

Efeitos da relação tempo/temperatura e concentração/pH na reação de Maillard em diferentes açúcares

Effects of relationship time/temperature and concentration/pH in the Maillard reaction at different sugars



Resumo:

A reação de Maillard (MR) é uma reação de escurecimento não enzimático. Esta é responsável por atributos indesejáveis nos alimentos, que têm de ser limitados, mas também por características desejáveis que, ao contrário, devem ser promovidas. Desta forma este estudo tem como objetivo avaliar a influência da temperatura, do tempo, do pH, da concentração e tipo de hidrato de carbono presentes em diferentes açúcares. Foi utilizado cinco açúcares (glicose, frutose, lactose, sacarose e sorbitol) e utilizado a glicina como aminoácido, em dois diferentes pH (5 e 9). As soluções foram aquecidas em temperaturas de 50°C e 90°C com tempos de 10,20,30,40 minutos e a absorbância lida a 420 nm recorrendo ao espectrofotômetro. Os resultados demonstraram que temperaturas mais elevadas (90 °C) favoreceram a reação. A presença de monossacarídeos (glicose e frutose) são mais reativos que os polissacarídeos (sacarose). As cetoses (frutose) deveriam ser menos reativas que as aldoses (glicose) o que não foi verificado. O aumento do tempo de reação traduz um aumento dos valores de absorvância. Quanto ao efeito da concentração/ pH, nos açúcares estudados, verifica-se que quanto maior for o pH e a concentração do açúcar presente, maior é a velocidade de reação.

Abstract:

The Maillard reaction (MR) is a non-enzymatic browning reaction. This is responsible for undesirable attributes in foods, they have to be limited, but also because of desirable characteristics to the contrary, they should be promoted. Thus this study aims to evaluate the influence of temperature, time, pH, concentration and type of carbohydrate present in different sugars. It used five sugars (glucose, fructose, lactose, sucrose and sorbitol) and used as a glycine amino acid at two different pH (5 and 9). The solutions were heated at temperatures between 50 ° C and 90 ° C with times 10,20,30,40 minutes and the absorbance read at 420 nm using the spectrophotometer. The results show that higher temperatures (90 ° C) favored the reaction. The presence of monosaccharides (glucose and fructose) are more reactive than polysaccharides (sucrose). The ketoses (fructose) should be less reactive than aldoses (glucose) which was not checked. Increasing the reaction time represents an increase of absorbance values. As to the effect of the concentration / pH in the studied sugars, it can be seen that the higher the pH and the concentration of sugar present, the greater the reaction speed.

Amanda Priscila Silva Nascimento¹, Ana Luisa Pinto², Jullyane Mayara Silva Freitas³, Francinalva Cordeiro de Sousa⁴

¹Graduanda em Engenharia de Alimentos, Unidade Acadêmica de Engenharia de Alimentos UFCG, Campina Grande, PB, E-mail: amandapriscil@yahoo.com

²Graduanda em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Campina Grande Unidade Acadêmica de Engenharia de Alimentos UFCG, Campina Grande, PB, E-mail: jullyanneeng.alimentos@hotmail.com

³Mestranda em Biotecnologia e Qualidade Alimentar, Escola de Ciências da Vida e do Ambiente, Universidade Trás-os-Montes e Alto Douro, UTAD, E-mail: analuisapinto91@gmail.com

⁴Doutoranda em Engenharia Agrícola pela Universidade Federal de Campina Grande UFCG, Campina Grande, PB, E-mail: francis_nalva@yahoo.com.br

Contato principal:

Ana Luisa Pinto²



Palavras chave: *Reação de Maillard (RM); açúcares, temperatura, pH, concentração, tempo*

Keywords: *Maillard reaction (MR); sugars, temperature, pH, concentration, time.*



INTRODUÇÃO

Os alimentos cozidos desenvolvem o aroma, sabor e cor característicos e uma das principais reações nos alimentos contendo açúcares redutores e aminoácidos é a reação de Maillard (RM). A reação de Maillard juntamente com a reação de caramelização constituem as duas principais reações de escurecimento não enzimático, responsáveis pelo desenvolvimento da cor escura em alimentos processados termicamente (KARANGWA *et al.*, 2015; PERUSKO *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2015).

De uma forma geral a RM inicialmente se desenvolve entre o grupo carbonilo de um açúcar redutor (aldeído ou cetona) e o grupo amina livre de uma proteína ou aminoácido. As D-glucosilamina formadas sofrem um rearranjo formando as 1-amino-1-desoxicetose também designadas por compostos de Amadori (SARAIVA *et al.*, 2007; CHO *et al.*, 2010). Muitos fatores influenciam a velocidade desta reação. Estes incluem a temperatura, o tempo, a atividade da água (aw), pH, o tipo e proporção de açúcares redutores, os compostos amino e a fonte de reagente (KWAK *et al.*, 2005; MATMAROH *et al.*, 2006).

Nas indústrias agroalimentares, é essencial o controle da RM porque esta é responsável por atributos indesejáveis (off-flavors, perda de valores nutricionais, aparecimento de compostos tóxicos, etc.) que deverá ser limitados, mas também são essenciais para as características desejáveis (características sensoriais agradáveis, formação de moléculas biologicamente ativas, etc.) que, ao contrário, devem ser promovidas (LAROQUE *et al.*, 2008).

A extensão da RM, ocorrida nos alimentos, é usualmente averificada por recurso à análise dos polímeros e dos co-polímeros formados (melanoidinas), os quais apresentam uma cor escura e intensa. É portanto na fase final da RM que estas espécies moleculares surgem, devido à condensação e polimerização de intermediários coloridos e de outros precursores reativos (produtos enamínicos, análogos de açúcar de baixa massa molecular, produtos dicarbonílicos insaturados). A formação de polímeros de cor escura é favorecida pela presença de um catalisador amina. Ainda considerando a formação dos polímeros de cor escura, estes possuem uma elevada massa molecular, contendo, a nível estrutural, anéis furano e azoto, podendo, igualmente, conter grupos carbonilo, carboxilo, amina, amida, pirrolo, indolo, azometinas, éster, éter, e grupos metilo e hidroxilo (SARAIVA *et al.*, 2007).

Na indústria alimentar, um dos grandes desafios consiste na manipulação do sabor, do aroma e da própria cor dos alimentos, para que estes sejam mais apelativos ao consumo, sem que ocorra perda do seu valor nutritivo e da sua qualidade. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes temperaturas, tempos de exposição, concentração de açúcares e pH na Reação de Maillard.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal de Campina Grande.

O método consistiu em preparar soluções contendo açúcar redutor, (glicose, frutose, sacarose, lactose e sorbitol) e um aminoácido (glicina).

O açúcar e o aminoácido foram pesados em balança analítica (marca, modelo AR2140) e adicionados em um tubo de ensaio com tampa rosqueada. Adicionou-se água destilada para facilitar a dissolução. A esta solução foi adicionada a solução tampão para ajuste do pH na faixa ou ácida (tampão fosfato dissódico-ácido cítrico).

Os tubos foram levados ao aquecimento em banho maria (temperaturas de de 50 e 90 °C) para que houvesse a reação de escurecimento, retirados em intervalos de tempo (10 a 40 minutos) 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 absorbância no comprimento de onda de 420 nm utilizando-se água destilada como prova em branco em espectrofotômetro. A absorbância foi representada como Densidade Ótica (DO). As reações e as leituras foram realizadas em duplicatas. Para a execução foram utilizadas as seguintes soluções:

- Solução Tampão de Fosfato 0,2 M pH 5.0
- Solução Tampão de Fosfato 0,2M pH 8.0
- A - Solução de Glicose 0,5 M
- B - Solução de Frutose 0,5 M
- C - Solução de Sacarose 0,5M
- D - Solução de Lactose 0,5 M
- E - Solução de Sorbitol 0,5 M
- Solução de Glicina 0,5 M (aminoácido)

1. Efeito da temperatura e tempo na reação

Preparou-se, em duplicata, as soluções descritas na Tabela 1:

Tabela 1. Condições Reacionais

Glicido	Aminoácido	Tampão pH 8	Temperatura	Tempo
A	3,0 ml	2 ml	50 °C	10 min
B				20 min
C				30 min
D				40 min
E				
A	3,0 ml	2 ml	90 °C	10 min
B				20 min
C				30 min
D				40 min
E				

Os tubos foram recobertos com papel alumínio e colocados no banho de maria durante o tempo de 30 minutos. Após este tempo, os tubos foram resfriados em água corrente e determinou-se a absorvância a 420 nm.

2. Efeito da concentração e pH

Para os hidratos de carbono que desenvolveram cor no experimento anterior, preparou-se, em duplicata as soluções descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições Reacionais

Glicídios	Aminoácido	Tampão pH 5	Tampão pH 8	Água
A	3,0 ml	2 ml	5 ml	0 ml
B	2,0 ml	2 ml	5 ml	1 ml
C	1,0 ml	2 ml	5 ml	2 ml
D	0 ml	2 ml	5 ml	3 ml
E	3,0 ml	2 ml	-	5 ml
F	2,0 ml	2 ml	-	5 ml
G	1,0 ml	2 ml	-	5 ml
H	0 ml	2 ml	-	5 ml

Os tubos foram recobertos com papel alumínio e colocados no banho maria a 90 °C durante 30 minutos. Após este tempo, os tubos foram novamente resfriados e logo em seguida determinada as absorvâncias em espectrofotometro a 420 nm.

A análise estatística dos dados foram realizadas utilizando-se regressão linear.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aumento do escurecimento decorrente da RM naturalmente irá ser favorecido pelo aumento da temperatura (MARTINS & VAN BOEKEL, 2005).

O aumento da temperatura, irá conduzir a um aumento da reatividade entre o açúcar e o grupo amina. A dependência da temperatura de uma constante de velocidade de reação K é frequentemente descrito pela equação de Arrhenius bem conhecido (MARTINS *et al.*, 2000):

$$k = A * \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right)$$

k = constante de velocidade;

A = fator de frequência;

E_{uma} = energia de ativação;

R = constante dos gases (8,3 Jmol⁻¹ K⁻¹);

T = temperatura absoluta (K).

1. Efeito da temperatura e tempo na reação

Nas Tabelas 3 e 4 apresentam-se as absorvâncias obtidas, quando testadas diferentes temperaturas para a observação do comportamento da RM.

Tabela 3. Absorbâncias a 50 °C (420 nm)

Tempo	A ¹	B ²	C ³	D ⁴	E ⁵
10	0,0095	0,034	0,017	0,017	0,013
20	0,001	0,034	0,005	0,013	0,016
30	0,012	0,038	0,009	0,016	0,013
40	-	0,045	0,009	0,017	0,015

¹ Glicose; ²frutose; ³ sacarose; ⁴lactose; ⁵sorbitol

Tabela 4. Absorbâncias a 90 °C (420 nm)

Tempo	A ¹	B ²	C ³	D ⁴	E ⁵
10	0,197	0,703	0,011	0,0965	0,015
20	0,774	2,374	0,013	0,2135	0,013
30	1,603	0,936	0,021	0,4065	0,017
40	-	1,117	0,014	0,824	0,013

¹ Glicose; ²frutose; ³ sacarose; ⁴lactose; ⁵sorbitol

O desenvolvimento da cor escura (Abs 420 nm) é a consequência mensurável mais fácil da RM, uma vez que pode ser verificada visualmente. A sua intensidade é frequentemente utilizada como indicador do grau em que a RM teve lugar nos alimentos e que simboliza o estágio avançado da RM (LAREQUE *et al.*, 2008).

Nas Figuras 1 a 7 estão presentes a relação existente entre a temperatura e o tempo na extensão da RM. Primeiramente observou-se o comportamento individual de cada açúcar quando utilizado a temperatura de 50°C ou 90°C e nos dois ultimos a relação de todos os açúcares em conjunto quando utilizadas as mesmas temperaturas.

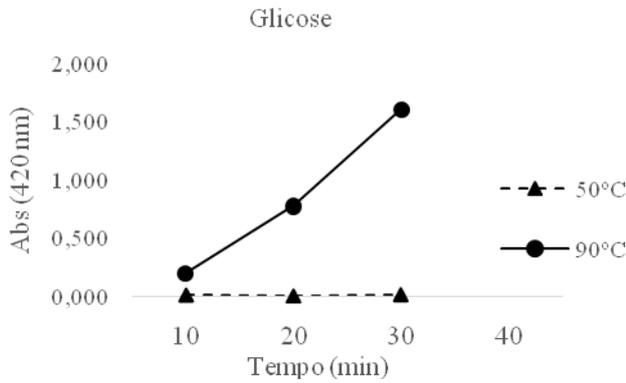


Figura 1. Relação temperatura/tempo quando utilizado a glicose como açúcar para a RM.

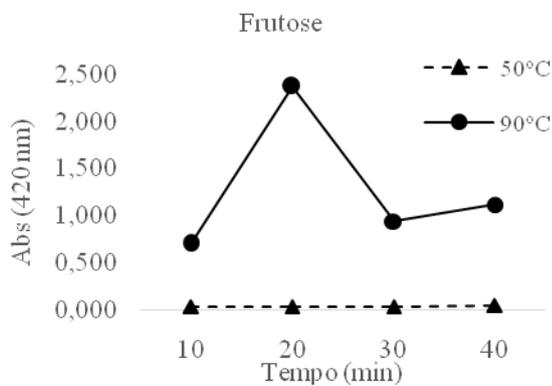


Figura 2. Relação temperatura/tempo quando utilizado a frutose como açúcar para a RM.

Um dos fatores essenciais para a RM ocorrer, é a existência de um grupo carbonila de um açúcar redutor (aldeído ou cetona) e o grupo amina livre de uma proteína ou aminoácidos.

Quando envolvidos monossacarídeos (glicose e frutose) o escurecimento aumenta gradualmente ao longo do tempo de aquecimento, o que se verificou com a glicose e não tão marcante quando a frutose (LAROQUE et al., 2008).

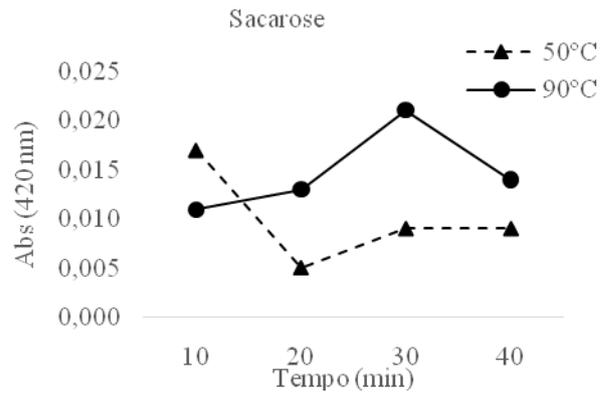


Figura 3. Relação temperatura/tempo quando utilizado a sacarose como açúcar para a RM.

A frutose obteve valores de absorbância superiores aos da glicose, tal não era de esperar uma vez que as aldoses (glicose) são mais reativas que as cetoses (frutose). A ordem de reatividade segundo a qual aldoses são mais reativas do que cetoses, e pentoses são mais reativas do que hexoses no desenvolvimento do escurecimento. O grau de escurecimento da frutose e da glicose é discutível. Esse resultado não foi observado no estudo, estando de acordo com alguns autores, que encontraram uma maior contribuição da frutose no escurecimento em comparação com glicose (SUN et al., 2004; BENJAKUL et al., 2005). Estas discrepâncias são frequentemente atribuída à maior participação das cetoses no escurecimento em comparação com as aldoses (JING&KITTS, 2004).

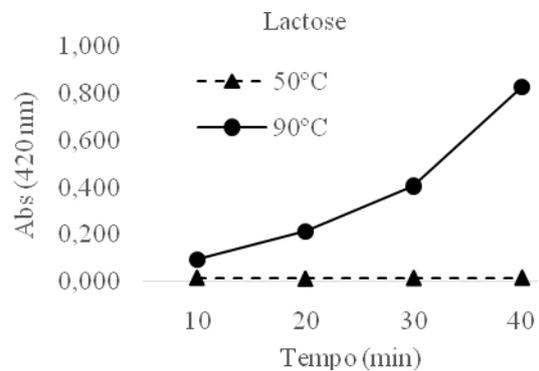


Figura 4. Relação temperatura/tempo quando utilizado a lactose como açúcar para a RM.

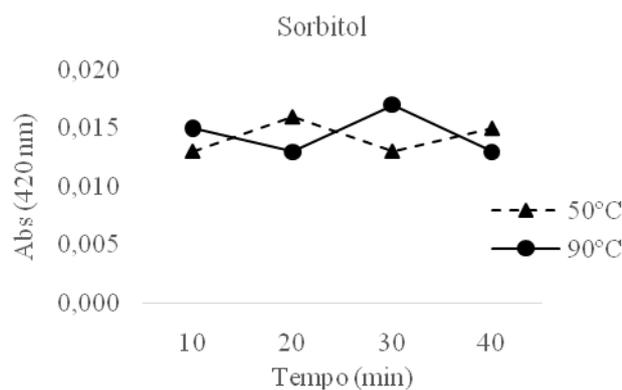


Figura 5. Relação temperatura/tempo quando utilizado a sorbitol como açúcar para a RM.

No caso da sacarose e do sorbitol (Fig 3 e 5) apresentaram valores de absorvância muito baixos, o que era esperado, uma vez que a sacarose é um açúcar que necessita do poder redutor e deste modo não ocorrer reação. No entanto, obteve-se alguma absorvância devido a hidrólise da sacarose nos seus monossacáridos constituintes. O sorbitol obteve igualmente valores muito reduzidos de absorvância uma vez que não possui o grupo carbonilo na sua constituição, daí não sofrer a RM.

Pela análise das Tabelas 3 e 4 a lactose apresenta valores mais baixos que a frutose, pois os polissacáridos (lactose) são menos reativos que os monossacáridos (glicose, frutose).

Pela visualização das Figuras 6 e 7 verificou-se que a reação foi mais efetiva quando utilizada temperatura de 90 °C em relação a 50 °C onde a reação foi quase nula. Quando utiliza a temperatura de 90 °C uma maior energia é fornecida, fazendo com que a energia de ativação de cada açúcar seja ultrapassada. Além disso, o aumento do tempo de reação traduz um aumento dos valores de absorvância, isto deve-se ao fato de a reação ser contínua ao longo do tempo, formando cada vez mais produto.

ECHAVARRIA *et al.*, (2013), testaram diversos parâmetros com o objetivo de alcançar um sistema modelo da RM de forma a obter um maior rendimento dos seus compostos finais. Verificaram que a reação depende da temperatura. A temperatura de aproximadamente 90 °C obteve um maior rendimento de melanoidina, embora neste estudo não tenha sido quantificado compostos como as melanoidinas (compostos responsáveis pela cor castanha, característica da RM), esta também se desenvolveu mais quando utilizada esta temperatura comparativamente com a temperatura de 50°C.

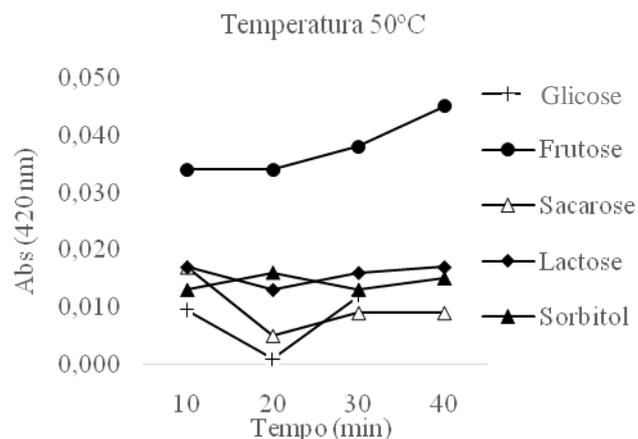


Figura 6. Comparação de todos os açúcares utilizando a temperatura de 50°C.

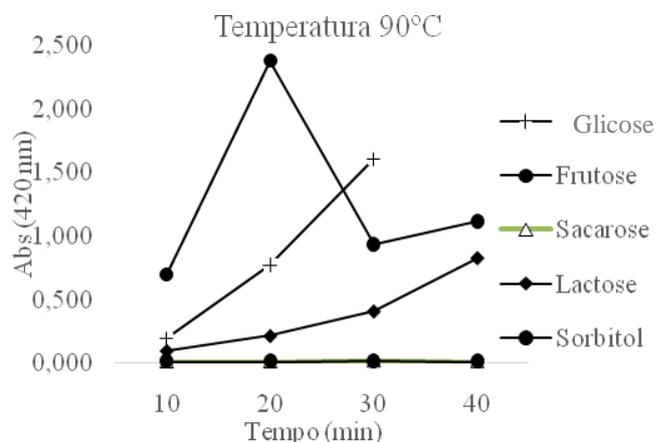


Figura 7. Comparação de todos os açúcares utilizando a temperatura de 90°C.

Em relação ao tempo, este não apresentou um efeito significativo quando comparado ao rendimento de extração das melanoidinas, na presença de alguns açúcares. O que pode ser justificado pelo fato da reação ser contínua ao longo do tempo, formando cada vez mais produto.

2. Efeito da concentração e pH

Na Tabela 5 apresentam-se as absorvâncias obtidas, quanto ao efeito da concentração de glicídios e pH para a observação do comportamento da RM. Em pH 5, observou-se uma tendência decrescente na intensidade da cor em relação a lactose e a frutose, no entanto a glicose não apresentou um comportamento uniforme. Por outro

lado, em pH 9 a frutose obteve comportamento similar.

Tabela 5. Absorbâncias obtidas para pH 4 e 9 relativamente às concentrações de 0, 1, 2 e 3 ml de hidrato de carbono.

pH 5			
Concentração	Lactose	Frutose	glicose
3	0,025	0,072	0,0215
2	0,018	0,057	0,0225
1	0,011	0,044	0,012
0	0,004	0,007	0,006
pH 9			
Concentração	lactose	Frutose	Glicose
3	0,240	0,563	0,62
2	0,196	1,898	0,4505
1	0,118	0,837	0,148
0	0,015	0,015	0,009

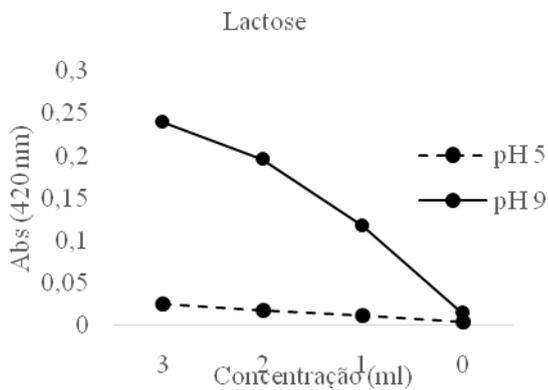


Figura 8. Relação concentração/pH quando utilizado a lactose como açúcar para a RM.

Quanto ao efeito da concentração/ pH, nos açúcares estudados (Figuras 8, 9 e 10), verifica-se que quanto maior for o pH, maior é a velocidade de reação, isto porque no pH alcalino o grupo amina está totalmente desprotonado, o que torna a reação mais reativa, uma vez que é necessário que este grupo esteja desprotonado para que ocorra o ataque nucleofílico ao grupo carbonilo. Por outro lado, verifica-se que o aumento da concentração dos reagentes, neste caso do glicídeos, provoca um aumento da absorbância (KWAK *et al.*, 2005).

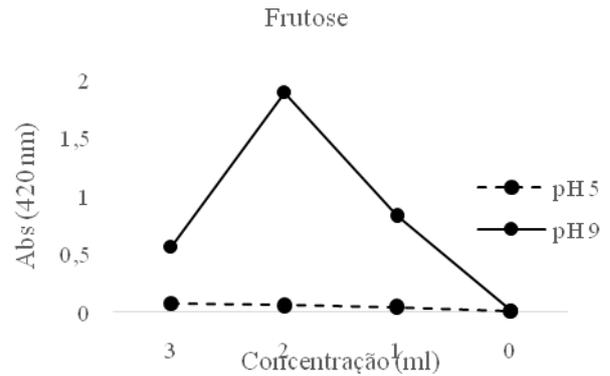


Figura 9. Relação concentração/pH quando utilizado a frutose como açúcar para a RM.

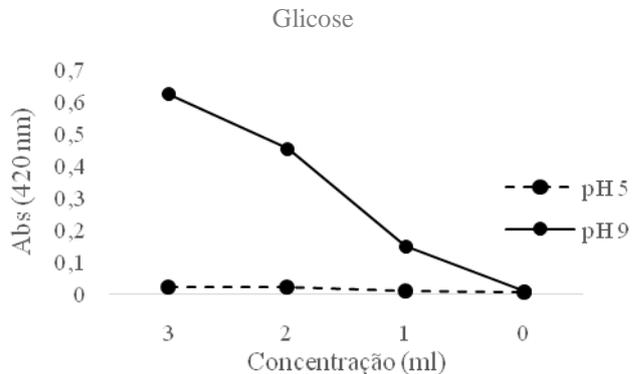


Figura 10. Relação concentração/pH quando utilizado a glicose como açúcar para a RM.

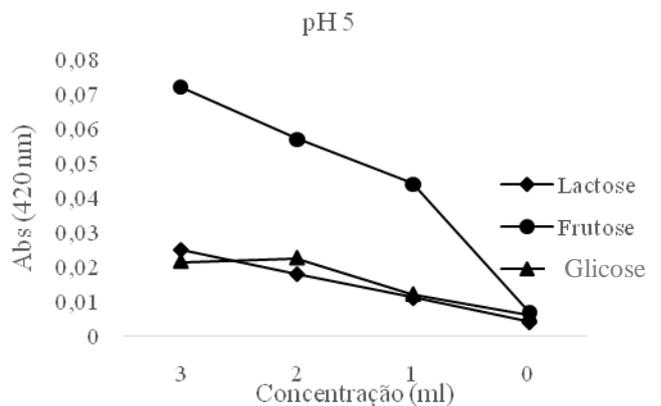


Figura 11. Comparação de todos os açúcares utilizados utilizando pH 5.

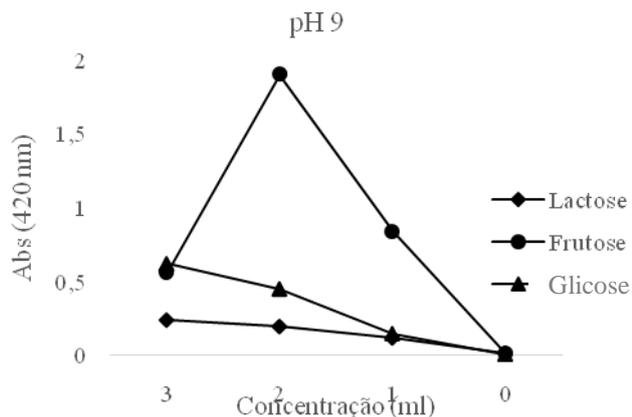


Figura 12. Comparação de todos os açúcares utilizando pH 9.

Com relação ao pH 5 (Figura 11) os valores de absorvância foram baixos. Verifica-se maior absorvância para a frutose, relativamente à lactose e a glicose. Era esperado que a frutose apresentasse maior absorvância que a lactose uma vez que este como monossacárido é mais reativo que a lactose (polissacárido). No entanto a glicose deveria apresentar valores de absorvância superiores aos da frutose, uma vez que as aldoses (glicose) são mais reativas que as cetoses (frutose).

No pH 9 (Figura 12), verificou-se valores de absorvância mais elevados que o pH 5, isto porque no pH 9, os grupos amina encontram-se totalmente desprotonados o que facilita a RM. A lactose, neste caso, apresentou valores inferiores à frutose e à glicose como era esperado, pelas razões já acima referidas (AJANDOUZA *et al.*, 2008).

CONCLUSÕES

Com os resultados observou-se que a reação foi mais extensa quando utilizada a temperatura de 90°C relativamente a 50 °C, pela observação dos valores de absorvâncias através do espectrofotômetro. Quando estudada a reatividade da glicose, frutose, sacarose, lactose e sorbitol, verificamos que elevados valores de absorvância foram obtidos quando utilizada a frutose, o que contraria o esperado, dado que a glicose teria sido o açúcar mais reativo comparativamente com os restantes.

Relativamente ao tempo, ocorreu o esperado, o aumento do tempo reflete no aumento da reação. Assim como o aumento da concentração de açúcar.

Em pH mais elevado, observou-se maiores valores de absorvância, devido ao fato dos grupos amina encontrarem-se totalmente desprotonados facilitando que a RM ocorra.

Na química de alimentos, a RM tem um papel fundamental, podendo contribuir para o melhoramento da aparência e do sabor dos alimentos. São vários os alimentos em que a RM são desejáveis, como é o caso do café, do cacau e do pão. No entanto, existem alimentos em que a RM indesejável, como por exemplo leite, milho e sucos concentrados. Sendo assim se faz necessário estudos sobre a RM envolvendo as mais diversas matrizes alimentares, para que desta forma essa possa ser controlada adequadamente sem prejudicar a qualidade dos produtos a serem desenvolvidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJANDOUZ, E. H., DESSEAUZ, V., TAZI, S. & PUIGSERVER, A. **Effects of temperature and pH on the kinetics of caramelisation, protein cross-linking and Maillard reactions in aqueous model systems.** Food Chemistry, 107, 1244-1252, 2008.
- BENJAKUL, S., LERTITTIKUL, W. & BAUER, F. **Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-sugar model system.** Food Chemistry, 93, 189-196, 2005.
- CHO, I., LEE, S., JUN, H, R., ROH, H.J. & KIM, Y, S. **Comparison of volatile Maillard reaction products from tagatose and other reducing sugars with amino acids.** Food Science and Biotechnology, 19, 431-438, 2010.
- ECHAVARRIA, A., PAGAN, J. & IBARZ, A. **Optimization of Maillard reaction products isolated from sugar-amino acid model system and their antioxidant activity.** Afinidad, 70, 2013.
- JING, H. & KITTS, D.D. **Antioxidant activity of sugar-lysine Maillard reaction products in cell free and cell culture systems.** Archives of Biochemistry and Biophysics, 429, 154-163, 2004.
- KARANGWA, E., ZANG, X., MUREKATETE, N., MASAMBA, K., RAYMOND, L., SHABBAR, A., *et al.* **Effect of substrate type on sensory characteristics and antioxidant capacity of sunflower Maillard**

reaction products. European Food Research and Technology, 240, 939-960, 2015.

KWAK, E. J., LEE, Y. S., MURATA, M. & HOMMA, S. **Effect of pH control on the intermediates and melanoidins of nonenzymatic browning reaction.** LWT - Food Science and Technology, 38, 1-6, 2005.

LAROQUE, D., INISAN, C., BERGER, C., VOULAND, É., DUFOSSÉ, L. & GUÉRARD, F. **Kinetic study on the Maillard reaction. Consideration of sugar reactivity.** Food Chemistry, 111, 1032-1042, 2008.

MATMAROH, K., BENJAKUL, S. & TANAKA, M. **Effect of reactant concentrations on the Maillard reaction in a fructose-glycine model system and the inhibition of black tiger shrimp polyphenoloxidase.** Food Chemistry, 98, 1-8, 2006.

PERUSKO, M., AL-HANISH, A., CIRKOVIC VELICKOVIC, T. & STANIC-VUCINIC, D. **Macromolecular crowding conditions enhance glycation and oxidation of whey proteins in ultrasound-induced Maillard reaction.** Food Chemistry, 177, 248-257, 2015.

SARAIVA, M. A. G. **Espectrometria de massa aplicada ao estudo da reação de Maillard.** Doutorado em Química. Universidade de Lisboa- Faculdade de Ciências. Departamento de Química e Bioquímica, 2007.

SUN, Y., HAYAKAWA, S. & IZUMORI, K. **Antioxidative Activity and Gelling Rheological Properties of Dried Egg White Glycated with a Rare Keto-hexose through the Maillard Reaction.** Journal of Food Science, 69, C427-C434, 2004.

YNG, S.-Y., KIM, S.-W., KIM, Y., LEE, S.-H., JEON, H & LEE, K.-W. **Optimization of Maillard reaction with ribose for enhancing anti-allergy effect of fish protein hydrolysates using response surface methodology.** Food Chemistry, 176, 420-425, 2015, 2015.