose e com glicose (1,25M). O pH foi corrigido a 6,2 com hidróxido de sódio e ácido clorídrico.

As soluções foram aquecidas a 47[±]2° e os resultados, médias de 3 determinações, estão representados na tabela 12 e gráficos 10 e 11.

Tabela 12

glicose + glicina
pH 6,2 -- citrato + fosfato 1:1

h	D.O.	pH
0	0,003	6,20
8	0,016	6,20
12	0,020	6,20
22	0,036	6,20
30	0,058	6,20
50	0,180	6,10
76	0,520	6,05
90	0,910	6,00
116	1,721	5,85
140	2,910	5,75
168	5,400	5,70
200	6,410	5,70
220	7,191	5,65
240	8,050	5,60

4.15. - Formação de furfural.

Soluções 1,25M de xilose em água a pH 6,2 e 2,2 feitas como nas experiências anteriores, foram aquecidas a 47°C durante 48h. De cada solução foram pipetados 5ml em 20ml de solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina preparada segundo Shriner e Fuson (60).

As soluções foram aquecidas em banho-maria durante 20' e deixadas em repouso 2h a temperatura ambiente. Os precipitados foram centrifugados, lavados com água e secados em dessecador a vácuo sobre CaCl_2 anidro.

Cada precipitado seco foi extraído com acetato de etila a quente e filtrado. Os filtrados foram elevados a volume em balão volumétrico de 250ml com acetato de etila e 20 μ l de cada solução foram cromatografadas em placas de sílica gel G. O cromatograma foi desenvolvido com tolueno: acetato de etila (3:1 v/v) (61). A hidrazona do furfural foi eluída com clorofórmio e os extratos elevados a volume.

A densidade ótica de cada solução foi medida no espectrofotômetro a 390nm.

A quantidade de hidrazona do furfural em cada solução foi obtida a partir de uma curva padrão construída medindo-se a D.O. de soluções preparadas com 2,4-dinitrofenil hidrazona do furfural em clorofórmio e em concentrações variando de 0,3 a 1,7mg/100ml. A pH 2,2 foram produzidos 5,62g de hidrazona por 100ml de solução 1,25M de xilose ou seja 1,96g de furfural (16,6% de rendimento). A pH 6,2 a hidrazona produzida foi 0,59g ou seja 0,21g de furfural (1,8% de rendimento).

4.16. - Escurecimento do furfural a pH 2,2 e 6,2.

Foram preparadas soluções de furfural em água a pH 2,2 e 6,2 contendo 1,9 e 0,21% do aldeído. Essas soluções foram aquecidas a 47°C. Não foi observada variação da densidade ótica nas soluções após oito dias de reação.

4.17. - Reação do furfural e glicina a pH 2,2 e 6,2.

Foram preparadas soluções 0,66N de glicina em água a pH 2,2 e 6,2 como nas experiências anteriores. A essas soluções foram juntadas 1,9 e 0,21% do seu volume em furfural. As soluções foram aquecidas a 47°C e as suas densidades óticas e pH foram medidas desde 0 (zero) horas até 60h.

Os resultados, média de 3 determinações, estão representados na tabela 13 e gráficos 14 e 15.

Tabela 13

furfural + glicina			furfural + glicina	
pH 6,2 - água			pH 2,2 - água	
h	D.O.	pH	D.O.	pH
0	0,000	6,20	0,000	2,20
1	0,053	—	0,043	2,20
3	0,181	5,70	0,101	2,20
6	0,310	5,55	0,113	2,20
9	0,369	5,20	0,169	2,20
13	0,520	5,00	0,226	2,20
25	0,752	4,90	0,426	2,20
32	0,836	4,85	0,535	2,20
60	1,171	4,50	0,610	2,20

4.18. - Formação de 5-hidroximetil-furfural (HMF)

Soluções 1,25M de glicose e de frutose em água a pH 2,2 e 6,2 foram preparadas como nas experiências anteriores e aquecidas a 47°C. após 48h, de cada solução foram pipetados 1ml em 30ml de 2,4-dinitrofenil hidrazina (60) procedendo-se em seguida do mesmo modo como em 4.17.

Do mesmo modo que para o furfural, foi estabelecida uma curva padrão para a 2,4-dinitrofenil hidrazona do HMF, e os resultados obtidos foram:

glicose pH 6,2 - 0,03% de HMF

glicose pH 2,2 - 0,11% de HMF

frutose pH 2,2 - 0,4% de HMF

frutose pH 6,2 - 0,12% de HMF

4.19. - Escurecimento de 5-hidroximetil-furfural (HMF)

Soluções em água a pH 2,2 e 6,2 contendo 0,4; 0,12; 0,03 e 0,11% de HMF (preparado segundo HAWKETT e JONES (62)), foram aquecidas a 47°C. A D.C. das soluções não sofreu alteração após 8 dias de aquecimento.

4.20. - Reação de HMF e glicina a pH 6,2 e 2,2.

Soluções 0,66M de glicina em água a pH 6,2 e 2,2 foram preparadas como nas experiências anteriores e a essas soluções foram adicionadas 0,4%; 0,12%; 0,11% e 0,03% do seu volume em HMF. A variação da D.C. dessas soluções está representada na tabela 14 e gráficos 16 e 15.

Tabola 14

HMF (0,12%) + glicina			HMF (0,03%) + glicina		
pH 6,2 - água			pH 6,2 - água		
h	D.O.	pH	D.O.	pH	
0	0,000	6,20	0,000	6,20	
7	0,057	6,10	0,027	6,15	
19	0,117	5,95	0,052	6,10	
27	0,154	5,90	0,062	6,05	
43	0,187	5,80	0,088	5,95	
69	0,209	5,70	0,105	5,85	
93	0,239	5,65	0,116	5,80	

HMF (0,4%) + glicina			HMF (0,11%) + glicina		
pH 2,2 - água			pH 2,2 - água		
h	D.O.	pH	D.O.	pH	
0	0,000	2,20	0,000	2,20	
7	0,039	2,20	0,014	2,20	
19	0,079	2,20	0,018	2,20	
27	0,119	—	0,024	—	
43	0,176	2,20	0,037	2,20	
69	0,283	—	0,057	—	
93	0,380	2,20	0,084	2,20	

5. - REAÇÕES DE MaILLARD E BILLOREAU.

5.1. - Métodos e Material.

Pela revisão da literatura verifica-se que a reação de Maillard tem sido estudada com o uso de técnicas analíticas e condições de reação diferentes o que torna difícil a comparação de resultados e de conclusões de diferentes autores.

As técnicas analíticas mais frequentemente usadas no estudo da reação de Maillard são: polarimetria, titulação potenciométrica, determinação de nitrogênio amínico e medida da densidade ótica das soluções.

O método polarimétrico apresenta a desvantagem de resultados imprecisos pelo pequeno valor das diferenças entre as várias medidas da rotação ótica. Além disso as diferenças na rotação ótica das soluções de carboidratos e amino-ácidos, podem não representar o andamento da reação, já que nem todos os produtos que se formam tem sua rotação ótica específica conhecida e também não leva em conta as variações da rotação ótica causadas por transformações dos carboidratos independentemente da reação de Maillard.

A titulação potenciométrica permite relacionar a velocidade de reação com as variações do pH acima de 4,5 mas, abaixo desse valor, os resultados são pouco precisos pela pequena variação do pH em função do tempo. Por outro lado, se a reação for estudada a temperaturas altas, ou por tempos longos, as mudanças de pH poderão sofrer influência do CO_2 formado.

A determinação do nitrogênio amínico pelo método de Van Slyke (9), apresenta reais vantagens pela precisão e é especialmente útil quando se tem como finalidade principal estudar as perdas de amino-ácidos, que também podem ser estudadas com o uso do analisador de amino-ácidos (41).

A medida da densidade ótica no estudo da reação de Maillard também apresenta inconvenientes como sejam: alguns dos produtos intermediários não são coloridos, o aumento da intensidade da cor na fase final da reação pode resultar de variações de estruturas nas melanoidinas e pode haver formação de produtos insolúveis. Pode ser necessário diluir as soluções cuja coloração deve ser medida no espectrofotômetro. Neste caso cabe lembrar que a lei de Beer só é obedecida quando a diluição não é superior a 1:100 (35).

Neste trabalho, os métodos empregados foram ditados pelas condições existentes e pela finalidade do trabalho. A medida da densidade ótica e pl. permitiram verificar nos sistemas estudados a duração da fase inicial da reação, em que ainda não se formaram melanoidinas em quantidade apreciável, e uma fase posterior onde o escurecimento é intenso, e provavelmente correspondendo a fases indicadas por RUDGE (50), SPARK (33) e KATO (32) nos esquemas de reação propostos por esses autores. A medida da densidade ótica demonstrou ser um método rápido e muito sensível, permitindo examinar rapidamente um grande número de amostras enquanto os valores obtidos nas medidas de pl. são de interpretação difícil. As medidas foram feitas a 450nm, levando-se em conta a colora-

ção controlando-pardo das soluções e medir. A faixa entre 400-500nm foi usada na maioria dos trabalhos em que esta técnica foi empregada.

Ensaio preliminar revelou que as reações feitas a temperatura de 47°C, permitiam leituras da densidade ótica com diluição das amostras não superior a 1:100, até pelo menos 240 horas de reação para hexose e 140 horas para xilose. Além desses tempos, considerável formação e despreendimento de CO_2 foi observado em nossos ensaios. Pelo exame dos gráficos, verifica-se que realmente há uma mudança considerável na orientação das curvas construídas com a variação da densidade ótica (D.O.) em função do tempo, ao redor de 200 horas para hexose e 140 horas para xilose, o que mostra que o que se pretendia estudar, isto é, a fase inicial da reação, já havia sido superada. Não foi possível eliminar o efeito do CO_2 produzido durante a reação, nas determinações de pH, o que poderá ter influído nos valores obtidos, especialmente nas medidas feitas quando a produção de melanoidinas já era considerável.

O uso da glicina neste trabalho justifica-se pelo fato desse amino-ácido ser abundante em alimentos, e ter características de amino-ácido neutro com estrutura simples.

Procuramos usar carboidratos que fossem representativos de tipos de estrutura comuns nesses compostos e assim escolhemos uma aldopentose, a xilose e duas hexoses: uma aldose, glicose, e uma cetose, a frutose, que também são as hexoses mais largamente encontradas em alimentos e dois dissacarídeos, maltose: redu

tole e sacarose: não redutores. As condições de reação co
colhidas: pH 2,2 e 6,2, temperatura de 47° e 57°C, o fo
ram por representar condições comparáveis àsquelas us
das em trabalhos anteriores (55, entre outros) e porque
representam condições próximas daquelas muitas vezes en
contradas em alimentos, durante seu processamento ou ar
mazemonante.

A verificação da presença de furfural e HMF
bem como a dos açúcares cládicos foi feita através da
cromatografia e espectrofotometria das 2,4 dinitro-fenil
hidrazinas dâsses e apostos (63). Esse método apresenta
a vantagem de poder ser usado em soluções onde há forte
coloração da solução pela presença de melanoidinas e evi
ta no caso do furfural a destilação com vapor, a qual
não deu os resultados esperados, pois o teor de furfural
era baixo e o volume de amostras muito pequeno.

5.2.4 - Resultados

As experiências descritas em 4.1 , demonstraram pelos resultados obtidos que nenhum dos açúcares usados produziu variações na densidade ótica, sem a presença de glicina, mesmo quando em presença de citrato. O mesmo foi verificado em 4.2 , para a glicina.

Dêste modo e contrariamente ao encontrado por LEWIS et al. (16), a densidade ótica pode ser usada para o estudo da reação de Maillard desde que as condições de reação usadas, como neste trabalho, sejam suficientemente brandes para evitar a caramelização.

Em 4.5 e 4.6 , foram obtidos resultados que permitiram estabelecer a seguinte ordem de reatividade decrescente para os açúcares usados: xilose, glicose, frutose, maltose e sacarose. Esta ordem, pelo menos no caso da sacarose e maltose, difere daquela indicada por SPARK (33) e também dos resultados apresentados por FRANKEL e MATCHALSKY (12, 13 e 14), que concluíram pela não reatividade de cetoses. SPARK procurou justificar a maior reatividade da sacarose pela sua hidrólise que produz frutose que é inicialmente mais reativa do que a glicose. Em 4.4 , foi observada a hidrólise inicial de maltose e de sacarose. Como era de esperar-se pelos resultados de MOELWYK-HUCIDES (64), a maltose praticamente não sofreu hidrólise pelo menos até 170h, enquanto a sacarose após 110h apresentava um teor de hidrólise de 0,65%. Mesmo assim a velocidade de reação da maltose foi maior, o que indica não haver necessidade de hidrólise mas sim de grupo carbonila livre no dissacarídeo. A menor reati-

vidade da maltose em relação à glicose possivelmente está relacionada com o seu maior peso molecular e maior complexidade da molécula. A sacarose só começou a reagir quando seus produtos de hidrólise estavam presentes em concentração suficiente para produzir coloração mensurável a 450nm.

As velocidades de reação de xilose, glicose e frutose foram estudadas a 47° e 57°C em 4.6, e tanto a 47° como a 57°C a ordem de reatividade decrescente é a mesma, isto é: xilose, glicose e frutose.

Considerando que a densidade ótica é uma medida de concentração (21), podemos calcular graficamente a constante específica da reação, considerada de primeira ordem, escolhendo os trechos mais favoráveis das curvas no gráfico 2 (ver apêndice I).

Os valores obtidos para trechos subsequentes das curvas foram:

xilose - 4,1 e 3,6

glicose - 2,2 e 2,1

frutose - 2,0 e 1,9

O efeito de temperatura é portanto decrescente na ordem: xilose, glicose e frutose.

Pelo gráfico 2 verifica-se que um aumento de 10°C na temperatura de reação entre 47° e 57°C, produz a eliminação ou pelo menos uma grande diminuição na fase de indução dos 3 açúcares.

A ordem de reação inicial da frutose e da glicose inverte-se com aproximadamente 120h e 60h de reação a 47° e 57°C respectivamente. Para a glicose a 57°C essa inversão corresponde a curto período de estabilização do

pH (gráfico 4).

Para os 3 açúcares a ordem decrescente de reatividade corresponde a ordem decrescente em que a forma acíclica está presente na solução (34).

As diferenças de reatividade entre a xilose e as 2 hexoses poderiam ser atribuídas em parte a maior facilidade de desidratação da xilose e maior reatividade do furfural assim formado, em relação ao HMF formado da glicose e frutose.

As observações de HEYB et al. (41), sobre a formação de manose-glicina na reação entre frutose e glicina, e a rápida decomposição desse composto intermediário, representa uma possível explicação para a maior reatividade inicial da frutose. Parece-nos que também a maior facilidade da frutose em produzir HMF em relação a glicose, deve ser um fator em favor da maior reatividade inicial da frutose.

Além da fase inicial, onde os primeiros produtos da reação de oxidação, devem provocar uma diminuição dos grupos $-NH_2$ livres e consequente queda de pH, o aumento da coloração pode ser provocado por modificações das estruturas das melanoidinas já formadas, sem mais perdas de grupos $-NH_2$ livres; de fato, os dados das tabelas 2, 3 e 4 indicam essa possibilidade especialmente para a frutose. Assim, não foi possível correlacionar, tal como o fizeram FRANKEL e KATCHALSKY (12, 13 e 14) e WOLFROM et al. (21), o aumento da coloração com a variação do pH. As curvas de variação do pH para xilose, glicose e frutose (gráficos 3, 4 e 5), mostram nítida diferença no caso da glicose e frutose, o que seria uma indi

cação da existência de mecanismos diferentes nas duas reações (36, 37 e 33).

O efeito do pH inicial sobre o andamento da reação de Maillard tem sido interpretado por diferentes autores de modo particular pois enquanto FRANKEL e KATCHALSKY (12, 13 e 14), consideram que abaixo de pH 4,0, praticamente não há reação, WOLFROM et al. (21), observaram a reação de Maillard a pH inferior a 1,0. SCHROEDER et al. (22), concluíram que a pH 2,0 e pH 11,0 a reação de escurecimento se dá pela caramelização e que somente a pH 11,0 há também reação de Maillard. Segundo SCHROEDER et al. não há correlação entre variação de pH e reação de Maillard a pH 2,0 pois nessas condições não há reação entre o açúcar e o amino-ácido. Os dados da tabela 5 comparados com os dados das tabelas 2, 3 e 4 e gráficos 3 e 6, mostram que a reação de Maillard é efetivamente retardada a pH 2,2, mas não há caramelização segundo os dados obtidos em 4.1 e 4.2 ; portanto o escurecimento deve provir da reação de Maillard. A pH inicial 2,2 a pequena variação de pH encontrada para xilose e frutose ou a não variação de pH para glicose, está ligada ao pequeno efeito que a diminuição de grupos $-NH_2$ tem sobre a variação de pH a 2,2. Pôsse pH as moléculas do amino-ácido devem estar extensamente protonadas no seu amino grupo e a reação nucleofílica do amino-ácido ao grupo carbonilo será menos favorável. Com isso há um aumento do período de indução visível no gráfico 6.

A possibilidade de que furfural e HMF não sejam intermediários na reação de Maillard conforme con-

cluíram entre outros KATZ e OFFICINER (37), pelo efeito do pH inicial sobre tal reação que é retardada quando as condições favoreceriam a formação daquelas aldeídos, não nos parece inteiramente válida pois os resultados aqui expostos comprovam que apesar da formação de furfural e HMF ser maior a pH 2,2 também foi demonstrada a menor reatividade desses aldeídos especialmente do HMF com glicina, nesse pH.

Por outro lado, a pH 2,2, a reação de Maillard é consideravelmente mais lenta na glicose do que na frutose (gráfico 6), o que poderia estar ligado a menor quantidade de HMF produzida pela glicose em comparação com a frutose.

Usando os dados das tabelas 2, 3, 4 e 5 e os gráficos 2 e 6 podemos calcular os valores aproximados dos efeitos de pH, procedendo análogamente à efeitos de temperatura. Os valores obtidos foram: (ver apêndice II).

xilose - 2,7
glicose -14,1
frutose - 3,2

O efeito de pH em ordem decrescente é portanto glicose, frutose e xilose indicando que o abaixamento de pH inicial de 6,2 para 2,2 inibe de modo semelhante a reação de frutose e xilose, enquanto a inibição da reação da glicose é consideravelmente mais intensa.

Enquanto a influência do pH inicial já é um fator considerada nas técnicas de processamento de alimentos, o efeito de ânions é um problema que não chegou ainda a influir em tais técnicas.

Efetivamente além de poucos dados sobre o es-

sunto, o efeito de ânions é também controvertido.

Tendo em vista que a variação do pH inicial produz variações consideráveis na velocidade de reação de xilose, glicose e frutose, procuramos estudar o efeito de ânions tornando-o tanto quanto possível independente de variações do pH. Para isso foram usadas soluções tampão de fosfato, citrato e ftalato, em que o ânion estava presente na concentração de 0,05M. Foram usadas soluções tampão de fosfato e citrato, pelo fato que tais ânions estão presentes normalmente em alimentos, ou são frequentemente adicionados no processamento.

O tampão ftalato foi usado principalmente tendo em vista que sua estrutura poderia influir na sua ação catalítica sobre a reação de abertura do anel furânico ou pirânico, agindo como catalizador através dos grupos carboxílicos ionizado e não ionizado. Também foi levada em conta a possibilidade que tais ânions teriam de reagir com os grupos hidroxilas dos açúcares.

Em 4.3, 4.9 e 4.10, foi feita a reação de Maillard usando em lugar de água, soluções tampão de pH 6,2.

Pelos resultados expressos nas tabelas 6, 7, 8 e gráficos 7, 8, 9 e 3, 4, 5, verifica-se que o efeito de tampão de citrato, fosfato e ftalato tem duração relativamente curta e variável para glicose e frutose. Para xilose o efeito de tampão cessa praticamente nas primeiras horas da reação. O efeito sobre o pH final da reação, após 240h, com excessão da xilose é menor para as 2 hexoses com qualquer dos 3 ânions, do que quando estes estão ausentes. O pH final com tampão citrato é

mais alta para os 3 açúcares, e para glicose e frutose o pH final é decrescente na ordem: citrato, ftalato e fosfato. Observa-se também, que a eqã. de tempo, produz o desaparecimento do leso de indução para os 3 açúcares. Não parece haver uma relação evidente entre pH final e intensidade de escurecimento para glicose e frutose pois a ordem decrescente para intensidade de coloração após 240h de reação tanto para glicose como a frutose é: fosfato, citrato e ftalato. Para xilose o ânion mais ativo é o fosfato, sendo quase equivalentes citrato e ftalato.

De modo análogo ao que foi feito para efeito de temperatura podemos calcular graficamente o efeito do ânion pela relação $\frac{K \text{ ânion } 6,2}{K \text{ H}_2\text{O } 6,2}$ e os valores obtidos

foram: (ver apêndice III).

Quadro A

	fosfato	citrato	ftalato
xilose	5,2 - 2,7	2,0 - 2,0	4,0 - 2,0
glicose	7,8 - 6,4	3,1 - 4,5	2,3 - 2,5
frutose	3,2 - 2,6	2,2 - 1,8	1,6 - 1,6

Obs: - Os valores da primeira coluna para cada íon representam o efeito do ânion na parte inicial da reação e a 2ª coluna os valores correspondentes ao trecho médio e final das curvas nos gráficos 7, 8 e 9.

6. RESUMO e CONCLUSÃO

Após uma revisão dos trabalhos publicados sobre a reação de Maillard, procurou-se estudar o sistema modelo e efeito da temperatura, pH, e de ânions sobre aquela reação, usando glicina e carboidratos representativos e largamente encontrados em alimentos. Foram também estudadas a formação de furfural e de 5-hidroximetil-furfural (HMF) e sua relação com o escurecimento dos alimentos. Dos resultados obtidos conclui-se que:

- 1 - a medida da densidade ótica (D.O.) em função do tempo pode ser usada para estudar a reação de Maillard em sua fase inicial.
- 2 - as variações de pH medido durante o decorrer da reação não permitem acompanhar o andamento da reação de Maillard com a mesma eficiência obtida pelas medidas da D.O.
- 3 - nas condições de reação usadas neste trabalho somente há produção de melanoidinas quando estão presentes carboidratos e o aminoácido.
- 4 - a 47°C e a pH 6,2 a ordem decrescente da reatividade dos carboidratos com glicina é: xilose, glicose, frutose, maltose e sacarose.
- 5 - a 57°C e pH 6,2 os monossacarídeos tem a seguinte ordem decrescente de reatividade com glicina: xilose, glicose e frutose.
- 6 - dissacarídeos redutores podem dar a reação de Maillard por terem grupo carbonila livre enquanto os não redutores devem sofrer hidrólise para dar a reação.

- 7 - a reação de Maillard a 47°C é mais rápida a pH 6,2 do que a pH 2,2. A pH 2,2 ela é retardada mas não completamente inibida.
- 8 - a ordem decrescente de reatividade a 47°C e pH 2,2 dos carboidratos com glicina é: xilose, frutose e glicose.
- 9 - o efeito do pH calculado através das constantes aparentes de velocidade de reação a pH 6,2 e 2,2 mostra que o efeito é máximo para glicose decrescendo para xilose e frutose.
- 10 - a velocidade de reação entre xilose, glicose, frutose e glicina aumenta em presença de íons fosfato, citrato e ftalato a pH 6,2.
- 11 - o aumento de velocidade de reação produzido por concentrações 0,05M de cada um dos ânions usados a pH 6,2 depende da estrutura do carboidrato e de ânions.
- 12 - dos ânions estudados o fosfato, mostrou-se catalizador mais efetivo para qualquer dos carboidratos usados a pH 6,2.
- 13 - o efeito catalítico de ânions a pH 2,2 somente atua significativamente para a xilose.
- 14 - concentrações de íons citrato inferiores a 0,025M e a pH 6,2 tendem a diminuir a velocidade da reação entre glicose e glicina.
- 15 - não há efeito catalítico aditivo dos ânions citrato e fosfato sobre a reação de glicose e glicina a pH 6,2.
- 16 - a reação de Maillard está sujeita a catálise geral ácido-base da água, mas o efeito da catálise básica

é predominante.

- 17 - a presença de ânions a pH 6,2 aumenta o efeito da catálise básica acelerando a reação.
- 18 - o abaixamento do pH da reação para 2,2 diminui o ataque nucleofílico dos amino grupos ao grupo carbonila do carboidrato retardando a formação de glucosil aminas-N-substituídas, mas favorece a formação de produtos de desidratação de xilose e frutose.
- 19 - nas condições de reação usadas, furfural e HMF não produzem escurecimento na ausência de glicina.
- 20 - em presença de glicina o escurecimento de furfural e HMF é mais rápido a pH 6,2 do que a 2,2.
- 21 - o escurecimento do furfural a pH 6,2 e 2,2 em presença de glicina é mais rápido do que o obtido com HMF.
- 22 - a formação de furfural e HMF dependendo das condições de reação e dos reagentes, é considerada como contribuinte importante no escurecimento de alimentos e deve ser incluída nos esquemas propostos para a reação de Maillard.
- 23 - o conteúdo de xilose, citrato e fosfato solúveis deverá ser levado em conta ao estudar o armazenamento e processamento de alimentos.
- 24 - a prática industrial de eliminar a glicose por fermentação para evitar o escurecimento do alimento só se justifica quando o pH e o teor de frutose e principalmente xilose forem baixos.

7 - SUMMARY

By measuring the O.D. of aqueous solutions of carbohydrates with glycine heated at 47° and 57°C, the author has undertaken an experimental study of the Maillard reaction. Results of experiments made at two different temperatures, and at pH 6,2 and 2,2, as well as the catalytic effect of buffer solutions containing phosphate, phthalate and citrate ions, are reported. The production of furfural and HMF and their relation to browning were also investigated.

The results obtained showed a strong catalytic effect of anions, and an effect of pH. A fast Maillard type reaction of furfural and HMF with glycine was demonstrated.

The implications of the results obtained with the proposed reaction mechanisms and reaction schemes proposed in previous papers was discussed.

It is suggested that some accepted techniques for processing foods be reviewed taking into account the effect of anions and different sugars in the Maillard reaction.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MAILLARD, L.C. - Compt. Rend. 154, 66-68 (1912).
2. MAILLARD, L.C. - Compt. Rend. soc. biol. 72, 599 (1912) cf. Danohy J.P. e Fignon W.W. Adv. Ed. Res. 3, 245 (1951).
3. MAILLARD, L.C. - Ann. Chim. 5, 258 (1916); cf. Danohy J.P. e Fignon W.W. Adv. Food Res. 3, 245 (1951).
4. SCHIEDEMEIER, C. - Arch. exp. l. Path. Pharmacol. 39, 1, 65 (1897); cf. Danohy J.P. e Fignon W.W. Adv. Ed. Res. 3, 244 (1951).
5. GRUBBE, L. e J. Weber - Biochem. Z. 121, 109 (1921).
6. FLEUBERG, C. e H. Lobel - Biochem. Z. 162, 498 (1925).
7. FLEUBERG, C. e E. Simon - Ber. 60 B, 817 (1927).
8. VON EULER, H. e A. Josephson - Z. physiol. chem. 153 1 (1926).
9. VAN SLYKE, D. D. - J. Biol. Chem. 10, 15 (1911).
10. BORSSON, H. e H. Wasteneys - Biochem. J. 19, 1123 (1925).
11. WATNABE, J. - J. Biochem. 16, 163 (1932).
12. FRANKEL, N. e A. Katchalsky - Biochem. J. 31, 1595 (1937).
13. FRANKEL, N. e A. Katchalsky - Biochem. J. 35, 1024 (1941).
14. FRANKEL, N. e A. Katchalsky - Biochem. J. 35, 1034 (1941).
15. HAUGAARD, G.; L. Tunerman e H.J. Silvestri - J. Am. Chem. Soc. 73, 4594 (1951).

16. LEWIS, V.H.; W.B. Esselen Jr. e C.R. Wollers - Ind.
Eng. Chem. 41, 2591 (1949).
17. LIVINGSTON, G.M. - J. Am. Chem. Soc. 75, 1342 (1953).
18. WOLFRUM, H.L.; L.M. Cavalieri e D.R. Cavalieri - J.
Am. Chem. Soc. 69, 2411 (1947).
19. ELL, T.L.; H.L. Wolfson e A.W. Lager - J. Am. Chem.
Soc. 72, 5090 (1950).
20. WOLFRUM, H.L. e C.S. Rooney - J. Am. Chem. Soc. 75,
5435 (1953).
21. WOLFRUM, H.L.; D.R. Kolb e A.W. Lager Jr. - J. Am.
Chem. Soc. 75, 3471 (1953).
22. SCHROEDER, L.J.; L. Iacobellis e A.E. Smith - J.
Biol. Chem. 212, 973 (1955).
23. SMIRNOV, V.A. e K.A. Geispits - Biokhimiya 21, 633
(1956) (cf. Ellis C.F. Adv. Carboh. Chem. 14,
87 (1959)).
24. OLCOTT, H.D. e H. J. Dutton - Ind. Eng. Chem. 37,
1119 (1945).
25. GRAHAM, I.D.; P.Y. Hsu e J. Mc Ginnis - J. Science
110, 217 (1949).
26. KIKUDA, H. e Y. Sakurai - Schokuryo Kenkyusho Kenkyu
Bokoku 12, 48 (1957).
27. WILLITS, C.C.; J.C. Underwood e R. G. Iento Jr. e C.
Ricciuti - Food Research 23, 61 (1958).
28. SCHWIMMER, S. e H. S. Olcott - J. Am. Chem. Soc. 75,
4855 (1953).
29. REYNOLDS, T.M. - Australian J. Chem. 12, 265 (1959).
30. FOLBERGAND, A. - Proc. European Brewery Conv. 1963
pg. 126.
31. KATO, H. - Bull. Agr. Chem. Soc. Japan 20, 273 (1956)

32. IMOTO, H.; H. Yamamoto e H. Fuzimaki - Agr. Biol. Chem. 33, (6), 939 (1969).
33. SPARK, A.N. - J. Sci. Ed. Agric. 20, 308 (1969).
34. BURTON, H.S. e D.J. Mc Veony - Nature 197, 266(1963).
35. SAUNDERS, J. e R. Jervis - J. Sci. Ed. Agric. 17, 245 (1966).
36. SONG, P.S. e C.O. Chichester - J. Food Sci. 31, 906 (1966).
37. SONG, P.S. e C.O. Chichester - J. Food Sci. 31, 914 (1966).
38. MC VEENY, D.J.; D.O. Biltcliffe; R.O.E. Powell e A. A. Spark - J. Food Sci. 34, 641 (1969).
39. BURTON, H.S.; D.J. Mc Veeny e D.O. Biltcliffe - J. Sci. Ed. Agric. 12, 911 (1963).
40. MC VEENY, D.J. e H.S. Burton - J. Sci. Ed. Agric. 14, 291 (1963).
41. HEYNE, R.; G. Muller e E. Paulsen - Liebigs Ann. Chem. 705, 202 (1967).
42. FOMERAY, J.; A. Johnson e J.A. Shellenberger - J. Food Sci. 27, 350 (1962).
43. SHAW, F.E.; J. H. Tatum e R.E. Berry - J. Agr. Food Chem. 16, 979 (1968).
44. TATUM, J. H.; F.E. Shaw e R.E. Berry - J. Agr. Food Chem. 15, 773 (1967).
45. SHAW, F.E.; J.H. Tatum e R.E. Berry - Abst. D. 44, ACS, 152nd Meeting September 1966.
46. KIMURA, I. e Y. Sakurai - Rosankakogijyuchu - Kenkyu Kaish - 4 (6), 219 (1957).
47. ARROYO, P.E. e D.A. Lillard - J. Food Sci. 35, 769 (1970).

48. FERRIT, D.; J. Adrien - Cahier Nutrit. Dietetique 2,
31 (1967).
49. DIFREY, J.P. e W. Pigman - Adv. Ed. Res. 3, 241
(1951).
50. HODGE, J.E. - Jr. Agr. Ed. Chem. 1, 928 (1953).
51. HODGE, J.E. - Adv. Carbohy. Chem. 10, 169 (1955).
52. ELLIS, G.P. - Adv. Carbohy. Chem. 14, 63 (1959).
53. REYNOLDS, T.H. - Adv. Ed. Res. 12, 1 (1963).
54. REYNOLDS, T.H. - Adv. Ed. Res. 14, 167 (1965).
55. REYNOLDS, T.H. - Symposium on Foods; Carbohydrates
and their roles. Oregon State Univ. 1969 -
AVI PUBLIS. Co. pg. 219
56. STALL, E. - Thin Layer Chromatography pg. 465.
Springer - Verlag - 1962.
57. SOMOGYI, M. - J. Biol. Chem. 160, 61 (1945).
58. NELSON, I. - J. Biol. Chem. 153, 375 (1944).
59. COLWICK, S.P.; F.C. Kaplan - Methods in Enzymology
pg. 138 a 146 - Academic Press Inc. 1955.
60. SHRIER, R.L.; R.C. Fuson - The systematic identifi-
cation of Organic Compounds. pg. 171; John
Wiley e Sons Inc. 1948.
61. JET, E.F.L.J. - J. of Chromatog. 2, 291 (1962).
62. HAWORTH, W.F.; W.G.L. Jones - J. Chem. Soc. (1944)
667 (1944).
63. BOBBIO, F.C. - Trabalho apresentado na 23ª reunião
da S.B.B.C. - Curitiba, 1971.
64. MCLEWY, - HUGHES, E. A. - Trans. Faraday Soc. 25,
503 (1929).

9 - AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Prof. Dr. André Tosello, diretor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos pelas facilidades que nos proporcionou para a realização deste trabalho; ao Conselho Nacional de Pesquisas e a Organização dos Estados Americanos pelos auxílios concedido; a todos que direta ou indiretamente nos facilitarem a execução deste trabalho.

GRÁFICO 1

curva 1 - maltose, glicina, H_2O , pH 6,2, 47°C

curva 2 - sacarose, glicina, H_2O , pH 6,2, 47°C

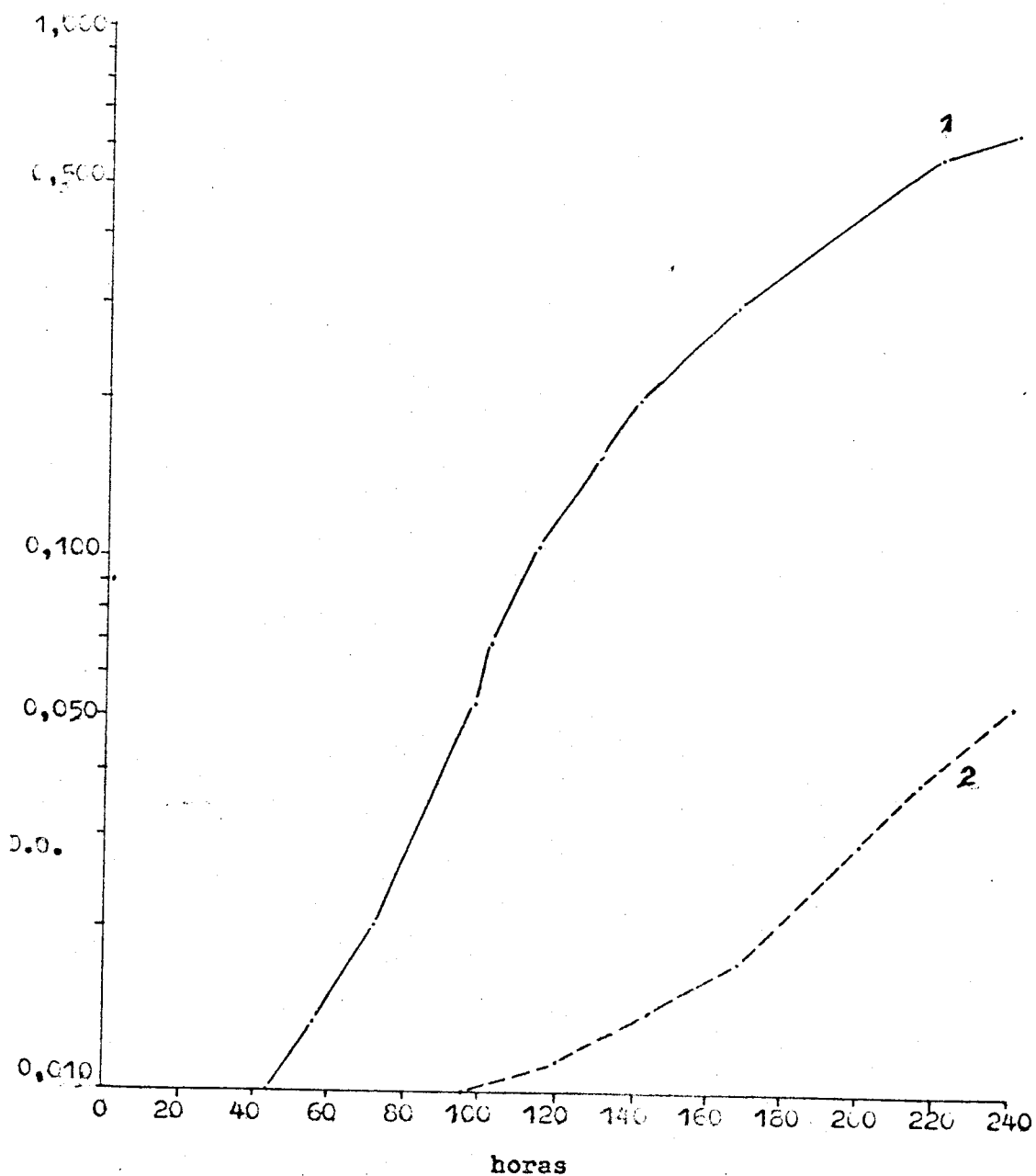


GRÁFICO 2

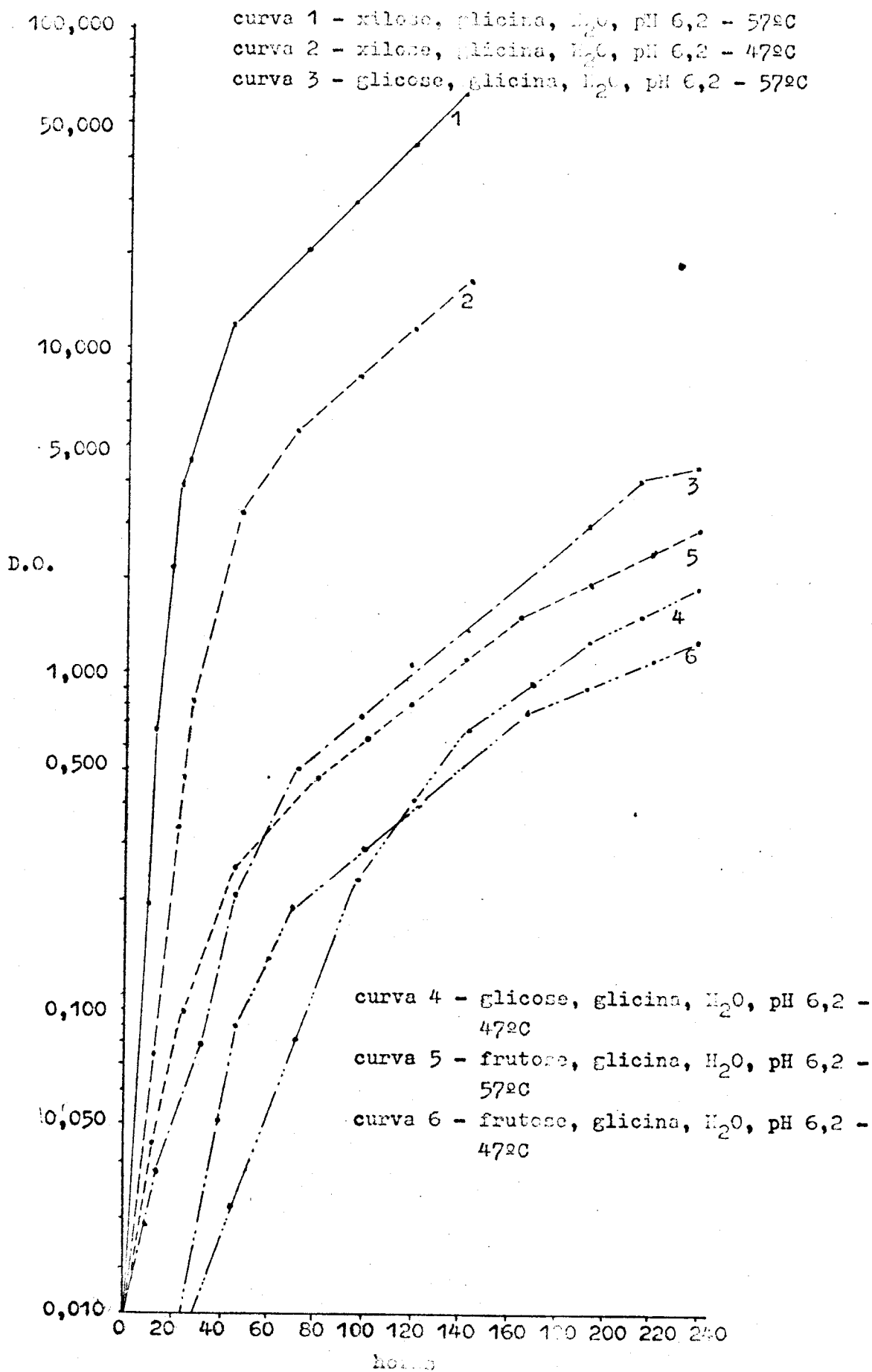


GRÁFICO 3

- curva 1 - xilose, glicina, H_2O , pH 6,2 - 47°C
 curva 2 - xilose, glicina, H_2O , pH 6,2 - 57°C
 curva 3 - xilose, glicina, tampão fosfato, pH 6,2 - 47°C
 curva 4 - xilose, glicina, tampão citrato, pH 6,2 - 47°C
 curva 5 - xilose, glicina, tampão itálico, pH 6,2 - 47°C

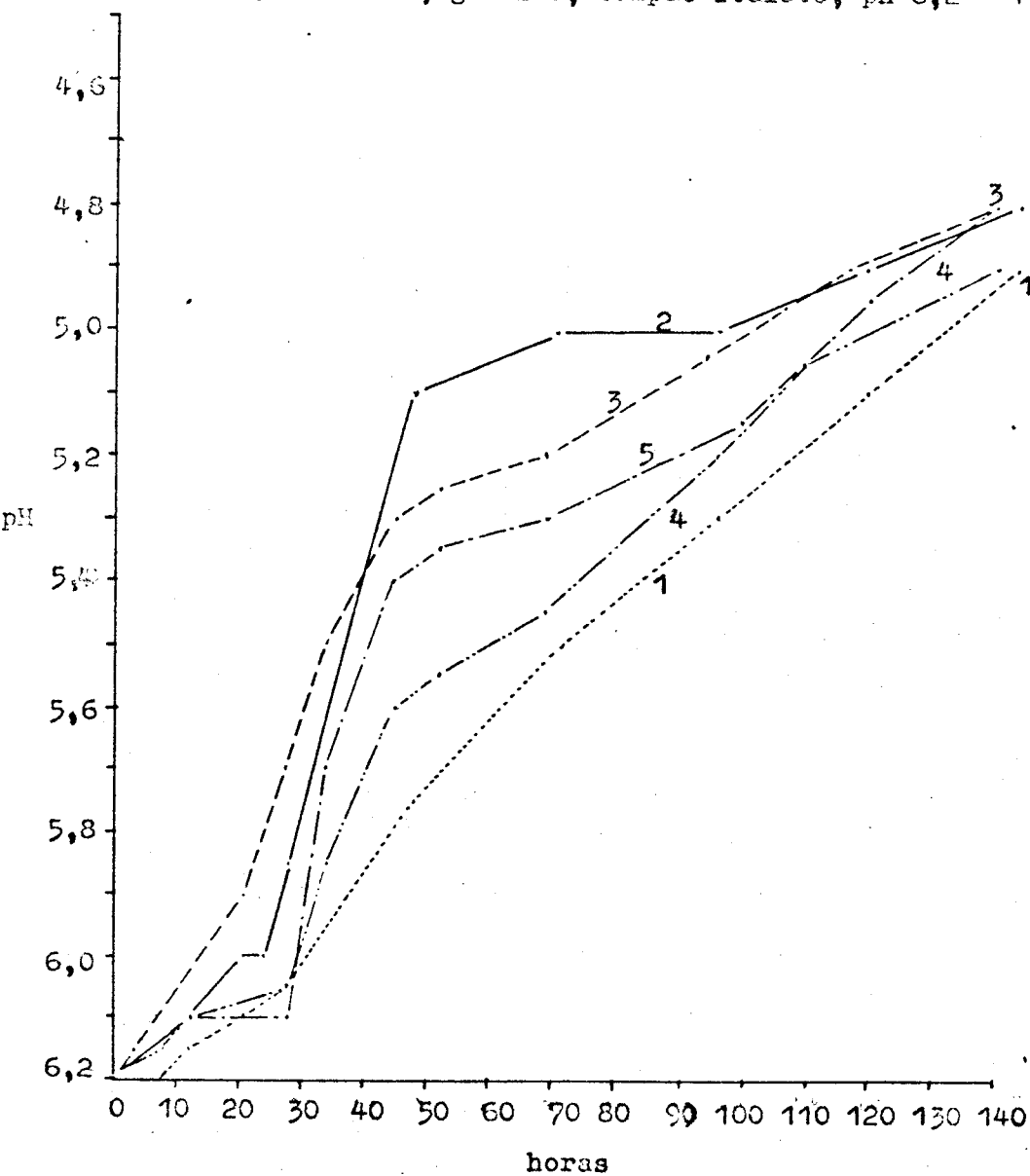


GRÁFICO 4

- curva 1 - glicose, glicina, H_2O , pH 6,2 - 57°C
- curva 2 - glicose, glicina, H_2O , pH 6,2 - 47°C
- curva 3 - glicose, glicina, tampão fosfato, pH 6,2 - 47°C
- curva 4 - glicose, glicina, tampão citrato, pH 6,2 - 47°C
- curva 5 - glicose, glicina, tampão itálico, pH 6,2 - 47°C

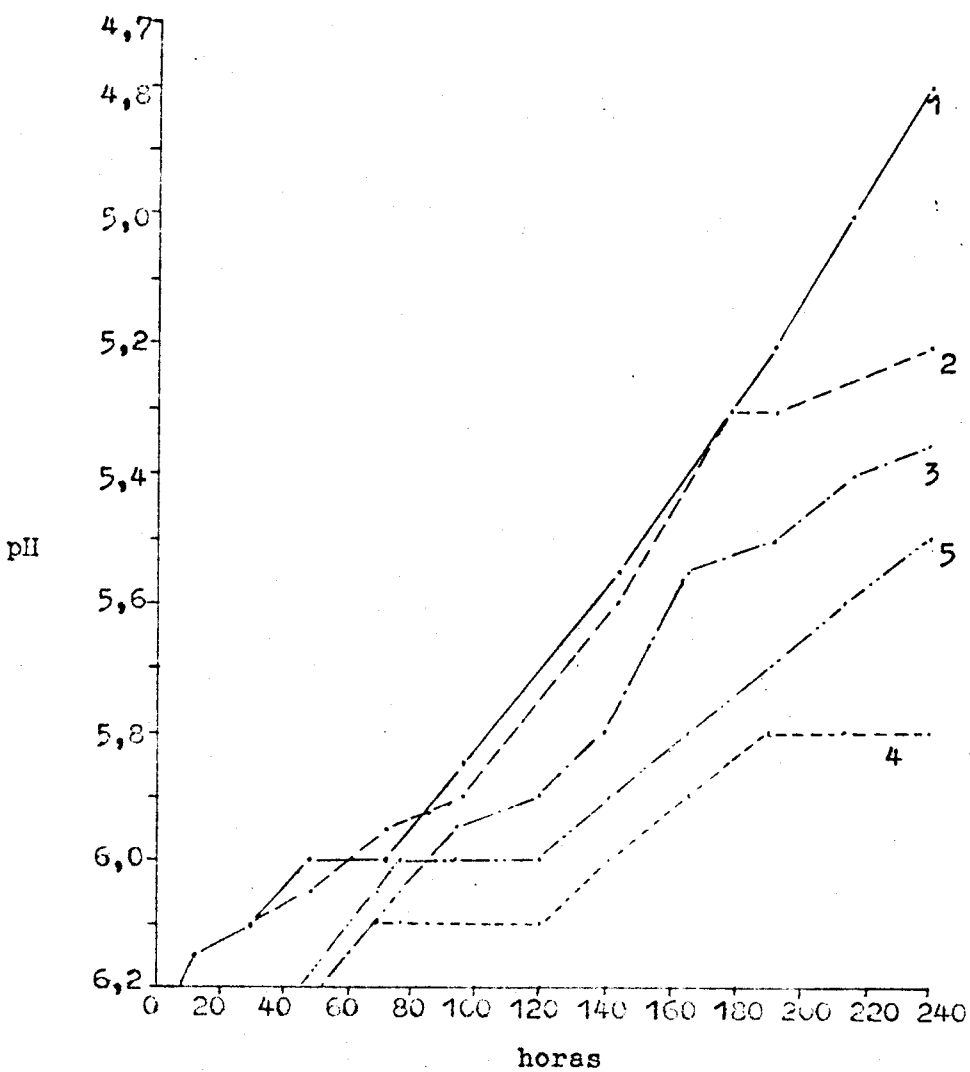


GRÁFICO 5

- curva 1 - frutose, glicina, H_2O , pH 6,2 - 47°C
- curva 2 - frutose, glicina, H_2O , pH 6,2 - 57°C
- curva 3 - frutose, glicina, tampão fosfato, pH 6,2 - 47°C
- curva 4 - frutose, glicina, tampão citrato, pH 6,2 - 47°C
- curva 5 - frutose, glicina, tampão itálico, pH 6,2 - 47°C

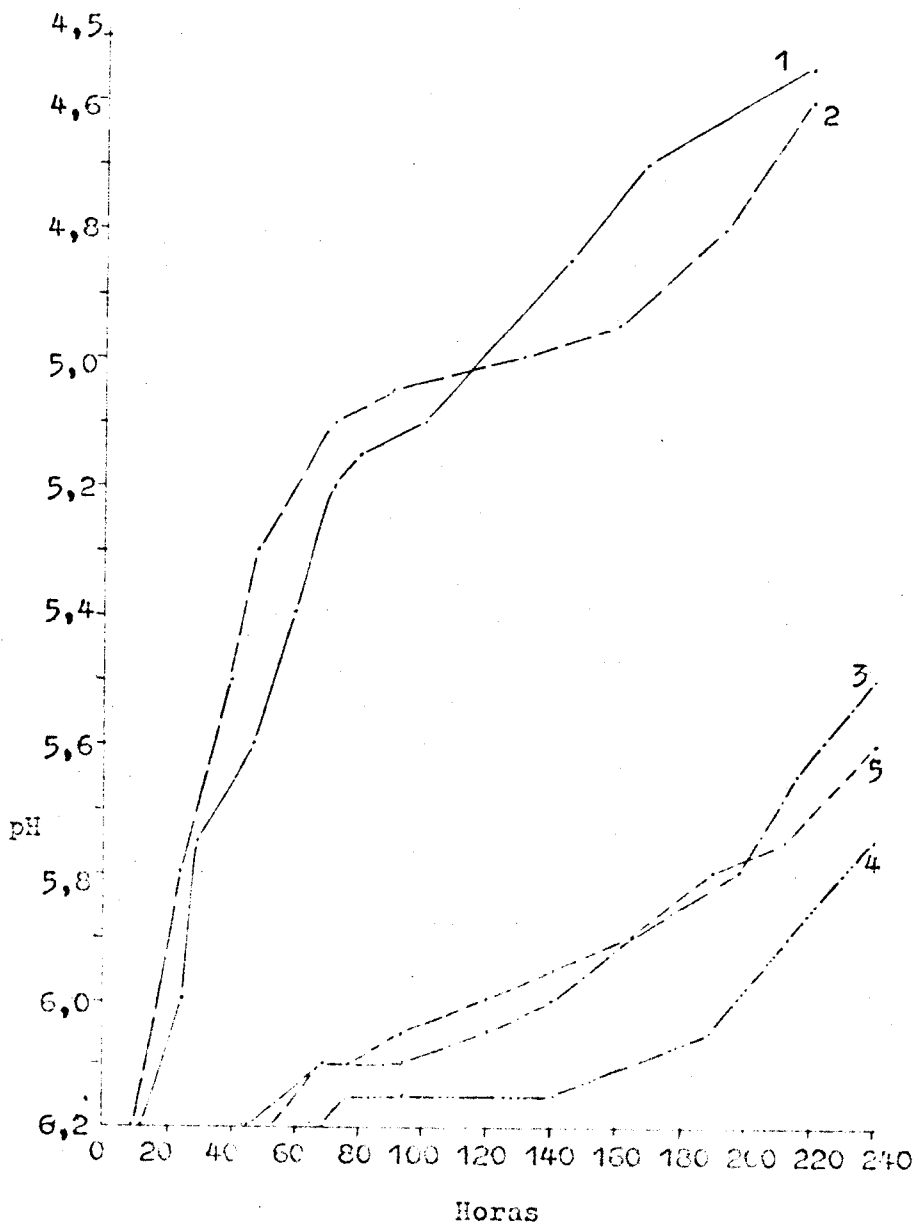


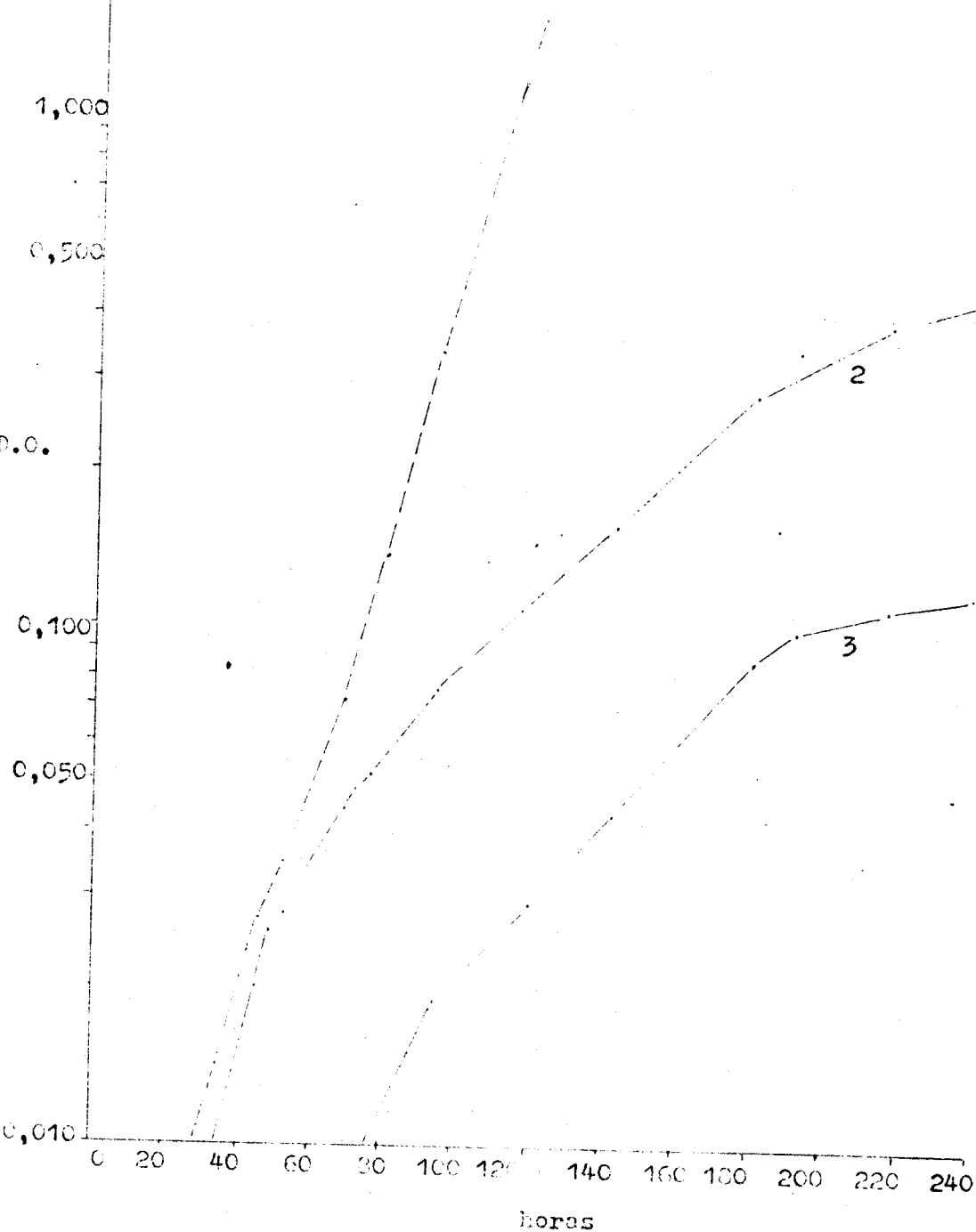
GRÁFICO 6

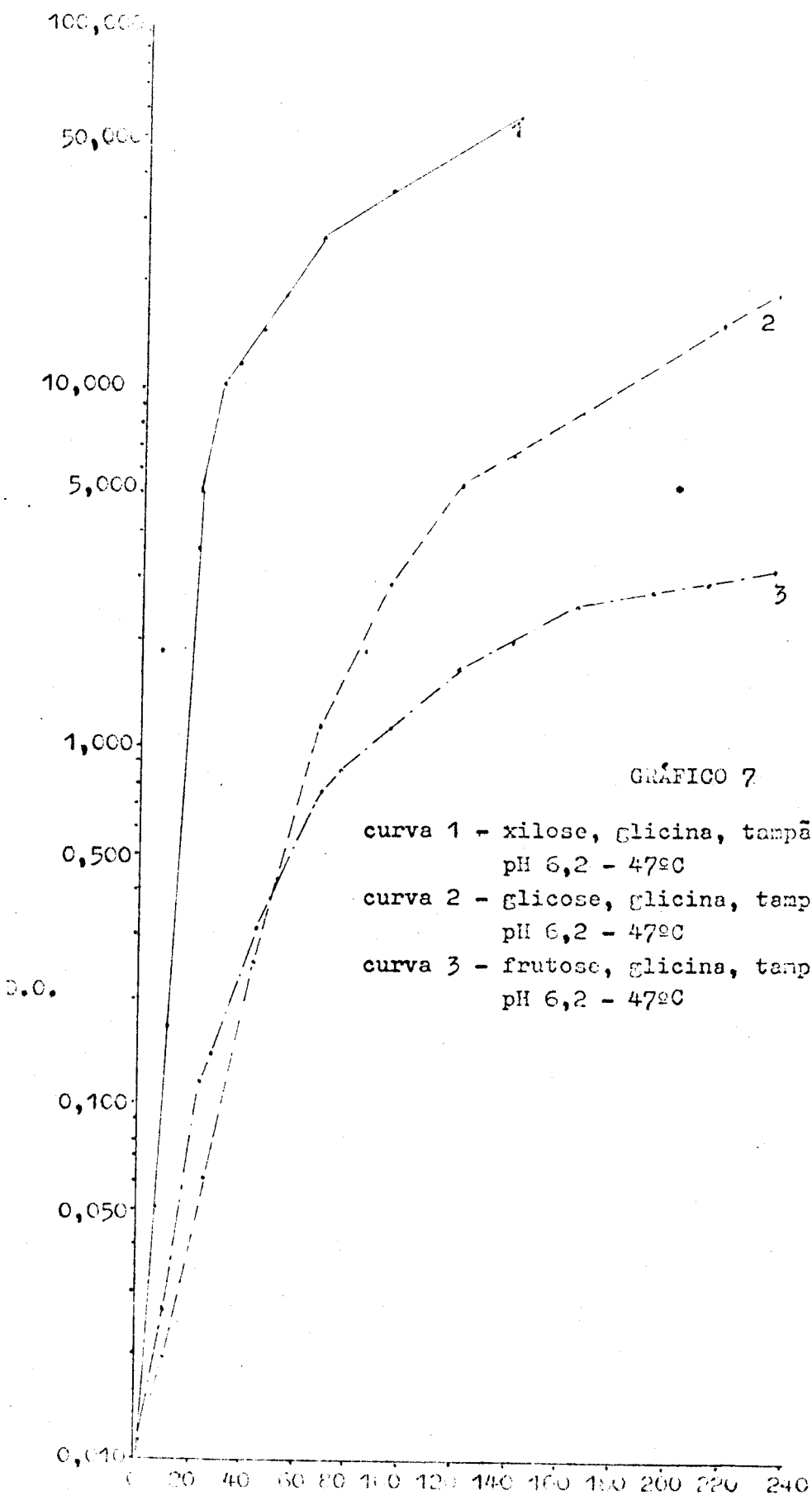
curva 1 - xilose, glicina, H_2O ,
pH 2,2 - 47°C

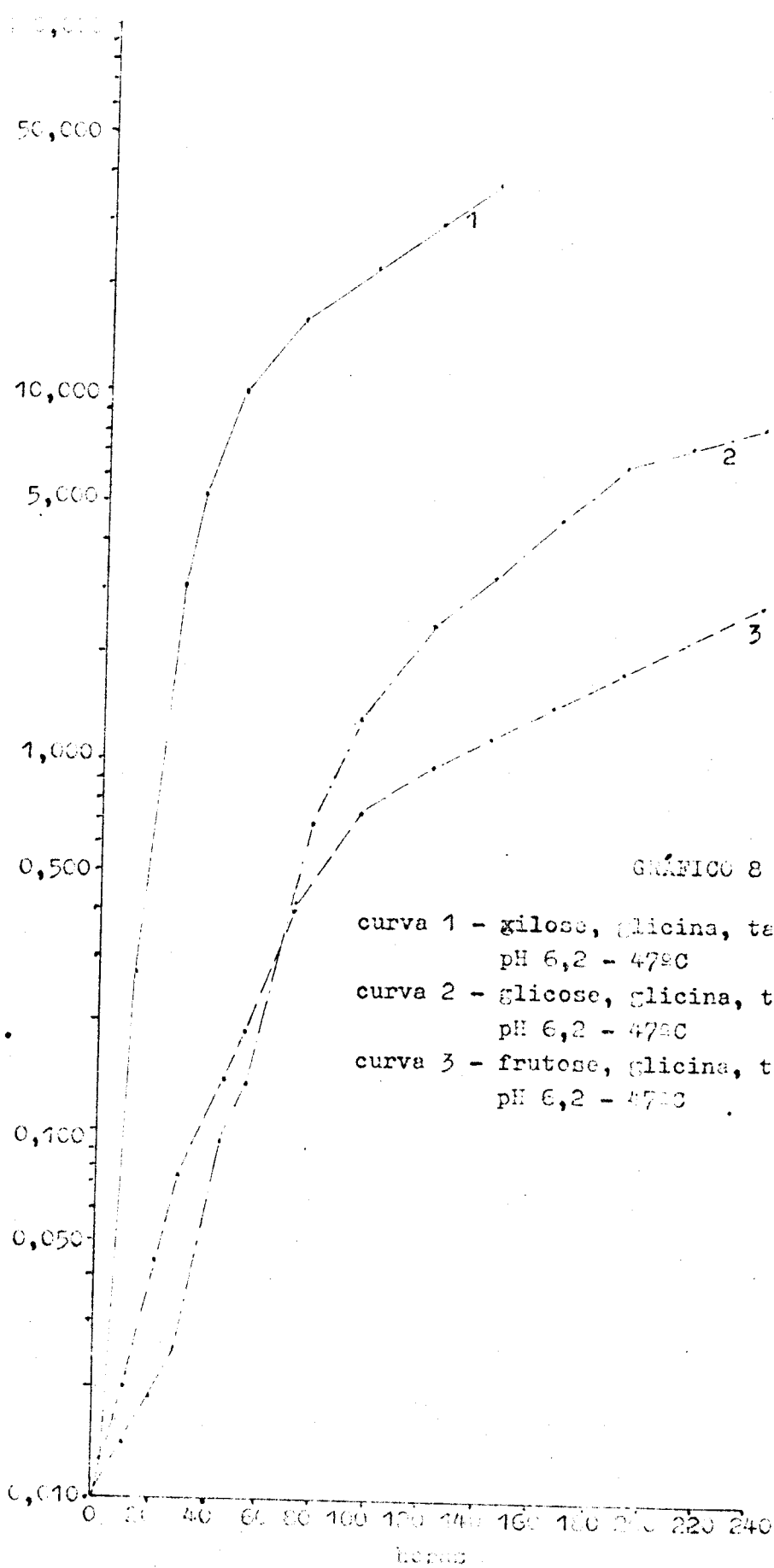
1

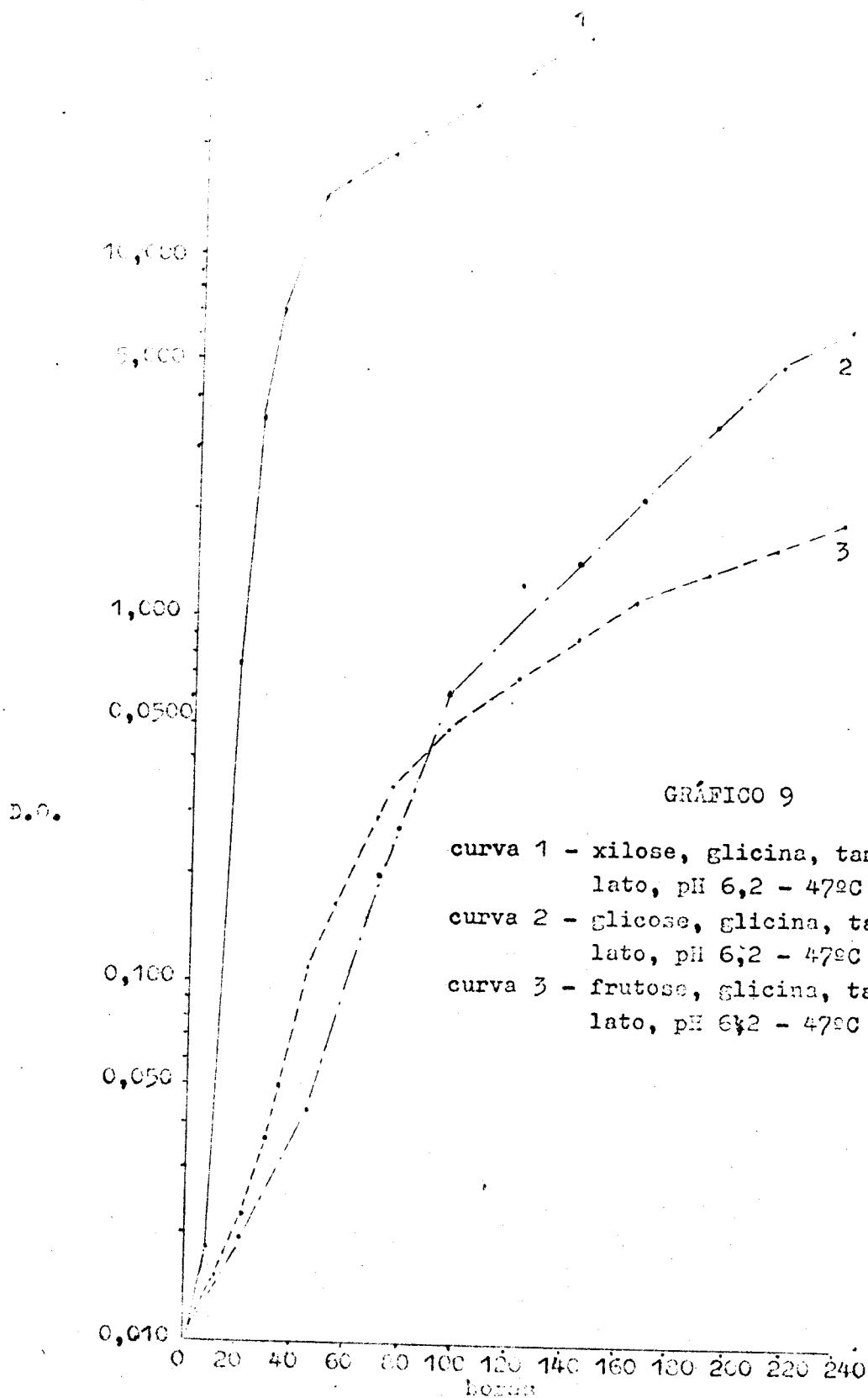
curva 2 - frutose, glicina, H_2O ,
pH 2,2 - 47°C

curva 3 - glicose, glicina,
 H_2O , pH 2,2 - 47°C









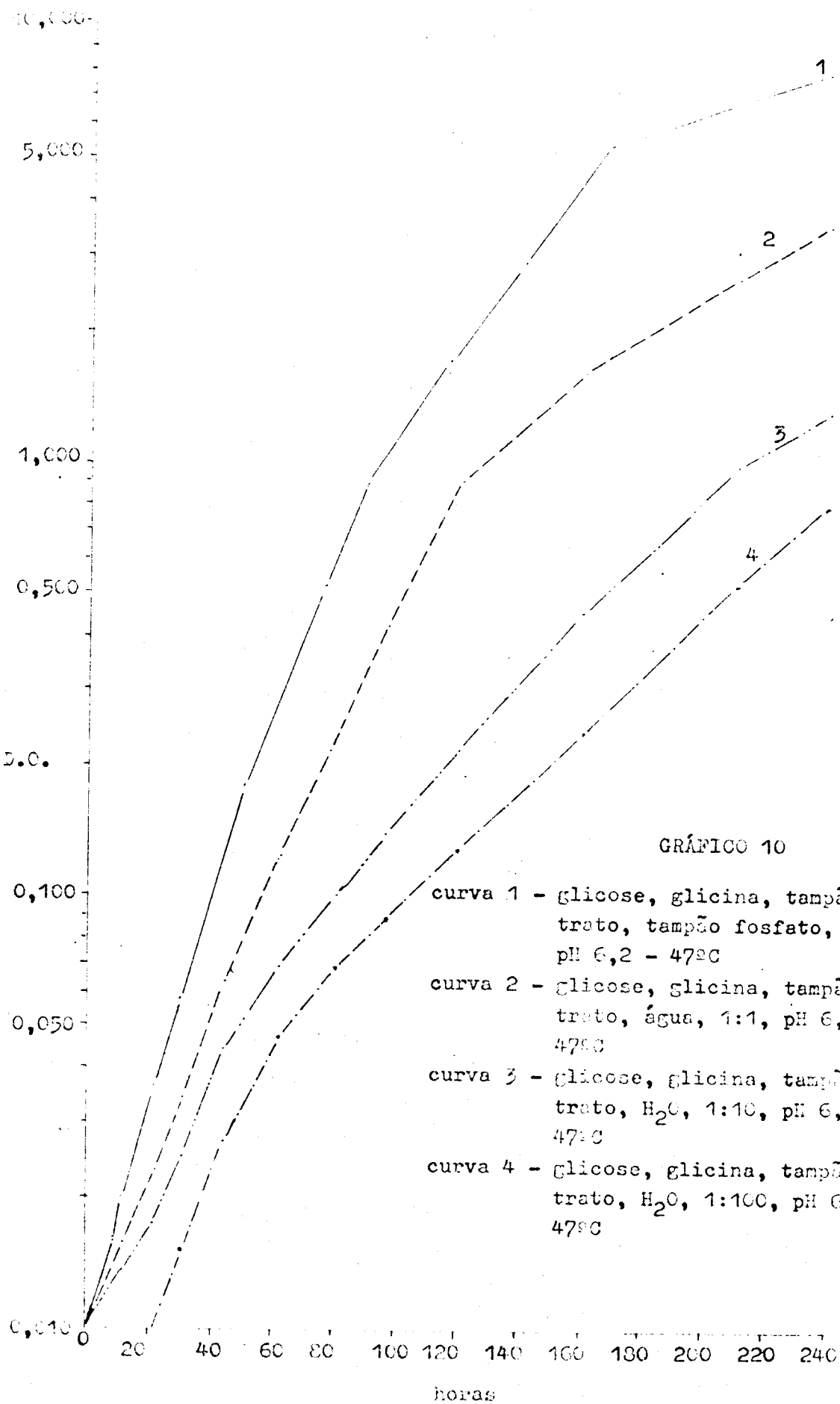
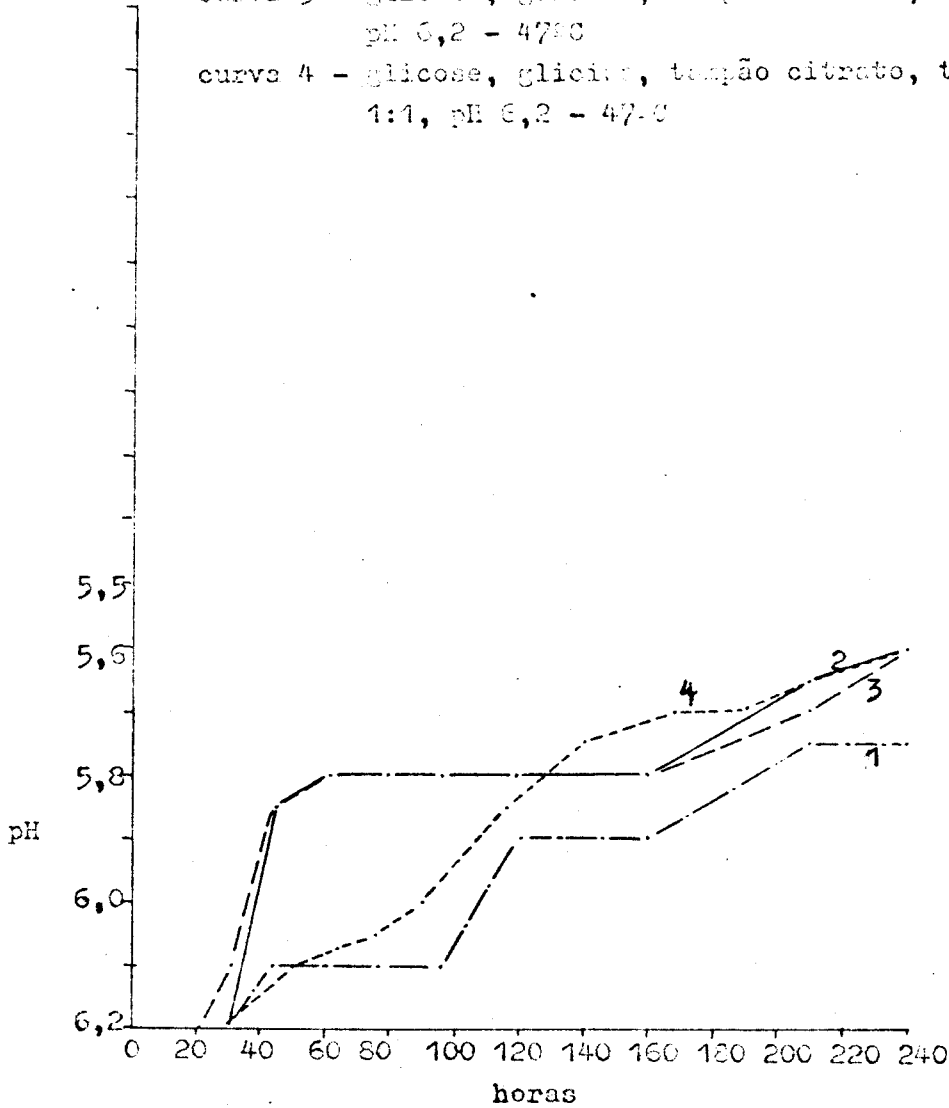


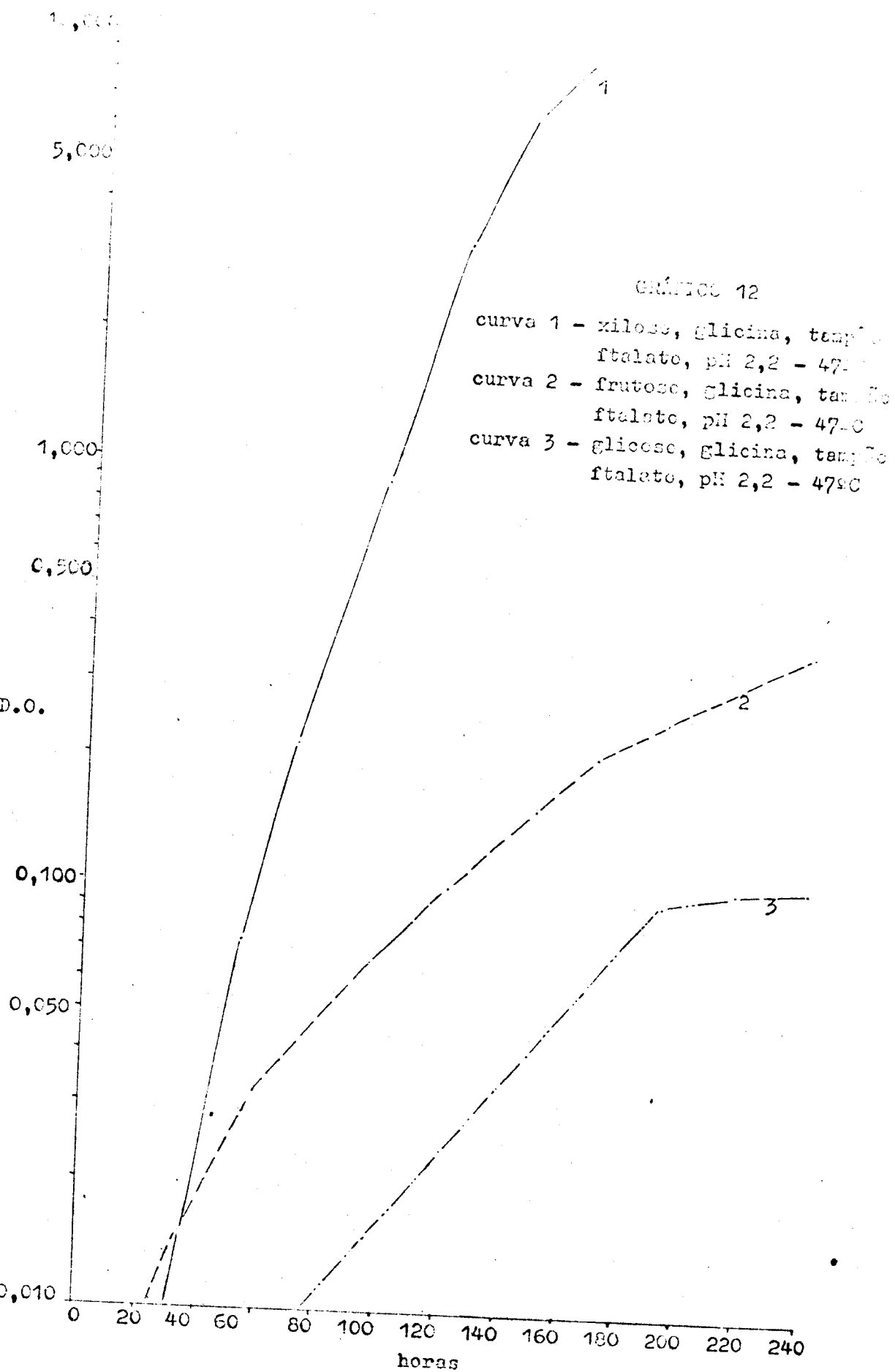
GRÁFICO 10

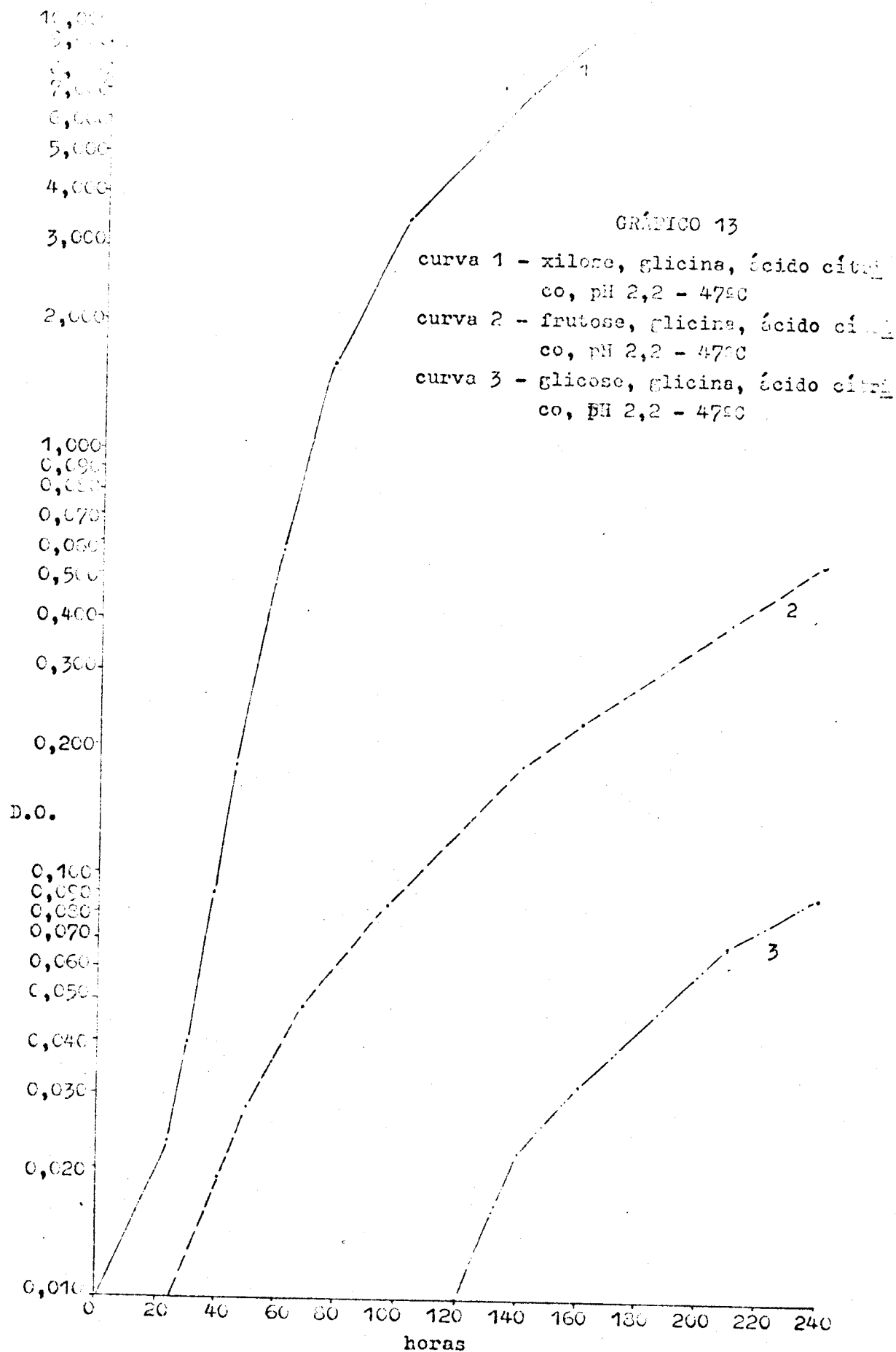
- curva 1 - glicose, glicina, tampão ci
trato, tampão fosfato, 1:1,
pH 6,2 - 47°C
- curva 2 - glicose, glicina, tampão ci
trato, água, 1:1, pH 6,2 -
47°C
- curva 3 - glicose, glicina, tampão ci
trato, H₂O, 1:10, pH 6,2 -
47°C
- curva 4 - glicose, glicina, tampão ci
trato, H₂O, 1:100, pH 6,2 -
47°C

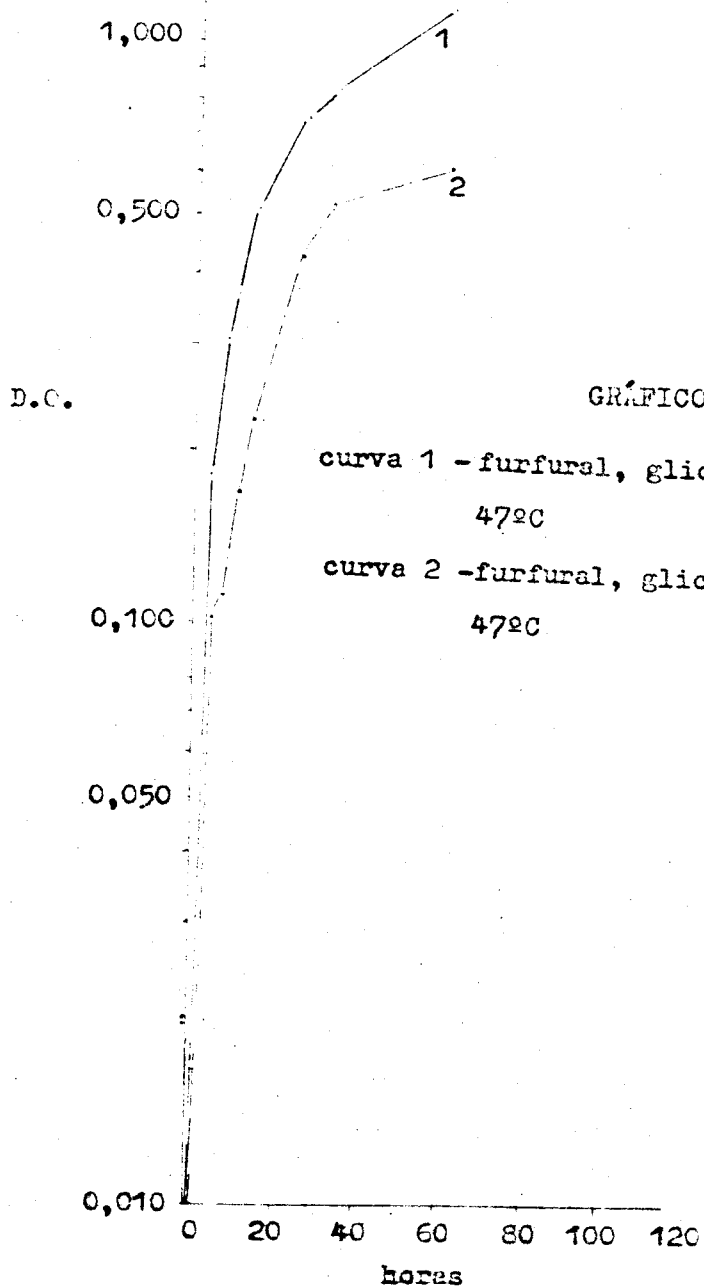
GRÁFICO 11

- curva 1 - glicose, glicina, tampão citrato, 1:1, H_2O , pH 6,2 - 47°C
- curva 2 - glicose, glicina, tampão citrato, 1:10, H_2O , pH 6,2 - 47°C
- curva 3 - glicose, glicina, tampão citrato, 1:100, H_2O , pH 6,2 - 47°C
- curva 4 - glicose, glicina, tampão citrato, tampão fosfato, 1:1, pH 6,2 - 47°C









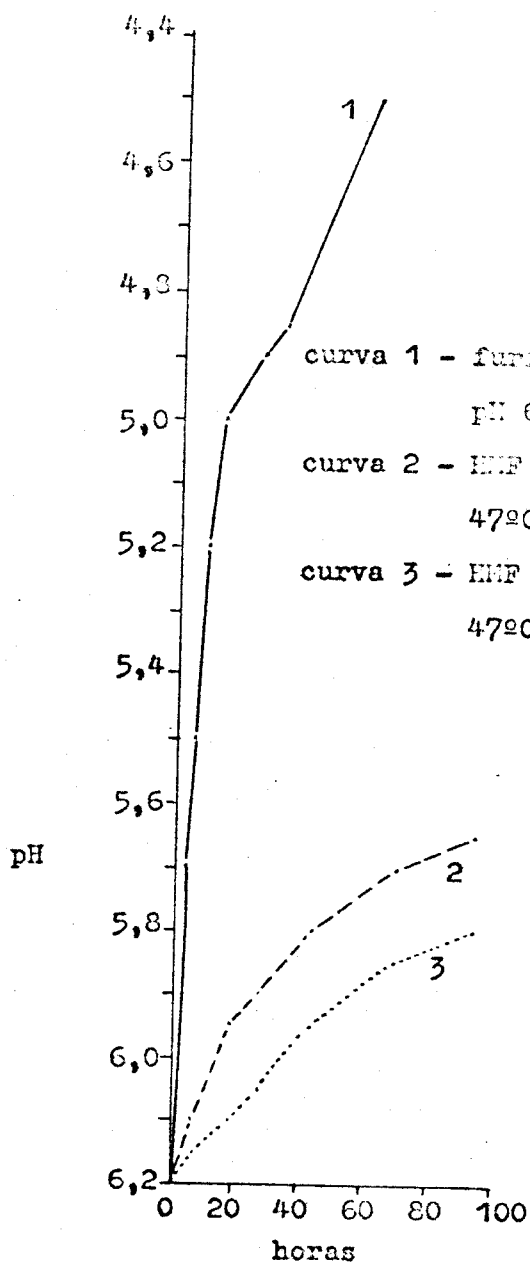
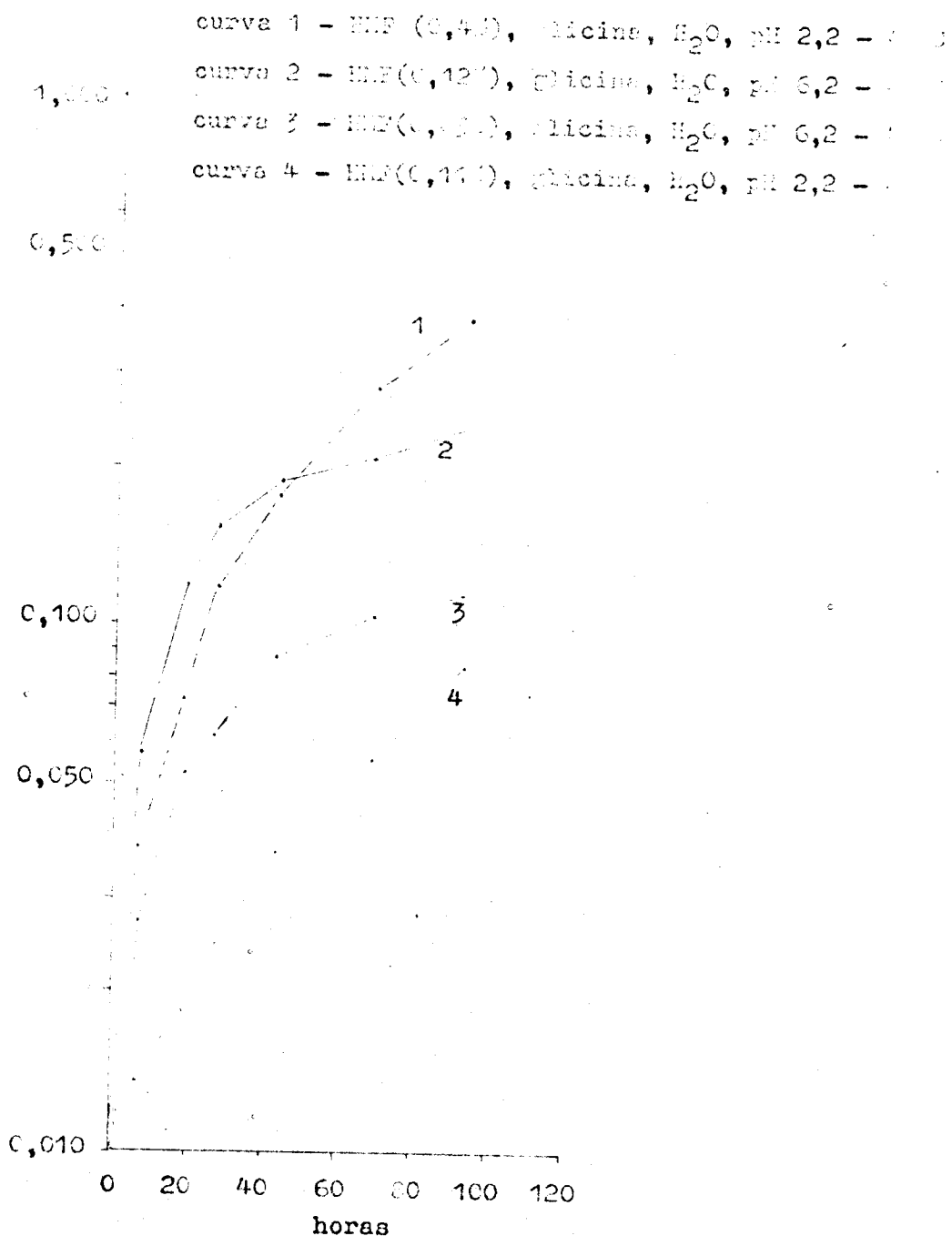


GRÁFICO 10



Apêndice I

Cálculo do efeito de temperatura: $\frac{K_{57^{\circ}}}{K_{47^{\circ}}}$

XILOSE : - $K_{57^{\circ}} = 0,3310$ entre 8h e 48h.

$K_{57^{\circ}} = 0,5246$ entre 48h e 144h.

$K_{47^{\circ}} = 0,0303$ entre 12h e 48h.

$K_{47^{\circ}} = 0,1442$ entre 48h e 144h.

$$\frac{K_{57^{\circ}}}{K_{47^{\circ}}} = \underline{4,1} \text{ e } \underline{3,6}$$

GLICOSE: - $K_{57^{\circ}} = 0,0073$ entre 6h e 72h.

$K_{57^{\circ}} = 0,0236$ entre 72h e 216h.

$K_{47^{\circ}} = 0,0033$ entre 34h e 96h.

$K_{47^{\circ}} = 0,0113$ entre 96h e 192h.

$$\frac{K_{57^{\circ}}}{K_{47^{\circ}}} = \underline{2,2} \text{ e } \underline{2,1}$$

FRUTOSE: - $K_{57^{\circ}} = 0,0074$ entre 6h e 48h.

$K_{57^{\circ}} = 0,0109$ entre 48h e 168h.

$K_{47^{\circ}} = 0,0037$ entre 26h e 72h.

$K_{47^{\circ}} = 0,0058$ entre 72h e 168h.

$$\frac{K_{57^{\circ}}}{K_{47^{\circ}}} = \underline{2,0} \text{ e } \underline{1,9}$$

Apêndice II

Cálculo do efeito de pH

XILOSE : - pH 2,2: 45h e 141h.

D.O.: 0,027 e 5,07 ; $K_{2,2} = 0,0525$

XILOSE : - pH 6,2: 48h e 144h.

D.O.: 3,150 e 17,000 ; $K_{6,2} = 0,1442$

$$\frac{K_{6,2}}{K_{2,2}} = \underline{2,7}$$

GLICOSE: - pH 2,2: 94h e 180h.

D.O.: 0,019 e 0,088 ; $K_{2,2} = 0,0002$

GLICOSE: - pH 6,2: 96h e 192h.

D.O.: 0,215 e 1,200 ; $K_{6,2} = 0,0113$

$$\frac{K_{6,2}}{K_{2,2}} = \underline{14,1}$$

FRUTOSE: - pH 2,2: 48h e 180h.

D.O.: 0,026 e 0,289 ; $K_{2,2} = 0,0018$

FRUTOSE: - pH 6,2: 72h e 168h.

D.O.: 0,183 e 0,741 ; $K_{6,2} = 0,0058$

$$\frac{K_{6,2}}{K_{2,2}} = \underline{3,2}$$

Apêndice III

Cálculo do efeito de ânion a pH 6,2: $\frac{K_{\text{ânion}}}{K_{H_2O}}$

XILOSE : - $K_{PO_4} = 0,416$ entre 3h e 69h.

$K_{PO_4} = 0,386$ entre 69h e 141h.

$$\frac{K_{PO_4}}{K_{H_2O} \text{ 6,2}} = \underline{5,2} \qquad \frac{K_{PO_4}}{K_{H_2O} \text{ 6,2}} = \underline{2,7}$$

K citrato = 0,164 entre 3h e 34h.

K citrato = 0,311 entre 34h e 69h.

K citrato = 0,293 entre 69h e 141h.

$$\frac{K \text{ citrato}}{K_{H_2O} 6,2} = \underline{2,0} ; \frac{K \text{ citrato}}{K_{H_2O} 6,2} = \underline{2,2} ; \frac{K \text{ citrato}}{K_{H_2O} 6,2} = \underline{2,0}$$

K ftalato = 0,322 entre 3h e 45h.

K ftalato = 0,284 entre 45h e 141h.

$$\frac{K \text{ ftalato}}{K_{H_2O} 6,2} = \underline{4,0} ; \frac{K \text{ ftalato}}{K_{H_2O} 6,2} = \underline{2,0}$$

GLICOSE: - K_{PO_4} = 0,0259 entre 6h e 76h.

K_{PO_4} = 0,0727 entre 76h e 192h.

$$\frac{K_{PO_4}}{K_{H_2O} 6,2} = \underline{7,8} ; \frac{K_{PO_4}}{K_{H_2O} 6,2} = \underline{6,4}$$

K citrato = 0,0103 entre 10h e 76h.

K citrato = 0,0514 entre 76h e 189h.

$$\frac{K \text{ citrato}}{K_{H_2O} 6,2} = \underline{3,1} ; \frac{K \text{ citrato}}{K_{H_2O} 6,2} = \underline{4,5}$$

K ftalato = 0,0076 entre 10h e 94h.

K ftalato = 0,0289 entre 94h e 189h.

$$\frac{K \text{ ftalato}}{K_{H_2O} 6,2} = \underline{2,3} ; \frac{K \text{ ftalato}}{K_{H_2O} 6,2} = \underline{2,5}$$

FRUTOSE: - K_{PO_4} = 0,012 entre 6h e 76h.

K_{PO_4} = 0,015 entre 76h e 192h.

$$\frac{K_{PO_4}}{K_{H_2O} 6,2} = \underline{3,2} ; \frac{K_{PO_4}}{K_{H_2O} 6,2} = \underline{2,6}$$

K citrato = 0,0081 entre 5h e 94h.

K citrato = 0,0105 entre 94h e 189h.

$$\frac{K_{\text{citrato}}}{K_{\text{H}_2\text{O}} 6,2} = 2,2 \quad ; \quad \frac{K_{\text{citrato}}}{K_{\text{H}_2\text{O}} 6,2} = \underline{1,8}$$

K ftalato = 0,0058 entre 10h e 94h.

K ftalato = 0,0091 entre 94h e 213h.

$$\frac{K_{\text{ftalato}}}{K_{\text{H}_2\text{O}} 6,2} = \underline{1,6} \quad ; \quad \frac{K_{\text{ftalato}}}{K_{\text{H}_2\text{O}} 6,2} = \underline{1,6}$$