

## Área: Engenharia de Alimentos

# ORDEM GLOBAL DA REAÇÃO DE MAILLARD UTILIZANDO SOLUÇÕES MODELO

**Vandré Barbosa Brião\*, Ligia Follmer, Marília de Souza, Vera Maria Rodrigues**

*Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo*

*\*E-mail: vandre@upf.br*

## RESUMO

A cor dos alimentos é um importante atributo para a escolha do consumidor. O escurecimento é desejável em alguns alimentos pela cor e pelo aroma produzidos (como nos casos do pão e carne assada), mas, é indesejável em outros (como no tratamento térmico de leite). A reação de Maillard é influenciada pela natureza dos açúcares e aminoácidos envolvidos, bem como pelo pH e temperatura do processo. O objetivo do trabalho foi avaliar o escurecimento de soluções modelo contendo açúcares e aminoácidos devido a reação de Maillard em pH neutro e ácido, obtendo as taxas de reação e avaliando a cinética da mesma. Dois tipos de açúcares (glicose e lactose) foram misturados com dois tipos de aminoácidos (glicina ou glutamato de sódio) em pH 7,0 e pH 5,1. As soluções (2 mol/L) foram aquecidas em água fervente (97°C), e a absorbância medida (420 nm) em intervalos de tempo. A glicose apresentou maior taxa de reação que a lactose, enquanto que entre os aminoácidos a glicina reagiu com intensidade semelhante ao glutamato. A redução do pH do meio retarda a reação, e o escurecimento demonstrou menor taxa de reação em pH ácido.

**Palavras-chave:** reação de Maillard, cinética de reação, taxa de reação.

## 1 INTRODUÇÃO

Muitos alimentos são submetidos ao tratamento térmico para serem conservados, e o aquecimento pode levar a duas importantes reações na tecnologia de alimentos: a caramelização e a reação de Maillard, também chamadas de reações de escurecimento não-enzimático.

Estas reações têm impactos positivos em alguns alimentos, como no desenvolvimento da cor e aroma da carne assada, café e pão (BOSTAN e BOYACIOGLU, 1997; CARABASA e IBARZ, 2000), mas também levam a efeitos negativos, como o bloqueio ou a redução da

biodisponibilidade de aminoácidos essenciais e da atividade de enzimas (BOEKEL, 1998), formação de mutagênicos (SHIBAMOTO, 1982, apud BOEKEL, 1998) e formação indesejável de cor, como por exemplo, em laticínios tratados termicamente, como leite UHT ou leite em pó (MORALES e BOEKEL, 1999).

A cor é um importante atributo em produtos alimentícios, uma vez que é imediatamente percebida pelos consumidores, e pode indicar a extensão das reações de Maillard e de caramelização que ocorreram naquele produto (QUINTAS et al., 2007).

A caramelização ocorre em sistemas contendo carboidratos redutores, levando, por mecanismos diferentes da reação de Maillard, a compostos que conferem coloração marrom e aroma característicos a muitos alimentos (CLAUDE e UBBINK, 2006). No entanto, a reação de caramelização necessita de maior energia de ativação, de modo que condições extremas de temperatura (maior que 120°C) e pH ( $\text{pH} < 3$  ou  $\text{pH} > 9$ ) precisam ser aplicadas para causar a caramelização de açúcares (MORALES e BOEKEL, 1999)

A reação de Maillard é, sem dúvida, uma das mais complexas reações envolvendo constituintes de alimentos de baixo peso molecular, sendo de grande importância para qualidade de alimentos (SHIPAR, 2006), e em particular, para alimentos aquecidos que possuam em sua constituição açúcares redutores e proteínas (DAVIES et al., 1997, BOEKEL, 2006; BOURAIS et al., 2006; CARABASA e IBARZ, 2000). A reação de Maillard ocorre entre açúcares redutores e grupamentos amínicos, sendo um processo de escurecimento não-enzimático que produz um rearranjo complexo de açúcar-proteína que influencia a cor e sabor do produto. Esta reação foi descoberta pelo bioquímico francês Louis Maillard em 1912, e devido à sua complexidade, a mesma não está totalmente esclarecida (CHEVALIER et al., 2001, QIU et al., 2005).

A reação de Maillard ocorre em três estágios: em um primeiro, há a condensação entre um açúcar redutor e um grupamento amínico, formando os produtos do rearranjo de Amadori (quando o açúcar é uma aldose) ou levando aos produtos de Heyns (quando o açúcar é uma cetose); estes dois compostos levam ao início da etapa intermediária, ocorrendo a fragmentação dos compostos de Amadori e formação de produtos sem coloração, e liberando o grupamento amínico; no estágio final, há a desidratação, ciclização e reações de polimerização nas quais há a participação dos grupos amínicos, formando pigmentos poliméricos de coloração marrom, como as melanoidinas. Nesta etapa final ocorre a formação da coloração marrom característica com mais intensidade (BOEKEL, 2006; BOURAIS et al.,

2006), que pode ser medida por espectrofotometria na faixa entre 400 nm e 460 nm (QUINTAS et al., 2007).

As diversas rotas que a reação de Maillard pode seguir dependem fortemente das condições do meio, como a temperatura, o pH e a composição química dos sistemas (CARABASA e IBARZ, 2000). O estudo da reação de Maillard com soluções modelo tem sido utilizado por outros pesquisadores para o entendimento dos caminhos seguidos em cada etapa (BOURAIIS et al., 2005) bem como para a previsão da intensidade que ela apresentará nos alimentos, dependendo da temperatura de processamento ou armazenamento, seu conteúdo de açúcares e proteínas, bem como do pH do alimento.

A glicose é um açúcar com alto poder redutor amplamente utilizado na indústria de alimentos na forma de xaropes e na forma anidra, enquanto a lactose é o açúcar majoritário em leite e seus derivados. A glicina (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>N) possui a estrutura mais simples entre os aminoácidos, presente em frutos do mar como a lagosta, fazendo parte da estrutura do flavour do mesmo, sendo utilizada na indústria farmacêutica e alimentícia. O ácido glutâmico e seus sais de sódio (glutamato monossódico) são encontrados em muitos alimentos protéicos como carnes, peixes, leite e um grande número de vegetais, e tem ganhado espaço na indústria de alimentos industrializados como realçador de sabor em molhos, sopas, condimentos para carnes, embutidos e outros.

O objetivo do trabalho foi estudar o avanço da formação de cor devido à reação Maillard com misturas de dois açúcares (glicose ou lactose) e dois aminoácidos (glicina e glutamato de sódio) em pH neutro e ácido, avaliando a cinética de formação da cor nestas diferentes condições..

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **2.1.1 Reagentes**

Os açúcares utilizados foram a D-glicose anidra (marca Nuclear), e a D (+) lactose monohidratada (marca Vetec). Os aminoácidos foram a glicina (marca Vetec) e o glutamato

monossódico monohidratado (marca Synth). Todos os reagentes possuíam grau analítico.

### 2.2.2 Procedimento

O método consistiu em preparar soluções contendo um açúcar redutor (glicose ou lactose) e um aminoácido (glicina ou glutamato de sódio) em quatro combinações: glicose/glicina; glicose/glutamato; lactose/glicina; lactose/glutamato. O açúcar e o aminoácido eram pesados em balança analítica (marca Ohaus Adventur, modelo AR2140) de modo que suas concentrações na solução fossem de 2 mol/L e adicionados em um tubo de ensaio com tampa rosqueada. Adicionou-se 10 mL de água destilada aquecida (temperatura em torno de 50°C) para facilitar a dissolução. A esta solução foram adicionados 3 mL da solução tampão para ajuste do pH na faixa neutra (tampão fosfato de potássio-hidróxido de sódio: pH = 7,07) ou ácida (tampão fosfato dissódico-ácido cítrico: pH = 5,10). A correção do pH foi feita com NaOH 1,0 M ou HCl 1,0 M com o auxílio de um potenciômetro (marca Tecnal, modelo TEC-2). Doze tubos foram levados ao aquecimento em banho de água fervente (temperatura de 97°C) para que houvesse a reação de escurecimento, retirados em intervalos de tempo e resfriados em banho de água gelada para interromper a reação. A concentração dos produtos finais das reações de escurecimento não-enzimático foi medida pela absorvância no comprimento de onda de 420 nm (O'BRIEN, 1996; CARABASA e IBARZ, 2000) utilizando-se água destilada como prova em branco em espectrofotômetro (marca Femto, modelo 700 PLUS) e cubetas de quartzo com caminho ótico de 2,0 cm. A absorvância foi representada como Densidade Ótica (DO). As reações e as leituras da DO foram realizadas em duplicatas.

### 2.2.3 Modelo cinético

O estudo do modelo cinético foi baseado na determinação da ordem global da reação conforme o modelo diferencial citado por Rosycki et al. (2007), representado pela equação 1. Na equação 1, "DO" representa a densidade ótica, "t" o tempo de reação (min), "n" a ordem global da reação e "k" a constante cinética para a produção da cor. A integração da equação 1, para n=0; n=1 e n=2 leva às equações 2, 3 e 4.

As equações 2, 3 e 4 foram utilizadas de modo a se verificar a ordem global da reação. A regressão linear foi realizada no aplicativo Microsoft Excel 2007 nos pontos iniciais que permitiram um ajuste linear, e a inclinação da reta representou a constante cinética. A comparação das constantes cinéticas foi realizada pelo teste ANOVA, identificando quais dos fatores (tipo de açúcar, tipo de aminoácido ou pH) possuíram maior efeito na intensidade da reação de Maillard, representada pelas constantes cinéticas..

$$\frac{d(DO)}{dt} = k(DO)^n \quad (1)$$

$$DO = k.t \quad (2)$$

$$\ln DO = k.t \quad (3)$$

$$-\frac{1}{DO} = k.t \quad (4)$$

## 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra o avanço da cor ao longo do tempo para os ensaios realizados em pH neutro.

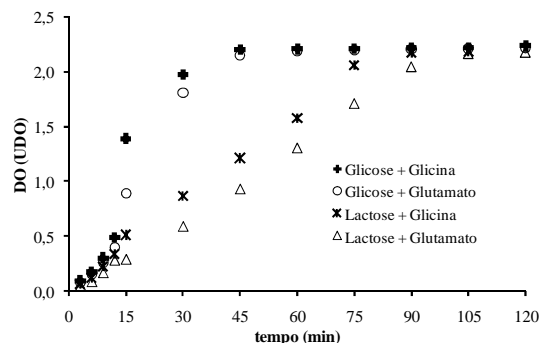


Figura 1: Aumento da densidade ótica a 420 nm ao longo do tempo de aquecimento para as misturas de açúcares e aminoácidos em pH neutro (7,0)

Em pH neutro, observou-se uma tendência crescente na intensidade da cor nos primeiros 15 min de reação, com formação de produtos mais elevada na seguinte ordem de misturas: glicose e glicina, glicose e glutamato, lactose e glicina, lactose e glutamato. As misturas com maior velocidade (glicose e glicina; glicose e glutamato) logo atingiram uma densidade ótica máxima, tendo sua cor estabilizada próximo de 45 minutos. Por outro lado, as misturas com menor velocidade (aquelas contendo lactose) continuaram a produzir cor após 45 min, e decorridos 120 min, aproximaram-se da cor obtida pelas misturas que possuíam maior taxa de reação (misturas contendo glicose), também estabilizando sua cor na faixa de 2,2 UDO.

A Figura 2 mostra a intensidade da cor medida a 420 nm para as reações de escurecimento não-enzimático realizadas em pH ácido (5,1).

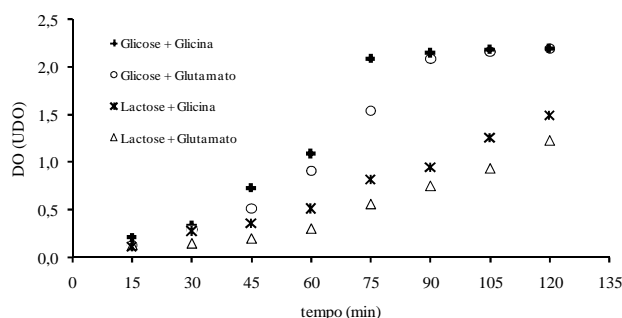


Figura 2: Aumento da densidade ótica a 420 nm ao longo do tempo de aquecimento para as misturas de açúcares e aminoácidos em pH 5,1

A Figura 2 mostra que no período de indução (por até 15 min), a taxa de desenvolvimento da cor foi muito baixa. Neste período, a intensidade de cor formada foi apenas 5% da absorbância máxima obtida. Este período de indução foi destacado por outros autores (ROSYCKI et al., 2007, OBRIEN, 1996), sendo necessário para a formação dos compostos intermediários nas etapas inicial e secundária da reação de Maillard. Morales e Boekel (1998), estudando a formação de cor em misturas de lactose ou glicose com caseinatos, observaram que este período de indução, dependendo da natureza dos reagentes e da severidade do aquecimento, pode ser tão curto que não é possível identificá-lo. Neste estudo verificou-se que este possível período de indução foi menor em pH neutro (Figura 1),

observando-se que que, após 15 min houve diferenciação nas taxas de reação entre as diferentes misturas, enquanto que em pH ácido este comportamento foi observado após 45 min.

Decorridos 45 min de reação, comparando-se a intensidade de cor desenvolvida para as diferentes misturas de aminoácidos e açúcares em pH ácido, observou-se a mesma sequência apresentada em pH neutro, na seguinte ordem decrescente: glicose/glicina, glicose/glutamato, lactose/glicina, lactose/glutamato. Comparando-se as Figuras 1 e 2, é possível identificar um retardo da reação, embora, após decorridos 120 min, as misturas contendo glicose em pH ácido apresentaram 97% da cor formada na reação realizada em pH neutro. Contudo, as misturas contendo lactose, após 120 min, ainda demonstraram uma tendência crescente de formação de cor, não havendo a estabilização após este período.

As misturas contendo glicose estabilizaram a formação de cor, em pH 5,1, após 90 min. Para as reações realizadas em pH neutro a estabilidade ocorreu em 45 min. Em pH próximo da neutralidade, o grupamento amino encontra facilidade em ceder o íon hidroxônio ( $H^+$ ), levando à desidratação e liberação de uma molécula de água para formar a glicosilamina na etapa inicial da reação (BOBBIO e BOBBIO, 2001), enquanto que em pH ácido, o grupo amina encontra-se protonado, não favorecendo a reação de Maillard (SHIPAR, 2006). Além disso, rotas diferentes para a quebra dos produtos de Amadori podem ocorrer, dependendo diretamente do pH.

A natureza dos açúcares e dos aminoácidos possui forte influência na reação de Maillard (BOEKEL, 2006). A natureza do açúcar redutor na reação determina a reatividade, sendo que hexoses (glicose e frutose) são mais reativas que dissacarídeos (lactose). Isso foi evidenciado nas duas condições de trabalho avaliadas, uma vez que as reações contendo lactose demonstraram menores velocidades de reação para a formação de cor. Além disso, há basicamente três rotas no estágio final da reação de Maillard, diferenciadas pelo tipo de açúcar e favorecidas pelos diferentes pHs, sendo que a rota de formação de 3-deoxi-hexoses é preferencial em pHs mais baixos (formando hidroximetilfurfural – HMF e pirralina), não sendo favorecida para dissacarídeos (BOEKEL, 1998), explicando o atraso da reação quando utilizada a lactose como açúcar redutor. Por outro lado, em pH neutro, a rota de 2,3-enolização dos produtos de Amadori é favorecida, fato que demonstra a maior velocidade de reação em pH neutro



Por se tratarem de reações consecutivas, a taxa global de reação sofre efeito direto da etapa inicial. Nestas etapas iniciais, a doação do grupamento amínico para o grupo carboxílico do açúcar (produzindo a glicosilamina) é crucial para a posterior formação da cor. Para aminoácidos livres, o grupo amino encontra-se disponível, enquanto que para peptídeos e proteínas, o grupo  $\alpha$ -amino está comprometido com a ligação peptídica, dificultando a formação da glicosilamina, e o desenvolvimento da cor pode ter uma taxa mais reduzida.

Para os aminoácidos com grupos  $\alpha$ -aminos, a complexidade e o comprimento da cadeia reduzem a reação devido à dificuldade de aproximação (efeito espacial), sendo a glicina o aminoácido mais reativo. Nas Figuras 1 e 2 (para o mesmo açúcar redutor) as reações contendo glicina obtiveram maior desenvolvimento de cor quando comparadas com as misturas contendo glutamato, evidenciado nos tempos de 15 min a 30 min da Figura 1 e 45 min a 75 min da Figura 2.

As Tabelas 1 e 2 mostram os coeficientes de correlação ( $R^2$ ) obtidos na regressão linear para a produção de cor das quatro misturas de açúcares e aminoácidos testadas em pH 7,0 e pH 5,1, respectivamente.

Tabela 1: Coeficientes de correlação ( $R^2$ ) para as regressões lineares realizadas para a cinética de ordem zero, 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> ordem na produção de cor nas diferentes misturas de açúcares e aminoácidos em pH 7,0.

| Equação         | Glicose-<br>glicina | Glicose-<br>glutamato | Lactose-<br>glicina | Lactose-<br>glutamato |
|-----------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| $DO = k.t$      | 0,810               | 0,867                 | 0,984               | 0,945                 |
| $\ln(DO) = k.t$ | 0,978               | 0,991                 | 0,995               | 0,962                 |
| $-1/DO = k.t$   | 0,906               | 0,885                 | 0,878               | 0,864                 |

Da Tabela 1 observa-se que para cada mistura de açúcares e aminoácidos, a melhor correlação ( $R^2$ ) obtida foi para a cinética de primeira ordem, sendo que a equação 3 melhor representa a formação de cor na reação de Maillard para esta condição. Em pH 5,1, o comportamento cinético de escurecimento das soluções de açúcares e aminoácidos devido à



reação de Maillard em pH 5,1 foi semelhante àquele obtidos em pH 7,0, sendo que para as soluções contendo glicose-glicina, glicose-glutamato, lactose-glicina e lactose-glutamato, a melhor correlação ( $R^2$ ) foi para cinética de primeira ordem, representada pela equação 3. Embora as soluções estivessem em concentrações elevadas (2 mol/L), a reação não demonstrou ser independente da concentração dos reagentes (o que indicaria uma reação de ordem zero). Estudos anteriores evidenciam que a reação de Maillard segue uma cinética de ordem zero para a formação de compostos intermediários, como o hidroximetilfurfural (HMF) e para formação de produtos incolores (CARABASA e IBARZ 2000). Contudo, o desenvolvimento da cor ocorrerá somente após a formação destes intermediários, e a ordem zero de reação, de acordo com as Tabelas 1 e 2, não foi a equação que melhor representou os dados. A primeira ordem global, no entanto, não mostra o avanço da reação quanto aos mecanismos envolvidos e participação de cada reagente, mas evidencia que se pode deslocar o equilíbrio deste complexo processo de formação de cor aumentando ou reduzindo a concentração dos reagentes, e como efeito acelerando ou minimizando a reação de Maillard.

Tabela 2: Coeficientes de correlação ( $R^2$ ) para as regressões lineares realizadas para a cinética de ordem zero, 1ª e 2ª ordem na produção de cor nas diferentes misturas de açúcares e aminoácidos em pH 5,1.

| Equação         | Glicose-glicina | Glicose-glutamato | Lactose-glicina | Lactose-glutamato |
|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-------------------|
| $DO = k.t$      | 0,896           | 0,946             | 0,970           | 0,933             |
| $\ln(DO) = k.t$ | 0,992           | 0,991             | 0,973           | 0,979             |
| $-1/DO = k.t$   | 0,908           | 0,822             | 0,680           | 0,924             |

Nenhuma das equações conseguiu prever o comportamento da taxa de reação ao longo de todo o período (120 min). Para a linearização dos dados se utilizou o período compreendido até 15 min para o meio neutro e 75 min para o meio ácido. Nessas condições, a taxa de reação foi mais lenta. Rosycki et al. (2007) relataram que trabalhos anteriores (Pauletti et al., 1999) identificaram cinéticas de ordem 0 a 1 para leituras a 420 nm, indicando

coloração marrom, e que modelos mais complexos de regressão múltipla são possíveis de representar o escurecimento não-enzimático durante todo o período. Contudo, os modelos mais complexos são de difícil aplicação, uma vez que exigem dados experimentais de coeficientes para descrever a formação da cor com o tempo decorrido para cada sistema.

As constantes cinéticas da reação de primeira ordem para cada solução testada nos dois pHs avaliados são demonstradas na Tabela 3. O pH neutro (7,0) favorece o avanço da reação de Maillard, motivo pelo qual as constantes cinéticas foram de cinco a oito vezes maiores que as constantes obtidas em pH 5,1. A redução do pH, contudo, demonstrou possuir maior efeito quando o açúcar presente é lactose. A lactose (composta por glicose e galactose) participa da reação essencialmente pela quebra da glicose no carbono alfa, mantendo-se a estrutura da galactose), com a adição do grupamento amínico e a consequente formação da base de Schiff (BOEKEL, 1998), um composto instável. Nesta etapa inicial, a reação é reversível (BOEKEL, 1998; BOURAIS et al., 2006), e a redução do pH dificulta a formação da base de Schiff, e este efeito demonstrou ser mais severo quando o açúcar utilizado foi a lactose, reduzindo a taxa de reação na ordem de oito vezes.

### 3 CONCLUSÃO

A natureza dos açúcares e aminoácidos tem importante papel no grau de avanço da formação de cor devido à reação de Maillard. A glicose evidenciou possuir maior reatividade que a lactose, possuindo a reação com o primeiro açúcar uma maior constante cinética nos primeiros 15 min de reação. Contudo, ambos açúcares produziram uma coloração semelhante após o período de 120 min de reação.

Não foi evidenciado que glicina ou glutamato produzissem diferentes níveis de coloração devido à reação de Maillard, uma vez que as constantes cinéticas das reações envolvendo ambos os aminoácidos não diferiram nas condições de pH neutro e ácido (5,1).

As reações de escurecimento não-enzimático apresentaram uma cinética de primeira ordem global nas condições de pH neutro e ácido (5,1) para a formação de produtos com pigmentação marrom, embora este modelo cinético não represente os dados experimentais durante todo o período de reação.

## REFERÊNCIAS

- BOBBIO, Paulo A.; BOBBIO, Florinda Orsatti. Química do processamento de alimentos, 3. ed. São Paulo: Varela, 2001. 151 p.
- BOEKEL M.A.J.S. van. Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnology Advances*. v. 24, p. 230-233, 2006.
- BOEKEL, M.A.J.S. Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chemistry*, v. 62, n. 4, p. 403-414, 1998.
- BOSTAN, A.; BOYACIOGLU, D. Kinetics of non-enzymatic colour development in glucose syrups during storage. *Food Chemistry*, v. 60, n. 4. p. 581 – 585, 1997.
- BOURAI, I.; AMINE, A.; MOSCONI, D.; PALESCHI, G. Investigation of glycated protein assay for assessing heat treatment effect in food samples and protein–sugar models. *Food Chemistry*, v. 96, p. 485-490, 2006.
- CARABASA, M. G.; IBARZ, A. R. Kinetics of colour development in aqueous glucose systems at high temperatures. *Journal of Food Engineering*, v.44, p. 181-189, 2000.
- CHEVALIER, F.; CHOBERT, J.; POPINEAU, Y.; NICOLAS, M.G; HAERTLÉ, T. Improvement of functional properties of b-lactoglobulin glycated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar. *International Dairy Journal*, v. 11, p. 145-152, 2001.
- CLAUDE, J.; UBBINK, J. Thermal degradation of carbohydrate polymers in amorphous states: a physical study including colorimetry. *Food Chemistry*, v. 96. p. 402-410, 2006.
- DAVIES, C.G.A.; WEDZICHA, B. L.; GILLARD, C. Kinetic model of the glucose-glycine reaction. *Food Chemistry*, v.60, n.3, p. 323 – 329, 1997.
- MORALES, J. F.; BOEKEL, M.A.J.S, van. A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: colour formation. *International Dairy Journal*, v. 8, p. 907-915, 1999.
- O'BRIEN, J. Stability of Trehalose, Sucrose and Glucose to Nonenzymatic Browning in Model Systems. *Journal of Food Science*, v. 61, n.4, 679 – 682. 1996.
- PAULETTI, M.; MATTA, E. J.; ROZYCKI, S. D. Kinetics of heatinduced browning in concentrated milk with sucrose as affected by pH and temperature. *Food Science and Technology International*, v.5, p. 407–413, 1999.
- QIU, Z.; STOWELL, J.G.; MORRIS, K. R., BYRN S.R., PINA, R. Kinetic study of the Maillard reaction between metoclopramide hydrochloride and lactose. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 303, p. 20-30, 2005.

QUINTAS, M.A.C; BRANDÃO, T.R.S; SILVA, C.L.M. Modelling colour changes during the caramelisation reaction. *Journal of Food Engineering*, v.83, p. 483 – 491, 2007.

ROSYCKI, S.D.; PAULETTI, M.S.; COSTA, S.C.; PIAGENTINI, A.M.; BUERA, M.P. The kinetics of colour and fluorescence development in concentrated milk systems. *International Dairy Journal*, v. 17, p. 907-915, 2007.

SHIPAR, A. H. Md. Formation of the Heyns rearrangement products indihydroxyacetone and glycine Maillard reaction: A computational study. *Food Chemistry*, v. 97, p. 231-243, 2006.