

**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Saúde Pública**

**Avaliação do teor de Produtos da Reação de  
Maillard (PRM) em cereais matinais e café**

**Julianna Shibao**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Nutrição em Saúde  
Pública para obtenção do título de Mestre  
em Ciências

Área de concentração: Nutrição em Saúde  
Pública

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Deborah Helena  
Markowicz Bastos

**São Paulo**  
**2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

# **Avaliação do teor de Produtos da Reação de Maillard (PRM) em cereais matinais e café**

**Julianna Shibao**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Nutrição em Saúde  
Pública para obtenção do título de Mestre  
em Ciências

Área de concentração: Nutrição em  
Saúde Pública

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Deborah  
Helena Markowicz Bastos

**São Paulo**  
**2010**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.

A sabedoria não nos é dada. É preciso descobri-la por nós mesmos, depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer por nós

**Marcel Proust**

A meus amados pais por  
me proporcionarem a  
maior riqueza que existe

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por desde o meu nascimento guiar meus passos.

Aos meus pais por todo amor, carinho, dedicação, paciência e esforço de sempre me proporcionarem o melhor.

Aos meus irmãos, Luiz Henrique e Luiz Estevão pelos conselhos, proteção e ajudas durante toda minha vida.

Ao Felipe Tadeu Rodriguez Ramirez, meu amor, pelo estímulo, impulso e colo durante esses anos de “loucura”

A minha querida tia Katsue, por me acolher e sempre me incentivar nos meus estudos.

À Professora Dra. Deborah Helena Markowicz Bastos por me acolher de braços abertos, pela confiança, paciência, orientação e por me formar não apenas mestre, mas uma pesquisadora. Muitíssimo obrigada!!

À Professora Dra. Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres por sempre me acolher e ajudar quando necessário e pelas contribuições para realização deste trabalho

À Professora Dra. Úrsula Maria Lanfer pelas valiosas sugestões e contribuições para a execução desse trabalho.

À Dra. Geni Rodrigues Sampaio, que colaborou desde minha adaptação ao laboratório, com a execução das análises principalmente de carboximetilisina, pela amizade e conselhos.

À Ana Paula Santos Conceição, que nunca me negou ajuda, sempre com muita paciência e colaborou muitíssimo com minhas dúvidas de “quimiquês”, em como lidar com o CLAE e no desenvolvimento de muitas análises deste projeto.

A Ms. Rosana Aparecida Manólio Soares e a Dra. Tatiana Saldanha que sempre estiveram presente nas minhas dúvidas mais absurdas e sempre com a maior boa vontade em explicar repetidas vezes.

Às queridas amigas Marina F. F de Souza e Mariana Canela que tanto me ajudaram em minha adaptação ao laboratório e no “ponta pé” inicial de minhas análises! Muito obrigada meninas!!

Aos colegas de grupo e amigos Patrícia Antunes, Marina F. F. de Souza, Marcela Monteiro Piedade, Yara Queiroz, Cecília Carnelossi, Erica Lemos, e Silvio Vicente pelo companheirismo, conselhos, amizade, pelos momentos sérios e descontraídos que vivemos. Obrigada!

Agradeço aos demais amigos que fiz durante esses anos, Carc Martins, Fellipe, Fezinha, Carolzinha, Daniela Moura.

À Fundação Ajinomoto pela bolsa de mestrado concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela Auxílio a pesquisa (processo 08/3744-2).

Aos funcionários do Departamento de Nutrição da FSP.

À todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para a realização deste estudo.



## RESUMO

SHIBAO J. Avaliação do teor de Produtos da Reação de Maillard (PRM) em cereais matinais e café [Dissertação de Mestrado em Ciências] São Paulo. Faculdade de Saúde Pública da USP; 2010.

**INTRODUÇÃO** – Produtos intermediários da reação de Maillard e da peroxidação, como os compostos dicarbonílicos, reagem facilmente com grupamentos aminas de proteínas e ácidos nucleicos levando a modificações biológicas que podem resultar em patologias observadas no diabetes, aterosclerose e doenças neurodegenerativas. O consumo de Produtos da Reação de Maillard (PRM) aumentou nas últimas décadas e há evidências de que estas substâncias são absorvidas e podem tomar parte em processos patológicos, embora ainda não haja consenso sobre os possíveis efeitos deletério à saúde a partir do aumento de sua ingestão. Ressalta-se a necessidade de estimar o consumo destes PRMs a partir de dados sobre os conteúdos e a ingestão habitual do alimento em questão como cereais matinais e café. Objetivos: a) validar metodologia para quantificar indicadores da reação de Maillard: hidroximetilfurfural (HMF), furosina (FUR), carboximetilisina (CML) e Compostos Intermediários Fluorescentes (CIF) em cereais matinais (flocos e granola) e café; b) avaliar se há diferenças nos teores desses compostos nas diferentes marcas destes produtos comercializados em São Paulo; **METODOLOGIA:** Foram analisados dois lotes de três marcas de cereais do tipo flocos, três marcas de cereais do tipo granola e cinco marcas de café presentes em 100% dos hipermercados visitados no município de São Paulo. A validação da metodologia para quantificação, empregando HPLC, consistiu no cálculo da exatidão (recuperação), repetibilidade e sensibilidade para os compostos: HMF e FUR. Foram determinados os teores de CIF por espectrofotometria de fluorescência e os teores de CML por teste imunoenzimático. **RESULTADOS:** Os métodos de determinação de FUR e HMF foram validados conforme o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e

Qualidade Industrial (INMETRO). O teor médio de CIF livre e total foram maiores para as amostras de café, com média de 232CIF/mg e 765CIF/mg respectivamente. Não houve diferença ( $p>0,05$ ) no teor de CIF livre e total entre os flocos F1 e F2. O mesmo foi observado para a granola marcas. G1, G2 e G3 A granola foi o produto com maior teor médio de HMF (67,5mg/Kg) e furosina (301mg/100g de proteína). A FUR não foi detectado nas amostras de café. Todas as marcas dos alimentos estudados para os indicadores HMF e FUR apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ). O café apresentou maior teor médio de CML (1823,5ng/mg de proteína), sem diferença entre as marcas ( $p>0,05$ )

**CONCLUSÕES:** Os cereais do tipo flocos contribuem para maior ingestão de PRMs da fase inicial da reação de Maillard (RM), a granola contribui para maior ingestão de PRMs da fase intermediária da RM e o café contribui de forma significativa para maior ingestão de PRMs da fase avançada da RM. O café, por ser submetido a tratamento térmico mais severo apresenta maior concentração de PRMs da fase avançada da reação.

**DESCRITORES:** Produtos da Reação de Maillard, Glicação, Análise de alimentos.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION** – Maillard reaction products and lipid peroxidation, such as dicarbonyl compounds easily react with amino groups of proteins and nucleic acids leading to biological changes that can result in complications in diseases such as diabetes, atherosclerosis and neurodegenerative. The consumption of Maillard Reaction Products (MRP) has increased in recent decades and there is evidence that these substances are absorbed and can participate in pathological processes, although there is no consensus about the possible harmful health effects from their intake. We highlight the need to identify the consumption of MRP, mainly in vulnerable populations like children and diabetics, in order to establish acceptable daily intakes and guidelines for the food industry. **OBJECTIVES:** a) validate the methodology to measure indicators of the Maillard reaction: hydroxymethylfurfural (HMF), Furosine (RUF) carboxymethyllysine (CML) and fluorescent intermediate compounds (FIC) in breakfast cereals (corn flakes and granola) and coffee, b) to evaluate if there are differences in the levels of these compounds contents among brands commercialized in São Paulo **METHODS:** two lots of 3 brands of flakes cereal, 3 brands of granola and 5 coffee brands present in 100% of supermarkets visited in the city Sao Paulo were analyzed. HPLC methodology validation was assessed by determining accuracy (recovery), repeatability, and sensibility (linearity, limits of detection and quantitation) for the compounds: HMF and FUR. The contents of the Fluorescent Intermediary compounds (FIC) was measured by spectrophotometric method and the levels of CML by ELISA. **RESULTS:** Calibration curves determination coefficient ( $r^2$ ) were higher than 0,99 for all compounds. Recovery ranged from 84 to 110% and repeatability average was 3,5%. The average content of free and total FIC was higher for coffee 232CIF/mg and 765CIF/mg respectively. The brands of granola and flakes was similar but just brands F1 and F2 was similar between brands ( $p < 0,05$ ). For HMF the higher values were for granola 67,5mg/kg. The presence of dried fruit in these grains may

have contributed significantly to the higher rate of this indicator. For indicator FUR average was higher in granola samples (301mg/100g of protein) and it was not possible to quantify the levels of FUR for coffee. All brands analyzed for HMF and FUR was similar ( $p < 0,05$ ). CML average was higher for coffee (1823,5ng/mg of protein). The brands analyzed was similar for all samples ( $p < 0.05$ ). **CONCLUSIONS:** Flakes contribute to higher intake of MRPs from early stage of the Maillard reaction (MR), the granola contributes to higher intake of MRPs from intermediate phase of MR and coffee contributes significantly to higher intake of final MRPs. Data suggest that coffee has more severe thermal treatment causing a higher concentration of MRPs from the final phase of the MR.

**Key words:** Maillard reaction products, Glycation, food analysis

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1.1 ASPECTOS DA REAÇÃO DE MAILLARD .....	19
1.2 PRODUTOS DA REAÇÃO DE MAILLARD (PRMs) E PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs).....	23
1.3 EFEITOS BIOLÓGICOS DOS PRODUTOS DA REAÇÃO DE MAILLARD .....	26
1.4 COMPOSTOS MARCADORES DA REAÇÃO DE MAILLARD.....	31
1.4.1 Compostos Intermediários Fluorescentes .....	32
1.4.2 Hidroximetilfurfural.....	33
1.4.3 Furosina .....	34
1.4.4 Carboximetilisina .....	36
1.5 PRMS EM ALIMENTOS.....	37
1.6 CEREAIS MATINAIS E CAFÉ .....	40
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
3. MATERIAIS .....	44
<b>4. MÉTODOS</b> .....	<b>48</b>
4.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL .....	48
4.1.1 Determinação do teor de umidade.....	48
4.1.2 Determinação do teor de proteínas.....	48
4.1.3 Determinação do teor de lipídeos .....	48
4.1.4 Determinação do teor de resíduo mineral.....	49
4.1.5 Determinação do teor de carboidratos.....	49
4.1.6 Determinação do valor de atividade de água (aw) .....	49
4.2 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS INTERMEDIÁRIOS FLUORESCENTES .....	49
4.2.1 Determinação do teor de Compostos Intermediários Fluorescentes livres (CIF livres) em cereal matinal e granola .....	49

4.2.2	Determinação do teor de Compostos Intermediários Fluorescentes livres (CIF livres) em café .....	50
4.2.3	Determinação do teor de Compostos Intermediários Fluorescentes totais (CIF totais) em cereal matinal e granola .....	50
4.2.4	Determinação do teor de Compostos Intermediários Fluorescentes totais (CIF totais) café .....	51
4.2.5	Condições analíticas .....	51
4.3	DETERMINAÇÃO DE HIDROXIMETILFURFURAL.....	52
4.3.1	Determinação de Hidroximetilfurfural em cereais matinais dos tipos flocos e granola .....	52
4.3.2	Determinação de Hidroximetilfurfural em Café .....	52
4.4	DETERMINAÇÃO DE FUROSINA .....	53
4.4.1	Determinação de Furosina em cereal matinal dos tipos flocos e granola .....	53
4.4.2	Determinação de Furosina em Café .....	54
4.4.3	Condições analíticas .....	54
4.5	DETERMINAÇÃO DE CARBOXIMETILISINA .....	55
4.6	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS .....	56
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	58
5.2	COMPOSTOS INTERMEDIÁRIOS FLUORESCENTES .....	62
5.3	HIDROXIMETILFURFURAL .....	71
5.5	FUROSINA.....	76
5.6	CARBOXIMETILISINA.....	81
5.7	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS - ACP .....	84
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>87</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>89</b>
	<b>CURRÍCULO LATTES – JULIANNA SHIBAO.....</b>	<b>99</b>
	<b>CURRÍCULO LATTES – DEBORAH HELENA MARKOWICZ BASTOS .....</b>	<b>100</b>

## SIGLAS UTILIZADAS

A	Tipo de flocos sabor açúcar
ACP	Análise de Componentes Principais
AGEs:	<i>Advanced Glycation EndProducts</i>
ALEs:	<i>Advanced Lipoxidation EndProducts</i>
Aw:	Atividade de água
C1:	Marca de café 1
C2:	Marca de café 2
C3:	Marca de café 3
C4:	Marca de café 4
C5:	Marca de café 5
CEL:	Carboxietilisina
CG/MS:	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectro de Massas
Ch:	Tipo de flocos sabor chocolate
CIF:	Compostos Intermediários Fluorescentes
CLAE:	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-ESI/MS/MS:	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Ionização por Eletrospray e Espectro de Massas
CML:	Carboximetilisina
CV:	Coeficiente de Variação
ELISA:	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
F1:	Marca de flocos 1
F2:	Marca de flocos 2
F3:	Marca de flocos 3
FUR:	Furosina
G1:	Marca de granola 1
G2:	Marca de granola 2
G3:	Marca de granola 3
GOLD:	<i>glyoxal-lysine dimmer</i>
HMF:	Hidroximetilfurfural

IDH: Índice de Desenvolvimento Humano  
kg: Kilograma  
LC/MS: *Liquid Chromatography/mass spectrometry*  
LDL: *Low Density Lipoproteins*  
M: Tipo de flocos sabor milho  
mg: Miligrama  
MOLD: methyglyoxal-lysine dimmer  
MRX: 8-hydroxy-5-methylidihydrothiazolo( 3,2 alpha)pyridinium-3-carboxylate  
PRM: Produto da Reação de Maillard  
RAGE: Receptor de Produtos da Reação de Maillard  
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada  
RM: Reação de Maillard  
SPE: Solid-Phase Extraction  
TC1: Tipo de café 1  
TC2: Tipo de café 2  
TC3: Tipo de café 3  
TC4: Tipo de café 4  
TC5: Tipo de café 4  
TG1: Tipo de granola 1  
TG2: Tipo de granola 2  
TG3: Tipo de granola 3TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor-alpha



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conteúdo de Produtos da Reação de Maillard (PRM) em alguns alimentos .....	39
Tabela 2. Composição físico-química de cereal tipo flocos (%) .....	58
Tabela 3. Composição físico-química de cereal tipo granola (%).....	60
Tabela 4. Composição físico-química do café (%) .....	61
Tabela 5. Atividade de água dos alimentos estudados .....	62
Tabela 6. Compostos Intermediários Fluorescentes Livres (CIF livre) da reação de Maillard em cereal matinal tipo flocos.....	63
Tabela 7. Compostos Intermediários Fluorescentes Livres (CIF livre) da reação de Maillard em cereal matinal tipo granola .....	64
Tabela 8. Compostos Intermediários Fluorescentes Livres (CIF livre) da reação de Maillard em Café .....	65
Tabela 9. Compostos Intermediários Fluorescentes Totais (CIF Total) da reação de Maillard em cereal matinal tipo flocos.....	66
Tabela 10. Compostos Intermediários Fluorescentes Totais (CIF Total) da reação de Maillard em cereal matinal tipo granola .....	67
Tabela 11. Compostos Intermediários Fluorescentes Totais (CIF Total) da reação de Maillard em Café .....	68
Tabela 12. Limites de detecção e quantificação do método e repetibilidade da análise de HMF em cereal matinal tipo flocos, granola e café .....	71
Tabela 13. Recuperação do HMF em flocos, granola e café.....	72
Tabela 14. Conteúdo de HMF em cereais do tipo flocos (mg/kg).....	73
Tabela 15. Conteúdo de HMF em cereais do tipo granola (mg/kg) .....	73
Tabela 16. Conteúdo de HMF em café (mg/kg) .....	74
Tabela 17. Limites de detecção e quantificação do método e repetibilidade de furosina em cereais do tipo flocos, granola e café .....	76
Tabela 18. Recuperação do método de FUR em flocos, granola e café .....	76
Tabela 19. Conteúdo de furosina em cereais do tipo flocos de milho (M), açúcarados (A) e de chocolate (Ch) .....	78

Tabela 20. Conteúdo de furosina em cereais do tipo granola .....	78
Tabela 21. Conteúdo de carboximetilisina em cereais do tipo flocos de milho (M), açucarados (A) e de chocolate (Ch) .....	81
Tabela 22. Conteúdo de carboximetilisina em cereais do tipo granola (mg/g) .....	82
Tabela 23. Conteúdo de carboximetilisina em café (mg/kg).....	82
Tabela 24. Variância total explicada.....	85

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais etapas da reação de Maillard.....	22
Figura 2. Rotas alternativas para formação de AGEs/PRMs.....	24
Figura 3. Diagrama exemplificando o envolvimento de RAGE em disfunções relacionadas a idade .....	28
Figura 4. Estrutura química do HMF .....	33
Figura 5. Estrutura química da FUR .....	35
Figura 6. Estrutura química da CML.....	36
Figura 7. Esquema de amostragem .....	47
Figura 8. Correlação entre CIF livre e CIF total e Proteína e IF total .....	69
Figura 9. Correlação entre CIF livre e CIF total.....	69
Figura 10. Espectro de absorção do padrão de HMF.....	75
Figura 11. Perfil cromatográfico representativo das amostras para HMF.....	75
Figura 12. Correlação entre teor de HMF e FUR .....	79
Figura 13. Espectro de absorção da FUR.....	80
Figura 14. Perfil cromatográfico representativo das amostras para FUR.....	80
Figura 15. Gráfico de ACP das amostras de flocos, granola e café.....	86
Figura 16. Gráfico de ACP dos indicadores CIF livre, CIF total, FUR, HMF e CML_ .....	86

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 ASPECTOS DA REAÇÃO DE MAILLARD

A reação de Maillard (RM) corresponde a uma série de reações de escurecimento não enzimático primeiramente relatada por Louis Camille Maillard em 1912. A reação de Maillard ocorre também em organismos vivos, sendo, neste caso, denominada “glicação” (FINOT, 2005).

A RM inicia com o ataque nucleofílico do grupo  $\alpha$ -carbonílico de um açúcar redutor, por exemplo, ao grupamento amina de proteínas. A reação também pode ocorrer *in vivo* pela via do estresse carbonílico, na qual a oxidação de lipídeos ou de açúcares gera compostos dicarbonílicos intermediários altamente reativos. A glicólise e a autooxidação de glicose, por exemplo, produzem metilglioxal e glioxal, os quais interagem com aminoácidos para formar produtos finais desta reação. Estes compostos dicarbonílicos chegam a ser 20 mil vezes mais reativos do que a glicose e estão presentes tanto *in vivo* quanto nos alimentos (HUEBSCHMANN *et al*, 2006; MEADE *et al*, 2003 e CHARISSOU *et al.*, 2007b).

A ocorrência da reação em alimentos está relacionada e é dependente de vários fatores. Temperaturas elevadas (acima de 40°C), atividade de água na faixa de 0,3 a 0,7, pH na faixa de 6 a 8 (preferencialmente alcalino), umidade relativa de 30% a 70%, presença de cátions metálicos como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  que podem catalisar a reação, e da composição química do alimento (MORALES & VAN BOEKEL, 1997).

**Quadro 1.** Condições ótimas para ocorrência de escurecimento em alimentos\*.

Mecanismo	Oxigênio	Grupo amina	pH ótimo	Temperatura	Atividade de água
<b>Degradação do ácido ascorbico</b>	Sim/Não	Não	Ligeiramente ácido	Média	Média /alta
<b>Caramelização</b>	Não	Não	Básico/ácido	Alta	Baixa
<b>Reação de Maillard</b>	Não	Sim	Básico/ácido	Média	Baixa/media

\*Adaptado de FINOT, 2005.

Os diferentes tipos de carboidratos simples diferem quanto à velocidade de reação com os grupamentos amina, sendo que as aldoses são mais reativas que as cetonas, pois possuem o grupamento carbonila potencialmente livre. Foi demonstrado por Maillard, em 1912, que o grau de escurecimento dos açúcares redutores, quando reagem com aminoácidos, decresce na seguinte ordem: D-xilose, L-arabinose, hexoses (D-galactose, D-manose, D-glicose, D-frutose) e dissacarídeos (maltose e lactose). Por outro lado os aminoácidos mais reativos são lisina, arginina, triptofano e histidina (por apresentarem um grupo amina livre em suas cadeias laterais) ou grupamentos amina de nucleobases (NASS *et al*, 2007).

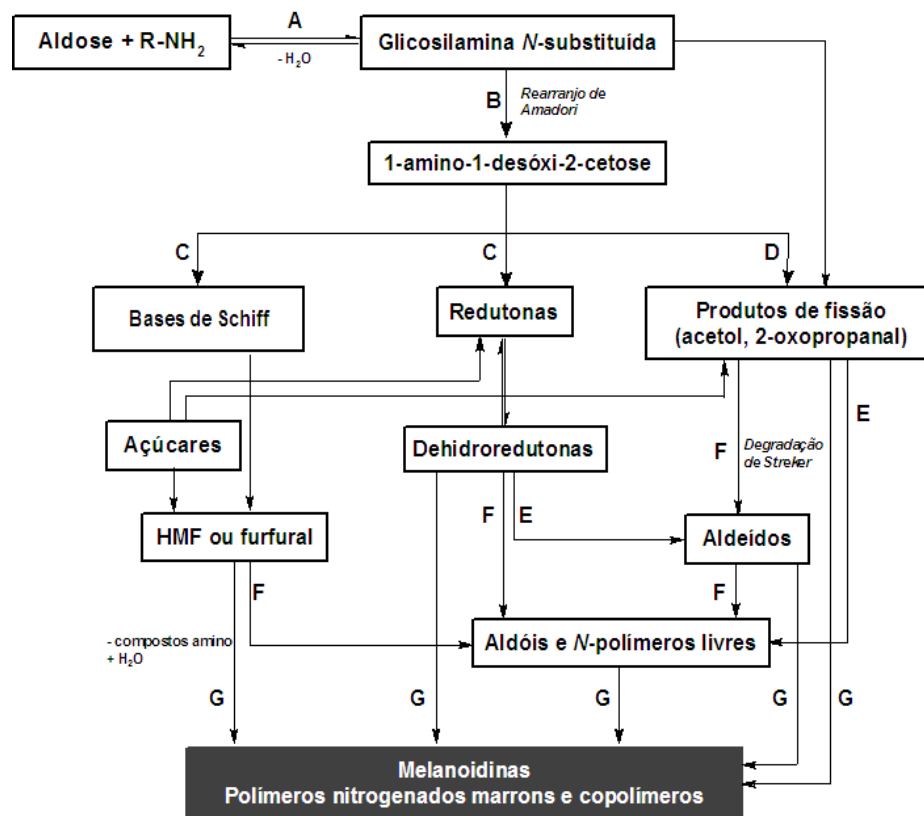
A figura 1 é uma adaptação do esquema desenvolvido por HODGE (1953), que descreve as cascatas de reações que foram divididas em 3 diferentes estágios:

- No estágio inicial ocorre a condensação da carbonila de um açúcar redutor com um grupamento amina proveniente de aminoácidos livres ou de proteínas, levando a formação de glicosilaminas *N*-substituídas. Os produtos formados nesta etapa não possuem cor, fluorescência ou absorção característica na região do ultravioleta e sofrem rearranjo para formar os

chamados dos produtos de Amadori (MORALES & van BOEKEL, 1997, NURSTEN, 2005; van BOEKEL, 2006);

- Na etapa seguinte, estes produtos dão origem a compostos dicarbonílicos, redutonas e derivados do furfural ou ainda produtos da degradação de Strecker (produtos de degradação de aminoácidos). Ocorre também o desenvolvimento de fluorescência e de absorção no ultravioleta (em função da presença de substâncias de coloração levemente amarelada);
- O último estágio da RM, a partir de reações de desidratação, fragmentação e polimerização, ocorre a formação de melanoidinas (compostos de coloração marrom) além do aumento da geração de compostos fluorescentes. Também são formados compostos voláteis tais como cetonas e aldeídos que conferem odor característico aos produtos termicamente processados (MORALES & Van BOEKEL, 1997; van BOEKEL, 2001a)

**FIGURA 1:** Principais etapas da reação de Maillard.



**Etapa inicial:** formação de substâncias incolores, sem absorção na região do UV (cerca de 280 nm) Reação A: condensação açúcar-grupamento amino. Reação B: Rearranjo de Amadori. **Etapa intermediária:** formação de substâncias de coloração amarelada com absorção intensa na região do UV. Reação C: Degradação de açúcares. Reação D: Fragmentação de açúcares. Reação E: Degradação de aminoácidos (Degradação de Strecker). **Etapa final:** formação de produtos coloridos. Reação F: Condensação aldólica. Reação G: Condensação amina-aldeído, formação de compostos nitrogenados (Baseado em NURSTEN, 2005).

A reação de Maillard confere e influencia atributos sensoriais fundamentais para a aceitação de alimentos termicamente processados, como a geração de compostos voláteis responsáveis pelo aroma e sabor

(aldeídos e cetonas) e pela cor (melanoidinas) e interferência na textura (CHARISSOU *et al*, 2007a e RADA-MENDOZA *et al*, 2004). Por outro lado pode originar compostos potencialmente tóxicos como a acroleína e as aminas heterocíclicas aromáticas.

## 1.2 PRODUTOS DA REAÇÃO DE MAILLARD (PRMs) E PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs)

Produtos da Reação de Maillard (PRMs) correspondem a um grupo heterogêneo de substâncias provenientes da reação de Maillard de peso molecular relativamente baixo. São formados em alimentos (em maior concentração) e em sistemas biológicos, sendo chamados neste caso de *Advanced Glycation End Products* (AGEs) ou *Produtos Finais de Glicação Avançada*. Os mecanismos de formação de AGEs e PRMs são bem semelhantes. Além das ligações proteína-carboidrato, os PRMs podem ser provenientes de peroxidação lipídica, recebendo o nome de Produtos Avançados da Lipoperoxidação (ALEs) (GOLDBERG *et al*, 2004).

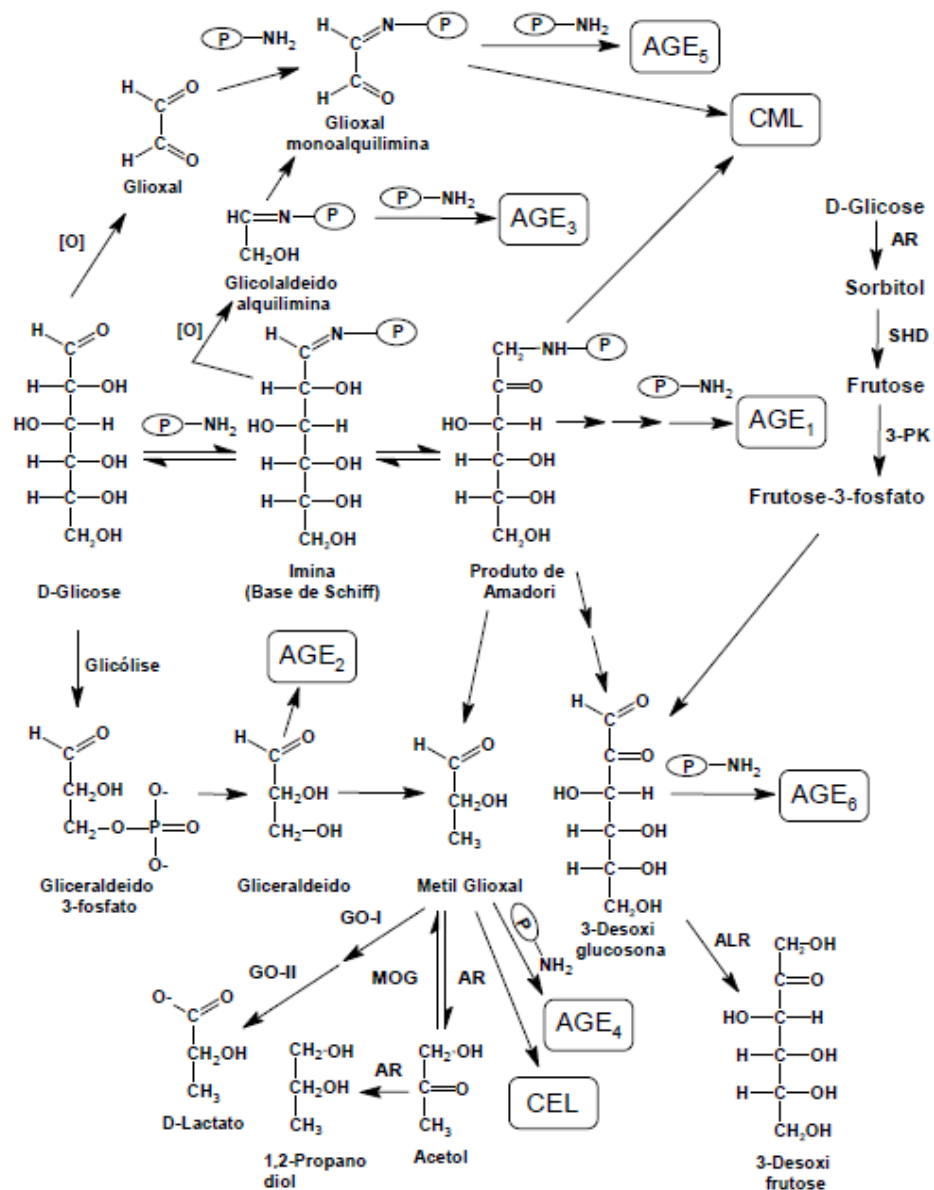
Desde a elucidação dos mecanismos da reação de escurecimento não enzimático de alimentos, há mais de 80 anos, os cientistas de alimentos estudam a relação entre estes mecanismos e os efeitos nas propriedades sensoriais, qualidade nutricional e segurança. Os estudos clínicos relacionando RM *in vivo* com doenças são relativamente bem mais recentes, datando dos últimos 15 anos, tendo como marco a, identificação da hemoglobina glicada em indivíduos com diabetes (FRIEDMAN, 1996)

As substâncias mais representativas encontradas em alimentos e em sistemas biológicos são: carboximetilisina, hidroximetilfurfural, pentosidina, crosslina, MRX, CML, CEL, pirralina, vesperlisina A, GOLD, MOLD, argpirimidina, glucosepana (NGUYEN, 2006).

Um mecanismo global para a formação dos PRMs é mostrado na figura 2



**Figura 2** Rotas alternativas para a formação de PRMs/AGEs



Os PRMs se originam da decomposição dos produtos de Amadori (AGE-1), glicogenólise do intermediário gliceraldeído (AGE-2), fragmentação da base de Schiff do gliceraldeído (AGE-3), fragmentação da triose-fosfato e do produto de Amadori metilglicoxal (AGE-4), auto-oxidação da glicose a glicoxal (AGE-5) e decomposição dos produtos de Amadori e frutose-3-fosfato a 3-Desoxi glicosona (AGE-6).

**Siglas:** CML: N-carboximetililina, CEL: carboxietililina, H<sub>2</sub>N-P: resíduo livre do aminoácido da proteína. AR: aldose redutase, SDH: sorbitol desidrogenase, 3-PK: frutose-3-

fosfoquinase, ALR: aldeído redutase, GO: glicoxalase, MOG: mono-oxigenase (Baseado no trabalho de Kikuchi, *et al.*, 2007)

Os PRMs estão presentes em alimentos que sofreram tratamento térmico, incluindo alimentos fritos, assados em churrasqueiras, cozidos em forno convencional ou microondas. Além disso, o aumento de temperatura parece ser mais crítico que a duração do processamento térmico para este processo. Métodos de cozimento mais brandos como preparações ensopadas e a vapor geram menores teores de PRMs. Como exemplo, cita-se peito de frango que foi cozido em fervura por uma hora a 230°C contém cerca de 1000 unidades de PRMs (realizado por método ELISA), enquanto o mesmo frango ao ser submetido à fritura, ser grelhado, cozido no vapor e ensopado conteria cerca de 9000, 6700, 4300 e 1000 unidades de PRMs (XHANTIS *et al.*, 2007).

Quantidades significativas de PRMs e melanoidinas passam pelo sistema digestório humano diariamente, mas pouco se sabe sobre o metabolismo destas substâncias. Embora ainda não se conheça quais AGEs/PRMs são absorvidos no intestino, sabe-se que uma pequena proporção alcança a corrente sanguínea e é excretada pela urina e que estes compostos são afetados por enzimas digestivas e pela microflora do intestino (NASS *et al.*, 2007). Recentemente, estudos com ratos indicaram que 20% dos PRMs são absorvidos pelo trato gastrointestinal por difusão passiva. Destes, apenas 30% são excretados pelos rins e cerca de 3% nas fezes. Cerca de 70% dos PRMs absorvidos acumulam-se em vários tecidos como pâncreas, fígado e principalmente rins. Os PRMs que não foram absorvidos irão ser degradados pelas bactérias intestinais (AMES, 2007).

Quais PRMs e seus metabólitos são absorvidos, metabolizados e seus efeitos na saúde ainda é um tema controverso na literatura. Resultados de pesquisas indicam que estas substâncias são parcialmente absorvidas e são biologicamente ativos (SOMOZA, 2005).

### 1.3 EFEITOS BIOLÓGICOS DOS PRODUTOS DA REAÇÃO DE MAILARD

Resultados de pesquisas recentemente publicados discutem a relação entre os PRMs presentes nos alimentos e a atividade biológica *in vivo*. Há trabalhos indicando que estes compostos podem atuar como glicotoxinas nos organismos e que a ingestão de PRMs correlaciona-se com a concentração sérica de AGEs em indivíduos saudáveis ou não (BUETLER, 2008; XANTHIS *et al.*, 2007; MONNIER, 2007; BAYNES, 2007). Certo é que nos últimos 50 anos o consumo destes produtos aumentou cerca de cinquenta vezes na dieta ocidental (DELGADO-ANDRADE *et al.*, 2007b), em especial na alimentação de adolescentes devido à tendência do consumo em *fast foods* e elevada ingestão de alimentos fritos ou submetidos a outros tipos de processamento térmico (DELGADO-ANDRADE *et al.*, 2007a).

SATTLER (1949) publicou o primeiro trabalho indicando que o consumo de PRMs poderia ser prejudicial à processos biológicos. Neste trabalho, observou-se que PRMs melaço de cana inibiam a fermentação pelas leveduras e a conseqüente produção de álcool. Em seguida outros estudos, assinados por Adrian e Finot avaliaram os efeitos fisiológicos destes compostos em: inibição do crescimento celular, redução da digestibilidade e absorção de proteínas, hipertrofia de órgãos, mutações celulares, redução das atividades de enzimas pancreáticas, intestinais, hepáticas e formação de complexos com metais. Esses efeitos seriam atribuídos às pré-melanoidinas ou seja, aos PRMs (FINOT, 2005).

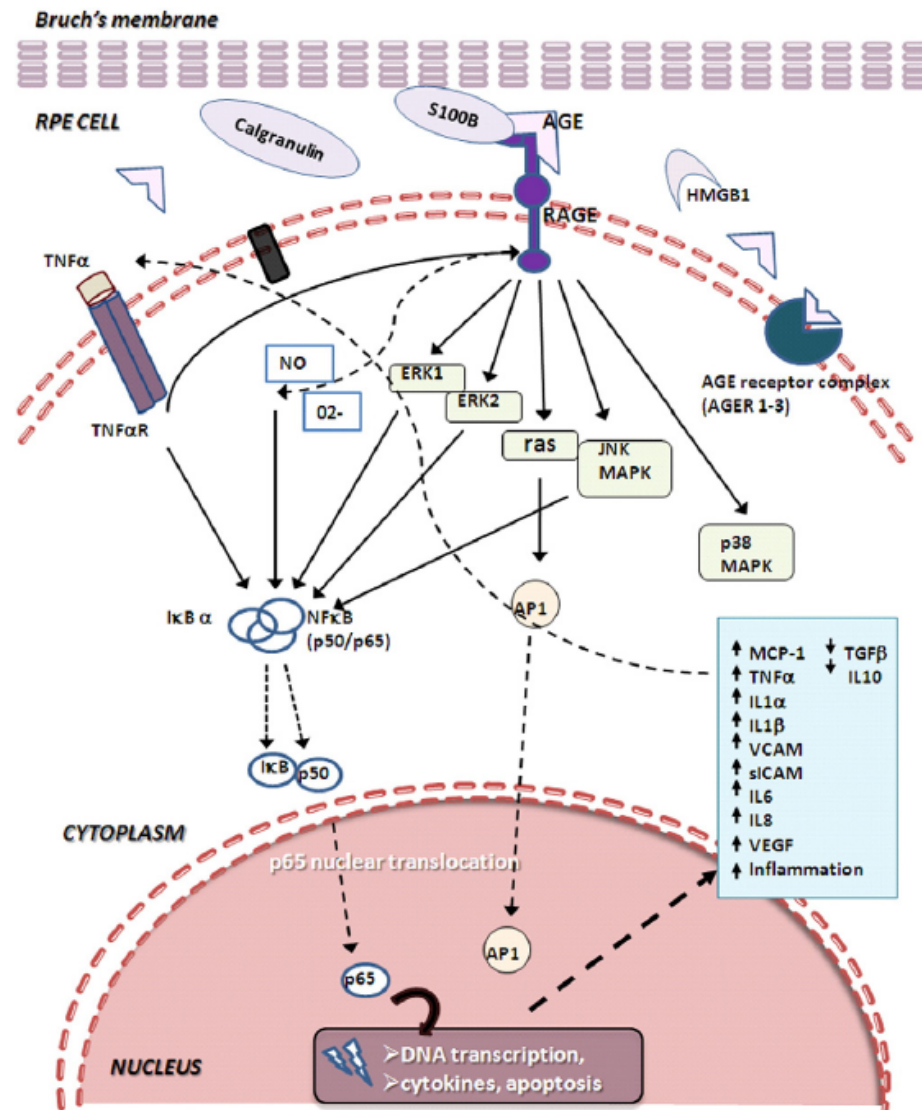
Há consenso sobre o efeito deletério da RM quanto ao comprometimento de aminoácidos essenciais, notadamente a lisina, levando à perda do valor biológico de alimentos. O processamento térmico de cereais matinais leva a perda de 20% -30% da lisina e à inibição da atividade de enzimas digestivas (SEIQUER *et al.*, 2006). Como a lisina é um aminoácido limitante em produtos a base de cereais, as condições de manufaturamento devem ser escolhidas cuidadosamente visando garantir,

não apenas características sensoriais, mas também o valor nutricional adequado (DELGADO-ANDRADE *et al.*, 2007a).

Os PRMs estão implicados no mecanismo de envelhecimento e perda de funcionalidade de tecidos principalmente em tecidos com proteínas de longa vida como o cristalino, a membrana basal das arteríolas, as células nervosas e os tecidos intersticiais da pele, que não são dependentes de insulina, e por isso, encontram-se expostos a concentrações elevadas de glicose. A catarata e aterosclerose, em alguma extensão, são patologias resultantes da RM nestes tecidos pela ligação de moléculas de glicose sanguínea com proteínas de longa duração destes tecidos (XANTHIS *et al.*, 2007).

Os PRMs ainda podem causar danos aos tecidos por: 1) modificar a função da proteína devido à alterações em sua estrutura/configuração, 2) modificar o tecido em si, devido às ligações cruzadas (*cross-links*) inter e intra-molecular, 3) favorecer a formação de radicais livres e 4) induzir resposta inflamatória após ligarem-se a receptores específicos - RAGE - como mostra a figura 3 (NASS *et al.*, 2007; SOMOZA, 2005).

**Figura 3.** Diagrama exemplificando o envolvimento do RAGE em disfunções relacionadas a idade\*.



TNF $\alpha$ : fator de necrose tumoral, TNF $\alpha$ R: receptor do TNF $\alpha$ , NO: Oxido nítrico, O $_2$ : Oxigênio, I $\kappa$ B $\alpha$ : Inibidor do  $\kappa$ B, NF $\kappa$ B: fator nuclear kappa B, AP1: proteína ativadora 1, JNK: Jun N-terminal quinase, MAPK: Proteína quinase mitógeno-ativada, MCP-1: Proteína quimioatratadora de monócitos 1, IL1 $\alpha$ : Interleucina 1 Alfa, IL1 $\beta$ : Interleucina 1 beta, IL-6: Interleucina 6, IL-8: Interleucina 8, IL -10: Interleucina 10, VCAM: Molécula de adesão vascular 1, sICAM-1: Molécula intracelular de adesão-1, VEGF : Fator de crescimento endotelial vascular, TGF- $\beta$ : Fator de crescimento transformador beta.

(Baseado em: GLENN e STITT, 2009).

Como podemos observar na figura 3, o RAGE modula vias pró-inflamatórias ocasionando ativação transcricional e expressão alterada em vários mediadores inflamatórios como as citocinas (GLENN e STITT, 2009).

Alem disso a ligação de PRMs a tecidos como a retina, endotélio, mesenquimas e células renais levam à (figura 3):

- Disfunção endotelial (prejudicando a vasodilatação devido a diminuição da produção de monóxido de nitrogênio -NO);
- Ativação acelerada de macrófagos para as células espumosas;
- Diminuição da flexibilidade das células musculares lisas, comprometendo a complacência arterial e;
- Torna a LDL mais sensível a oxidação (GLENN e STITT, 2009).

O efeito patológico da somatória dos AGEs no corpo humano está relacionado também com sua habilidade em modificar química e biologicamente as biomoléculas, dada a natureza não reversível da ligação de *cross-link* entre carbonilas e grupamentos aminas e pela habilidade de se ligar à vários receptores celulares específicos para AGEs (RAGEs), promovendo o estresse oxidativo e a ativação de vias pró-inflamatórias (figura 3) (GLENN e STITT, 2009).

Os AGEs podem estar associados às complicações renais e disfunção endotelial em pacientes com diabetes tipo 2, bem como na doença de Alzheimer (GOLDBERG *et al*, 2004 e SASAKI *et al*, 1998) a fatores de risco de doenças cardiovasculares (TAN *et al*, 2002, ROJAS & MORALES, 2004 e KOSCHINSKY *et al*, 1997). Além disso, são relatados efeitos biológicos negativos, como perda de aminoácidos essenciais e de sua biodisponibilidade (DELGADO-ANDRADE *et al*, 2007b e 2005), envelhecimento precoce (URIBARRI *et al*, 2007) alterações de vitaminas, queda da biodisponibilidade de alguns minerais (DELGADO-ANDRADE *et al*, 2007c), efeitos mutagênicos e carcinogênicos (SOMOZA, 2005).

Indivíduos diabéticos, em particular, apresentam diversas complicações devido aos processos de glicação e, atualmente, recomenda-se que sua dieta aporte menores teores de PRM. Conforme relatado por

XANTHIS *et al.* (2007), a redução de 50% na ingestão de PRM na dieta de indivíduos diabéticos resultou em decréscimo de 30% dos teores plasmáticos destes mesmos compostos, em apenas um mês (embora o nível de hemoglobina glicosilada -HbA1c- não tenha sido modificado).

Estima-se que os indivíduos que consomem maiores proporções de PRM estão expostos a maiores riscos de desenvolver complicações do diabetes como disfunções vasculares e renais (XANTHIS *et al.*, 2007) e que estima-se que o consumo seguro para indivíduos com diabetes seja de no máximo 16000 unidades de PRMs por dia (medida relativa a carboximetilisina) (TAN *et al.*, 2002; ROJAS & MORALES, 2004).

Estudos com ratos mostraram que os animais que receberam dietas contendo altos teores de PRM por 6 meses desenvolveram diabetes mellitus tipo II, enquanto os animais do grupo controle (dieta equivalente em composição e valor calórico, mas com teores de PRM reduzidos) não desenvolveram esta doença (ROJAS & MORALES, 2004).

Outros estudos identificaram que o consumo de PRM por ratos está associado à síntese de citosinas inflamatórias (TNF- $\alpha$  e proteína C reativa) e ao desenvolvimento de nefropatologias (VLASSARA & PALACE, 2003, SANDU *et al.*, 2005, LIN *et al.*, 2003, URIBARRI *et al.*, 2007). Desta forma, identificar os níveis de PRM em alimentos produzidos e comercializados para pessoas com diabetes é uma ação que visa a orientação desta população e prevenção de patologias decorrentes desta condição, além de contribuir para estimar um limite seguro de consumo destes produtos.

Além dos PRMs estarem implicados em complicações do diabetes mellitus, estudos demonstram um papel importante na patogênese de doenças neurodegenerativas. SASAKI *et al.*, (1998) observaram, em seu estudo com humanos com diversas patologias neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e esclerose múltipla, que as concentrações de AGEs em placas amilóides eram elevadas contribuindo assim para disfunção neuronal, representando importante fator de progressão dessas doenças.

Por outro lado, por ser um tema controverso, há autores que sugerem evidências de que estas substâncias, principalmente as melanoidinas

apresentam atividade benéfica como atividade antimutagênica. Um resumo das principais atividades biológicas benéficas desses compostos está no quadro 2.

**Quadro 2.** Efeitos na saúde dos PRMs e melanoidinas extraídos de sistemas modelo.\*

<b>Efeitos na saúde</b>	<b>Principais resultados obtidos</b>
Efeitos no intestino	Sistema modelo de melanoidinas estimulam o crescimento de bactérias benéficas no intestino além de inibirem a atividade de amins heterocíclicas e diminuir sua absorção.
Efeitos quimiopreventivos	Indução de enzimas quimiopreventivas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .
Efeitos na capacidade antioxidante	Inibição da peroxidação lipídica em hepatócitos isolados. Aumento da capacidade antioxidante no plasma de humanos após administração de alimentos com melanoidinas.
Efeito mutagênico e genotóxico	Em comparação com efeitos mutagênicos conhecidos misturas de melanoidinas mostram efeitos mutagênicos insignificantes <i>in vitro</i>

\*Adaptado de Somoza, 2005

#### 1.4 COMPOSTOS MARCADORES DA REAÇÃO DE MAILLARD

A extensão da reação de Maillard em alimentos pode ser monitorada pela formação de alguns compostos, o que permite avaliar a intensidade do processamento térmico e as alterações nutricionais relacionadas a ele. Entre eles estão: a furosina (FUR), o hidroximetilfurfural (HMF) e a



carboximetilisina (CML). Estes indicadores são precursores dos pigmentos escuros formados na fase final da RM. Vale ressaltar ainda que estes indicadores não avaliam a cinética da RM mas sim quantificam a formação de substâncias indicadores de tratamento térmico de alimentos. (RUFÍAN HENARES *et al.* 2009a e 2009b; CHARISSOU *et al.*, 2007, DELGADO-ANDRADE *et al.*, 2009; MATIACEVICH e BUERA, 2006).

#### 1.4.1 Compostos Intermediários Fluorescentes

A determinação da fluorescência foi proposta como um procedimento efetivo para avaliar a extensão da reação de Maillard, sendo utilizada como marcador de estágios intermediários desta reação, já que os produtos do rearranjo de Amadori sofrem desidratações e fissões com o processamento térmico formando redutonas incolores e substâncias fluorescentes (BAISIER & LABUZA, 1992 e MATIACEVICH *et al.*, 2005).

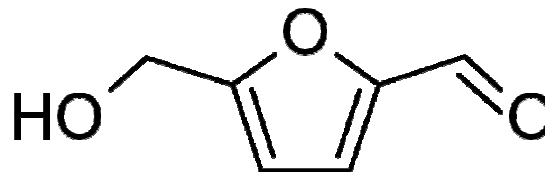
Substâncias fluorescentes são precursores de pigmentos marrons formados no estágio final da reação de Maillard, porém de diferentes estruturas químicas. Embora as substâncias fluorescentes não tenham estruturas definidas, a sua determinação é considerada como melhor indicador para avaliação da qualidade nutricional de alimentos termicamente processados do que as melanoidinas (RUFIAN-HENARES *et al.*, 2009a, MORALES e Van BOEKEL, 1998).

Devido a grande diversidade de compostos fluorescentes produzidos durante a RM, a intensidade de fluorescência pode ser medida em comprimentos de onda que variam de 340, 350 ou 360 nm de excitação e de 415 ou 440 nm de emissão. Este tipo de análise foi usada primeiramente para avaliar a formação de PRMs em leite e hoje é utilizada para acompanhar o processamento de cereais matinais, soja e produtos de panificação, entre outros (DELGADO-ANDRADE *et al.*, 2006; CONTREAS-CALDERON *et al.*, 2008)

#### 1.4.2 Hidroximetilfurfural

O Hidroximetilfurfural - HMF é um composto intermediário formado naturalmente pela RM que pode ser formado também pela degradação de hexoses a altas temperaturas em meio ácido. Após a polimerização deste composto com grupamentos amina são formados pigmentos escuros (RUFIAN-HENARES *et al.*, 2001, MORALES *et al.*, 1997a).

**Figura 4.** Estrutura química do HMF



O HMF é considerado marcador de dano térmico para produtos contendo altas concentrações de carboidratos, tais como: frutas processadas, vegetais desidratados, café, mel e leite. Pode ser utilizado também para monitorar o processo térmico aplicado em produtos a base de cereais como pão, cereais infantis e cereais matinais (RUFIAN-HENARES *et al.*, 2009b).

A formação de HMF está diretamente ligada ao calor aplicado ao alimento. O HMF não ocorre em alimentos crus e frescos, mas é produzido rapidamente durante o processamento térmico e também no armazenamento prolongado de produtos ricos em carboidratos (RUFIAN-HENARES *et al.*, 2009a e 2009b, VORLOVA *et al.*, 2006).

O hidroximetilfurfural tem sido estudado em produtos alimentícios principalmente por ter sido associado a danos ao DNA. Além disso, seus derivados como 5-clorometilfurfural e 5-sulfoximetilfurfural revelaram-se citotóxicos, genotóxicos e carcinogênicos (GLATT *et al.*, 2005). Os

mecanismos dos efeitos toxicológicos não foram bem esclarecidos (SURH & TANNENBAUM, 1994 e TEIXIDÓ *et al.*, 2006).

A determinação de HMF pode ser realizada por métodos espectrofotométricos e colorimétricos. Estes métodos, porém, apresentam limitações por sofrerem interferência de outras substâncias cromóforas em alimentos que absorvem radiação na mesma região de leitura. Além disso, os métodos colorimétricos apresentam baixa sensibilidade e falta de especificidade. As técnicas cromatográficas são mais acuradas e sensíveis para esse fim. Além disso, estas técnicas permitem a determinação do HMF e do furfural separadamente (ERBERSDOBLER e SOMOZA, 2007).

Esse composto já foi analisado como indicador dos PRM em estudos com: *a)* cereais matinais, que contém frutas desidratadas, caramelos e mel, que normalmente apresentam altos teores de HMF; *b)* massas e *c)* produtos de panificação (RUFIAN-HENARES *et al.*, 2006b). O conteúdo de HMF varia muito nos alimentos e, em geral, está relacionado à presença de ingredientes como caramelos, mel, entre outros.

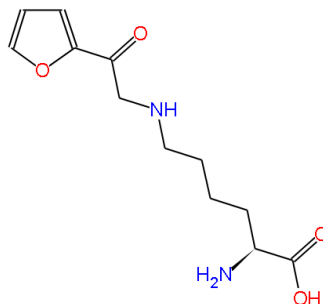
As concentrações de HMF determinadas em dois tipos de cereais matinais: com mel (*honey rings*) e a base de milho (*corn flakes*) foram de 27,2 mg/kg e 47,2 mg/kg respectivamente (TEIXIDÓ *et al.*, 2008). Já misturas de cereais matinais foram analisadas e os valores encontrados foram de 43mg/kg de produto (RUFIAN-HENARES *et al.*, 2006a). Em algumas frutas secas e produtos caramelados esta concentração pode chegar a 1000mg/kg devido a degradação de carboidratos a altas temperaturas.

### 1.4.3 Furosina

A furosina ( $\epsilon$ -N-2-furoilmetil-l-lisina) é gerada por meio da hidrólise ácida dos compostos de Amadori. Estes compostos são formados pela interação do grupo  $\epsilon$ -amino da lisina com glicose, lactose ou maltose resultando respectivamente em frutoselisina, lactuloselisina e maltoloselisina

com conseqüente perda do grupamento amino no início da RM. Por esta razão, a estimativa do dano às proteínas causadas pelo aquecimento é geralmente baseada na determinação da quantidade de furosina formada durante a hidrólise ácida dos alimentos (DELGADO-ANDRADE *et al.*, 2005 e RADA-MENDOZA *et al.*, 2004, GUERRA-HERNANDEZ *et al.*, 1999). O teor de furosina presente em alimentos pode ser influenciada pelo processo térmico empregado e pelo tempo de armazenamento. Os níveis de furosina tendem a decair após armazenamento prolongado ou em geral por tratamento térmico severo para dar origem a outros compostos como a CML (FRIEDMAN, 1996; HENLE *et al.*, 1991).

**Figura 5.** Estrutura química da FUR



A furosina é o mais específico e mais importante indicador da fase inicial da RM. É amplamente utilizada em análises de produtos a base de cereais visto que a lisina é o aminoácido limitante deste tipo de produto e, desta forma, a presença da furosina é indicativa da perda do valor biológico da proteína. O monitoramento da furosina ajuda a adequar as condições de produção para garantir a manutenção do valor nutricional dos produtos (RUFIAN-HENARES *et al.*, 2006b, 2004 e RESMINI *et al.*, 1990).

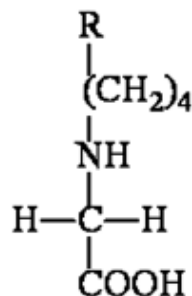
Em 1992, DELGADO *et al.*, propuseram um procedimento baseado em CLAE com pareamento de íons aplicado em uma série de estudos. Desde 1996, devido ao início da disponibilidade comercial do padrão puro de furosina, a maior parte dos laboratórios utiliza CLAE em fase reversa para sua determinação. (ERBERSDOBLER e SOMOZA, 2007 e HENLE *et al.*,

1995) Devido a possível transformação da furosina em CML durante o aquecimento das amostras, é necessária que a hidrólise ácida seja realizada em atmosfera inerte para que o oxigênio não favoreça a degradação da FUR a CML (FRIEDMAN, 1996; RUFIAN-HENARES *et al.*, 2004)

#### 1.4.4 Carboximetilisina

A CML pode ser formada pela oxidação da frutose (furosina) ou pela reação entre o ascorbato e proteínas sob condições de autooxidação. Ainda pode ser formada a partir do metilglioxal, produto da peroxidação lipídica, ou a partir do glioxal, produto da autooxidação de açúcares (CHARISSOU *et al.*, 2007a, BOSCH, 2007b).

**Figura 6.** Estrutura química da CML



A carboximetilisina (CML) é importante indicador da reação de Maillard assim como da qualidade nutricional de produtos que sofreram forte tratamento térmico (GOLDBERG *et al.*, 2004 e CHARISSOU *et al.*, 2007a; PISCHETSRIEDER, 2008).

Este composto apresenta atividade biológica, isto é, pode reagir com tecidos *in vivo*, e constitui um dos principais marcadores da reação de produtos avançados da glicação avançada (AGEs) (CHARISSOU *et al.*,

2007b). A CML pode ser sintetizada *in vivo*. Durante o envelhecimento as moléculas de açúcar circulantes no sangue podem se ligar a proteínas de longa vida de tecidos como as do colágeno. Além disso, está associada com a fisiopatologia de várias doenças degenerativas, mediadores inflamatórios e complicações vasculares em diabéticos. O mecanismo proposto é a ligação do CML por receptores de AGEs (RAGEs) presentes em monócitos, macrófagos, células nervosas e epiteliais (CHARISSOU *et al.*, 2007a).

A carboximetilisina é estável durante as etapas do processo analítico (ERBERSDOBLER e SOMOZA, 2007) e apresenta baixa reatividade (CHARISSOU *et al.*, 2007b). As 3 principais técnicas propostas para quantificar CML em alimentos são: a) CLAE em fase reversa, b) CG/MS usando derivatização dupla do grupo carboxílico e amino dos aminoácidos e c) ensaio imunoenzimático, este último foi desenvolvido primeiro em análise de CML *in vivo* usando anticorpos contra CML de albumina sérica bovina, depois aplicado em várias matrizes alimentícias (CHARISSOU *et al.*, 2007a).

Atualmente os principais estudos com CML em alimentos são realizados por meio de ensaios imunoenzimáticos específicos para este composto. O teste ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) para CML é chamado genericamente de teste AGE-ELISA. Este teste foi desenvolvido para determinação quantitativa *in vitro* de CML em amostras biológicas ou alimentos. O teor de CML é usualmente considerado como correspondente dos níveis de PRMs da amostra (BIRLOUEZ-ARAGON *et al.*, 2004; GOLDBERG, 2004)

## 1.5 PRMS EM ALIMENTOS

Os PRMs têm sido analisados em diferentes alimentos. Para a quantificação destas substâncias e avaliação da intensidade do tratamento térmico e conseqüente perda de valor nutricional de alimentos, a quantificação de marcadores como: a fluorescência, teor de furosina, hidroximetilfurfural, carboximetilisina, pentosidina, pronilisina, pirralina têm

sido empregados. As técnicas analíticas mais comumente utilizadas compreendem: a espectrofotometria, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa e métodos imunológicos (ELISA).

Não existem dados sobre a composição e o teor de PRMs em alimentos processados no Brasil. A tabela 1 sumariza os dados de PRM encontrados em alimentos publicados na literatura internacional. Como podem ser observados, os alimentos presentes no grupo “gorduras” apresentam maiores teores de PRMs, devido os produtos de oxidação lipídica serem muito reativos com grupamentos aminas. Neste grupo estão incluídos manteiga, requeijão, margarina, maionese, óleos e oleaginosas. Altos teores de PRMs também foram encontrados em alimentos do grupo carnes, peixes e ovos sempre relacionados ao tipo de cocção aplicada. Os alimentos do grupo de carboidratos, apesar de conterem teores intermediários de PRMs, são foco de cuidado e atenção científica, devido à sua participação na dieta e pela lisina ser o principal aminoácido envolvido na reação. Neste grupo estão incluídos panquecas, pães, frutas, verduras.

Não há consenso, na comunidade científica, sobre a necessidade de estabelecer limites de ingestão para PRMs. Há que considerar o crescente consumo dos alimentos processados, contendo essas substâncias. RUFÍAN-HENARES *et al.*, (2006a) sugerem que o consumo deveria ser em torno de 45mg de PRM/kg de peso do indivíduo. Embora haja recomendação de consumo, não existe consenso sobre nível de ingestão aceitável para estas substâncias, o que dificulta a classificação de alimentos quanto à serem fonte de PRMs. Além disso, a falta de uniformização das unidades de medida dos diversos estudos publicados com estes indicadores dificulta ainda mais a comparação entre os estudos e resultados, como também pode ser observado na tabela 1.

**Tabela 1.** Conteúdo de Produtos da Reação de Maillard (PRMs) em alguns alimentos.

Alimento	PRM	Autor/Ano	Metodologia utilizada
<b>Gorduras</b>			
Óleo de oliva	120 kU*/mL	GOLDBERG <i>et al.</i> , 2004	Teste imunoenzimático
Manteiga	265 kU*/g	GOLDBERG <i>et al.</i> , 2004	Teste imunoenzimático
<b>Proteínas</b>			
Queijo	87 kU*/g	GOLDBERG <i>et al.</i> , 2004	Teste imunoenzimático
Frango frito -15 min	61 kU*/g	GOLDBERG <i>et al.</i> , 2004	Teste imunoenzimático
<b>Carboidratos</b>			
Panqueca caseira	10 kU*/g	GOLDBERG <i>et al.</i> , 2004	Teste imunoenzimático
Pão com miolo	0,54 kU*/g	GOLDBERG <i>et al.</i> , 2004	Teste imunoenzimático
Crosta de pão	15 mmol de CML/mol lisina	PISCHETSRIEDER, 2008	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE – ESI-MS/MS)
Mix de cereais Matinais	70 mg/kg	RUFÍAN-HENARES <i>et al.</i> , 2006a	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)
Mix de cereais Matinais	730 mg/kg	DELGADO ANDRADE <i>et al.</i> , 2007a	CLAE
Flakes	472000 mg/kg	TEIXIDÓ <i>et al.</i> , 2008	Cromatografia líquida com espectrômetro de massa (LC-MS)
Flakes	2 kU*/g	GOLDBERG <i>et al.</i> , 2004	Teste imunoenzimático
Granola	1,94 kU*/g	KOSCHINSKY <i>et al.</i> , 1997	Teste imunoenzimático
Café	8,8kU*/mL	KOSCHINSKY <i>et al.</i> , 1997	Teste imunoenzimático
Chá	8,1 kU*/mL	KOSCHINSKY <i>et al.</i> , 1997	Teste imunoenzimático
Fórmulas infantis	4,86 kU*/mL	GOLDBERG <i>et al.</i> , 2004	Teste imunoenzimático
Fórmulas enterais	20 mg/L	RUFÍAN-HENARES <i>et al.</i> , 2001	CLAE

\*kU: kilo unidades. Determinação por método ELISA.



## 1.6 CEREAIS MATINAIS E CAFÉ

Cereais matinais representam importante fonte de carboidratos na dieta do mundo ocidental (DELGADO- ANDRADE *et al.*, 2007b). No Brasil, o consumo de cereais matinais cresceu cerca de 70% nos últimos 7 anos no Brasil. Este produto está presente em cerca de 30% dos lares brasileiros (GÓMEZ, 2007).

A produção dos cereais matinais do tipo flocos compreende uma série de etapas que empregam altas temperaturas. A massa base, que pode ser feita de farinha de milho e outros ingredientes, passa primeiro por um processo de cozimento (80-95°C) e peletização por extrusão. Os flocos são secos usando ar quente e, em seguida, resfriados a temperatura ambiente. Na fase final faz-se a tostagem, etapa em que se empregam temperaturas entre 150-170°C em ambiente de atividade de água intermediárias, fatores que favorecem a reação de Maillard (DELGADO-ANDRADE *et al.*, 2005; RUFIAN-HENARES *et al.*, 2006a).

A granola é uma mistura de cereais (em geral composta de aveia, farelo de trigo, gérmen de trigo, flocos de arroz, flocos de milho), sementes e castanhas, frutas secas, açúcar mascavo, mel, coco e outros ingredientes. Essa mistura é importante fonte de fibras, sais minerais, carboidrato e vitaminas. De modo geral o processo de fabricação inclui várias etapas como: seleção de matéria prima, pesagem, mistura dos cereais com açúcar, aquecimento até caramelização do açúcar, resfriamento, adição dos demais ingredientes, pesagem e embalagem. Durante o aquecimento, os cereais em bandejas são dispostos no forno ou secador contínuo a temperaturas de 150°C a 220°C até atingir coloração marrom e umidade de 3% (UCHIMURA, 2006)

GOLDBERG *et al.*, (2004) avaliaram o teor de PRMs (expressos em carboximetilisina) em cereais e encontraram, para metodologias de ELISA, teores de 200 kU/100g de produto. KOSCHINSKY *et al.*, (1997) encontraram

193,4 kU/100g de PRMs em mix de cereais que foram submetidos a 175°C por 25 min.

O consumo de café no Brasil cresce a cada ano. Em 2007, o consumo *per capita* de café em grão cru foi de 5,53 kg ou 4,42 kg de café torrado, quase 74 litros para cada brasileiro por ano (ABIC, 2008).

Para a produção do café é realizada a torrefação do grão, o qual é aquecido a temperaturas entre 200-250°C por 5-15 minutos, dependendo do grau de torrefação. Durante este processo, reação de Maillard, degradação de Strecker, pirólise e outras reações químicas produzem um grande número de diferentes compostos voláteis, além das melanoidinas. Estudos recentes demonstram que o processo de torrefação aumenta a formação de compostos  $\alpha$ -dicarbonílicos, moléculas provenientes de degradação de carboidratos que são mais reativos que açúcares redutores. Estes compostos estão implicados em reações com implicações deletérias para estruturas teciduais e celulares (BUETLER, 2008).

KOSCHINSKY *et al.* (1997) determinaram o teor de PRMs em bebidas comuns como o café e chá. Os valores encontrados foram de 2.200 kU/250mL para café e 2.025 kU/250mL para chá.

Estima-se que o consumo de substâncias oriundas da reação de Maillard pela população das áreas urbanas venha aumentando, em função do incremento do consumo de alimentos processados, os quais sofreram tratamento térmico, favorecendo esta reação. A glicação, reação entre produtos da reação de Maillard em sistemas biológicos, é um grave problema para a população com diabetes, pois os altos níveis de glicose circulante podem se ligar as proteínas de alta durabilidade como as do cristalino e da cartilagem modificando-as. Além disso, podem contribuir para complicações renais em pacientes diabéticos.

Embora ainda haja controvérsias sobre o papel dos produtos da reação de Maillard de alimentos processados na etiologia de processos biológicos deletérios, a comunidade científica mobiliza-se para avaliar se o grau de exposição da população (dado o aumento do consumo) pode tornar-

se um problema de saúde pública, o que, certamente, exigirá ações por parte das indústrias de alimentos.

Os cereais matinais e o café são exemplos típicos de alimentos amplamente consumidos pela população em geral, independente da faixa etária e que contribuem de forma significativa, na dieta, para a ingestão de PRM.

Embora a reação de Maillard tenha sido descoberta a mais de um século atrás, e seja tecnologicamente desejável, pouco se conhecia sobre seus possíveis efeitos biológicos. Esta é uma área da ciência de alimentos que ainda precisa ser investigada para chegar a um consenso sobre o assunto.

## 2. OBJETIVOS

Avaliar o teor de compostos resultantes da reação de Maillard em cereais matinais e café.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar pesquisa das marcas mais presentes de cereais do tipo flocos, granola e café torrado e moído comercializadas na cidade de São Paulo entre os anos de 2008 e 2009.
- Determinar a composição centesimal de amostras de cereal matinal tipo floco, granola e café.
- Avaliar o teor de Compostos Intermediários Fluorescentes (CIF) livres formados pela reação de Maillard em cereais do tipo flocos e granola;
- Avaliar o teor de Compostos Intermediários Fluorescentes (CIF) totais formados pela reação de Maillard em cereais do tipo flocos e granola.
- Validar a metodologia de quantificação de HMF em cereais do tipo flocos, granola e café e proceder à sua quantificação;
- Validar a metodologia de quantificação de FUR em cereais do tipo flocos, granola e café e proceder a sua quantificação;
- Quantificar o teor de carboximetilisina em cereais matinais tipo do tipo flocos, granola e café.
- Realizar Análise de Componentes Principais a partir dos dados obtidos neste estudo.

### 3. MATERIAIS

#### 3.1 SOLVENTES E REAGENTES

Os solventes e reagentes utilizados para as determinações analíticas da composição centesimal foram: ácido sulfúrico, ácido bórico, ácido clorídrico, éter de petróleo e éter etílico. Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau P.A. e foram adquiridos da empresa Labsynth (Brasil).

Os reagentes utilizados para a determinação de Compostos Intermediários Fluorescentes foram: ferrocianeto de potássio e acetato de zinco apresentavam grau P.A. (Labsynth, Brasil). A enzima Pronase E foi obtida da empresa Merck (EUA) e o padrão externo, sulfato de quinino, foi adquirido Sigma Aldrich (Alemanha).

Os reagentes para determinação de Hidroximetilfurfural foram: Ferrocianeto de potássio e acetato de zinco apresentavam grau P.A. adquiridos da empresa Labsynth (Brasil) O ácido fórmico foi obtido da empresa Merck (EUA). A acetonitrila apresentava grau HPLC (Carlo Erba, Itália). O padrão de Hidroximetilfurfural foi obtido da marca Acros Organics (EUA) e apresentava 98% de pureza.

Os reagentes utilizados para determinação de Furosina foram grau P.A. ou cromatográficos dependendo da análise. Os ácidos clorídrico e fórmico foram grau P.A. obtidos da empresa Labsynth (Brasil) e Merck (EUA) respectivamente. Os solventes metanol e acetonitrila foram grau HPLC, marca Carlo Erba Brasil (CER Brasil). O sal heptano sulfonado de sódio foi obtido da empresa Sigma Aldrich (Alemanha). O padrão foi obtido da empresa PolyPeptide Group 99,5% (França)

### 3.2 AMOSTRAS

Tendo em vista que os hipermercados são responsáveis por 80% de compra de alimentos da população (ABRAS, 2009), foi realizada uma pesquisa das marcas mais presentes de cereais tipo flocos e granola e café nos principais hipermercados da região metropolitana de São Paulo. Para escolha destes hipermercados, os distritos de São Paulo foram divididos em tercil segundo o Índice de Desenvolvimento Humano (Quadro 3) (SÃO PAULO, 1997).

Foram escolhidos 2 hipermercados de cada subdivisão em tercil, totalizando 6 lojas. As marcas de cereal tipo flocos, granola e de café selecionadas para este estudo foram aquelas que estavam presentes em todos locais visitados.

Três marcas do cereal tipo flocos (F1, F2, F3) eram comercializadas em todos os locais pesquisados e destas marcas três tipos diferentes de flocos: Milho, Açúcar e Chocolate (M, A, Ch) foram encontrados.

Para granola, três marcas estavam presentes em todos os hipermercados visitados (G1, G2, G3). Destas marcas, selecionou-se apenas o sabor tradicional (TG1, TG2, TG3).

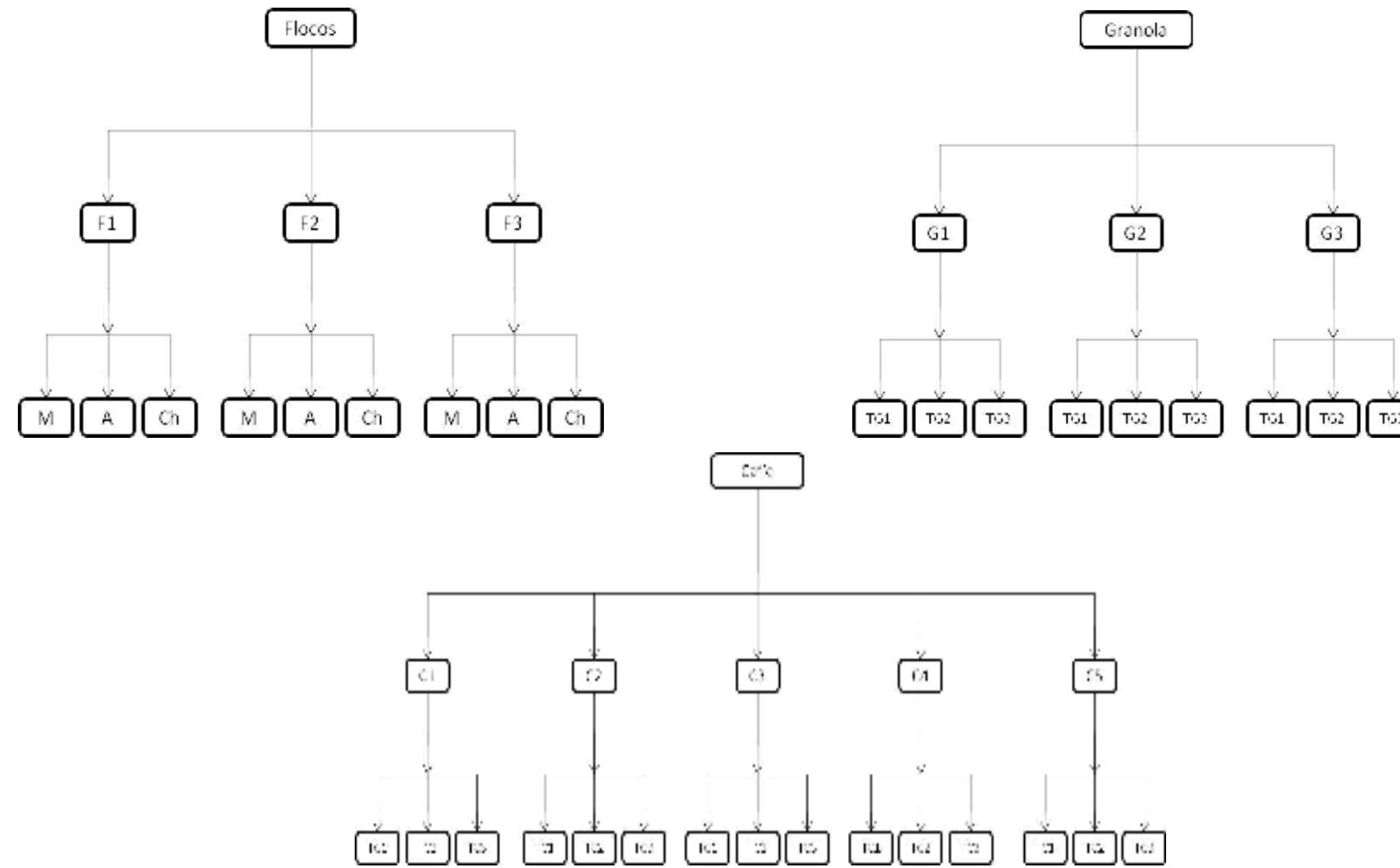
Para o café, 5 marcas estavam presentes em todos os hipermercados visitados (C1, C2, C3, C4, C5). Dentre a grande variedade de tipo de grão e grau de torrefação, foi escolhido o tipo tradicional (TC1, TC2, TC3, TC4, TC5) como descrito na figura 3.

Foram coletados dois lotes de cada produto conforme recomendado por GALEAZZI *et al.*, 2002 e a NEPA, 2006.

Para o preparo das amostras o conteúdo total de cada embalagem foi triturado em processador doméstico e peneirado em peneira com malha de 425 µm de abertura. Para todos os produtos, cerca de 20% do produto triturado ficou retido na peneira. Porém, para assegurar a representatividade da amostra o conteúdo total (peneirado e não peneirado) foi combinado e homogeneizado.

**Quadro3.** Índice de Desenvolvimento Humano da região metropolitana de São Paulo

1º tercil	Distrito	IDH-M	2º tercil	Distrito	IDH-M	3º tercil	Distrito	IDH-M
1	Marsilac	0.701	33	Cidade líder	0.817	65	Mandacui	0.885
2	Parelheiros	0.747	34	Raposo tavares	0.819	66	Água rasa	0.886
3	Laieado	0.748	35	Vila maria	0.824	67	Carrão	0.886
4	Jardim Ângela	0.750	36	Cancaíba	0.825	68	Tucuruvi	0.892
5	Iuatemi	0.751	37	Tremembé	0.826	69	Vila sônia	0.895
6	Jardim helena	0.751	38	Aricanduva	0.830	70	Socorro	0.896
7	Graiaú	0.754	39	Arthur alvim	0.833	71	Belém	0.897
8	Itaim paulista	0.762	40	Ponte rasa	0.834	72	República	0.901
9	Vila Curucá	0.765	41	Vila medeiros	0.836	73	Cambuci	0.903
10	Cidade tiradentes	0.766	42	Sacomã	0.839	74	Vila leopoldina	0.907
11	São Rafael	0.767	43	Pirituba	0.841	75	Moóca	0.909
12	Guaianazes	0.768	44	Limão	0.847	76	Barra funda	0.917
13	Brasilândia	0.769	45	São lucas	0.847	77	Cambo grande	0.921
14	Perus	0.772	46	Jaquaré	0.849	78	Santana	0.925
15	Anhanuera	0.774	47	Frequesia do ó	0.850	79	Butantã	0.928
16	Pedreira	0.777	48	Vila andrade	0.853	80	Santa cecília	0.930
17	Vila jacuí	0.779	49	São dominos	0.854	81	Campo belo	0.932
18	Capão redondo	0.782	50	Rio pequeno	0.855	82	Liberdade	0.936
19	Sabopemba	0.786	51	Jabaquara	0.858	83	Tatuapé	0.936
20	Jaraguá	0.791	52	Sé	0.858	84	Morumbi	0.938
21	Itaquera	0.795	53	Jaquará	0.863	85	Bela vista	0.940
22	Jardim são Luiz	0.796	54	Pari	0.863	86	Lapa	0.941
23	Parque do Carmo	0.799	55	Bom retiro	0.864	87	Saúde	0.942
24	Cidade Ademar	0.800	56	Vila matilde	0.864	88	Santo amaro	0.943
25	Ermelino matarazzo	0.801	57	Penha	0.865	89	Consolidação	0.950
26	Cachoeirinha	0.802	58	Vila prudente	0.867	90	Vila mariana	0.950
27	José Bonifácio	0.804	59	Brás	0.868	91	Itaim bibi	0.953
28	São Mateus	0.804	60	Vila quilherme	0.868	92	Alto de pinheiros	0.955
29	Campo limpo	0.806	61	Casa verde	0.874	93	Jardim paulista	0.957
30	São Miguel	0.808	62	Ipiranga	0.883	94	Perdizes	0.957
31	Cidade Dutra	0.815	63	Vila formosa	0.884	95	Pinheiros	0.960
32	Jacupã	0.816	64	Cursino	0.885	96	Moema	0.961

**Figura 7.** Esquema de amostragem



## 4. MÉTODOS

### 4.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

#### 4.1.1 Determinação do teor de umidade

O conteúdo de umidade foi determinado de acordo com o método descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2004), por secagem direta em estufa com ventilação forçada de ar a 105°C até peso constante.

#### 4.1.2 Determinação do teor de proteínas

O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de MicroKjeldahl, empregando-se o procedimento descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2004). Utilizaram-se fatores de correção específico para cada alimento, segundo a RDC nº 360 de 23 de Dezembro de 2003 (BRASIL, 2003). No caso dos cereais matinais N x 6,25 e café por N x 5,75. O resultado foi expresso em porcentagem de proteínas em base úmida. As análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.1.3 Determinação do teor de lipídeos

O conteúdo de lipídeos totais foi determinado por extração contínua a quente, pelo método de Soxhlet, seguindo o procedimento descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2004).

#### 4.1.4 Determinação do teor de resíduo mineral

O conteúdo de resíduo mineral foi obtido pelo método de incineração em mufla a 550°C, como descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2004). As análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.1.5 Determinação do teor de carboidratos

O conteúdo de carboidratos foi obtido por diferença, ou seja, efetuou-se a somatória dos resultados obtidos para umidade, lipídeos, proteínas e resíduo mineral, e este valor foi subtraído do valor 100, que se refere ao conteúdo integral (100%) das amostras (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2004).

#### 4.1.6 Determinação do valor de atividade de água (aw)

A determinação de atividade de água foi realizada em analisador de atividade de água marca Aqualab-Decagon Devices Inc., modelo CX-2. As análises foram realizadas em triplicata.

## 4.2 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS INTERMEDIÁRIOS FLUORESCENTES

### 4.2.1 Determinação do teor de Compostos Intermediários Fluorescentes livres (CIF livres) em cereal matinal e granola

Os Compostos Intermediários Fluorescentes livres foram avaliados segundo DELGADO-ANDRADE *et al.*, (2006a) com pequenas modificações. Pesaram-se 500 mg de amostra em tubos de centrifuga de 15 mL e

adicionaram-se 7 mL de água deionizada. O tubo foi vigorosamente agitado por 1 minuto. As amostras foram centrifugadas a 5000rpm x 10 min x 4°C. Os sobrenadantes foram coletados separadamente e a extração foi realizada mais duas vezes. Os sobrenadantes foram clarificados com 1 mL das soluções de Carrez I e II e centrifugados a 5000rpm por 5 min x 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e avolumados para 25 mL com água destilada. Cerca de 3 mL desta solução foi filtrada em unidade filtrante Milli Q com porosidade de 0,45µm. As amostras filtradas foram diluídas pelo menos 1/7 para evitar que as moléculas formem complexos que ocasionam o decaimento da fluorescência.

#### 4.2.2 Determinação do teor de Compostos Intermediários Fluorescentes livres (CIF livres) em café

A extração de CIF livres para café foi realizada segundo a metodologia descrita em 3.3.2.1

Previamente as amostras de café foram submetidas à quantificação de cafeína por espectrofotômetro segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2004). Após esta análise, verificou-se através de um padrão externo a intensidade fluorescente correspondente a quantidade de cafeína encontrada em cada para cada amostra e este valor foi subtraído do valor encontrado de CIF livre para as amostras de café.

#### 4.2.3 Determinação do teor de Compostos Intermediários Fluorescentes totais (CIF totais) em cereal matinal e granola

Os Compostos Intermediários Fluorescentes totais (livres + ligados as proteínas) foram avaliados segundo DELGADO-ANDRADE *et al.*, (2006a) após hidrolise enzimática utilizando Pronase E. Pesaram-se 100 mg de amostra em tubos de centrífuga de 15 mL e adicionaram-se 3 mL de solução

de Pronase E (0,375mg/mL ou 1500U/mL em tampão borato de sódio 1M, pH8,2). Essa mistura foi incubada por 36 horas a 40°C em banho maria com agitação. Após resfriar, a solução foi centrifugada a 4500xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado (0,45um) e adequadamente diluído (1/50) para evitar que as moléculas formem complexos que ocasionam o decaimento da fluorescência.

#### 4.2.4 Determinação do teor de Compostos Intermediários Fluorescentes totais (CIF totais) café

A determinação de Compostos Intermediários Fluorescentes totais foi realizado segundo o item 3.3.2.3. Previamente foi realizada a quantificação de cafeína segundo o item 3.3.2.2 e a Intensidade de Fluorescência da cafeína foi subtraída.

#### 4.2.5 Condições analíticas

As leituras foram realizadas segundo DELGADO-ANDRADE *et al.*, (2006a). Utilizou-se comprimento de excitação de 347 nm e de emissão de 415 nm com cubetas de quartzo e caminho óptico de 1cm. Para verificar a linearidade da resposta fluorescente para as análise de CIF livre e total no intervalo observado para cada amostra foi feita uma curva de calibração de 5 pontos com sulfato de quinino. Os resultados foram expressos como Compostos Intermediários Fluorescentes por miligrama de amostra (CIF/mg). A análise foi realizada em triplicata genuína.

Utilizou-se espectrofotômetro de fluorescência marca Perkin Elmer modelo FL-55.

### 4.3 DETERMINAÇÃO DE HIDROXIMETILFURFURAL

#### 4.3.1 Determinação de Hidroximetilfurfural em cereais matinais dos tipos flocos e granola

A extração de hidroximetilfurfural em cereais tipo flocos e granola foi realizada segundo RUFÍAN-HENARES *et al.*, (2006b). Primeiramente pesaram-se 500 mg de amostra em tubos de centrífuga de 15 mL. Adicionaram-se 5 mL de água deionizada e agitou-se vigorosamente por 1 minuto em vortex. A mistura foi clarificada com 0,250 mL de cada uma das soluções de Carrez I e II. A mistura resultante foi centrifugada a 4.500 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado em balão volumétrico de 10 mL e duas novas extrações com 2 mL de água deionizada foram realizadas. Os sobrenadantes foram combinados e o volume foi completado para 10 mL com água deionizada. Uma alíquota de 2 mL foi filtrada (0,45 µm) e analisada por CLAE.

#### 4.3.2 Determinação de Hidroximetilfurfural em Café

A extração de HMF em café foi semelhante a metodologia utilizada para os cereais com pequenas modificações com a finalidade de melhorar a clarificação e limpidez das amostras. A extração de hidroximetilfurfural em café foi realizada segundo RUFIAN-HENARES *et al.*, (2006b) com algumas modificações. Primeiramente pesaram-se 500 mg de amostra em tubos de centrífuga de 15 mL. Adicionaram-se 7 mL de água deionizada e agitou-se vigorosamente por 1 minuto. Centrifugou-se a 4.500 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado em tubo de centrífuga de 50 mL. Duas novas extrações foram realizadas com 7 mL de água deionizada e os sobrenadantes foram combinados. A mistura de sobrenadantes foi clarificada com 0,250 mL de cada uma das soluções de Carrez I e II e centrifugada 4.500 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado

em e o volume foi completado para 25 mL com água deionizada. Uma alíquota de 2 mL foi filtrada (0,45 µm) e analisada por CLAE.

#### 4.3.2.1 Condições analíticas

As leituras foram realizadas segundo DELGADO-ANDRADE *et al.*, (2006b). A separação, identificação e quantificação do HMF foram realizadas em equipamento Shimadzu Modelo LC-20AT, equipado injetor automático SIL-20AC, controlador CBM-20A, forno de coluna CTO-20A e detector de arranjo de diodos SPD-M20A .

A fase móvel utilizada foi água acidificada com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila nas concentrações de 95:5 (v/v); fluxo de 1mL/min sob condições isocrática em coluna Shim-Pack VP-ODS-2 (25cm x 0,5cm, com partícula de 5µm, marca Shimadzu) com fase estacionária de C18 ajustada a temperatura de 32°C. O volume de injeção foi 20µL. A quantificação foi realizada por padronização externa empregando-se curva de calibração de 5 pontos (RUFIAN-HENARES *et al.*, 2006b) e leitura a 280 nm. A identificação foi realizada por comparação dos espectros de absorção e pelo tempo de retenção com padrão puro.

### 4.4 DETERMINAÇÃO DE FUROSINA

#### 4.4.1 Determinação de Furosina em cereal matinal dos tipos flocos e granola

A extração da furosina foi realizada segundo DELGADO-ANDRADE *et al.*, (2005). Inicialmente pesaram-se 30mg de amostra de cereal tipo flocos ou granola em tubos pyrex e adicionaram-se 4 mL de ácido clorídrico 7,95M. Foi criada uma atmosfera inerte ao tubo de digestão ácida. Para isso, borbulhou-se gás nitrogênio na solução ácida contendo a amostra por dois minutos logo em seguida os tubos foram rapidamente fechados com tampas

rosqueadas e com septo de borracha. Os tubos foram acondicionados em bloco digestor a 110°C por 23 horas para digestão ácida. Posteriormente, agitaram-se os tubos em vortex. O conteúdo foi transferido para tubos Falcon de 15mL e centrifugados a 14000 x g por 10 minutos a 4°C. Foram coletado 500µL do sobrenadante os quais foram submetidos à extração em fase sólida (SPE), com cartucho Bond Elut C18 (Varian Inc.) pré acondicionado com 5 mL de metanol e 10 mL de água. Efetuou-se eluição com 3 mL de solução ácida de ácido clorídrico a 3M. O eluato foi seco e ressuspenso em 1mL de solução água: acetonitrila: ácido fórmico (95:5:0,2) e acondicionado em frascos apropriados.

#### 4.4.2 Determinação de Furosina em Café

Empregou-se o procedimento descrito para cereais segundo DELGADO-ANDRADE *et al.*, (2005) para a extração da furosina de café. No entanto, esta metodologia mostrou-se inadequada para este produto e, desta forma, avaliaram-se outros tipos de extração, como descrito por NUNES e COIMBRA, (2007) e por HENLE *et al.*, (2005). Realizou-se extração aquosa de café utilizando 50g para 1 litro de água a 80°C por 20 minutos. O extrato foi filtrado e totalmente seco. O extrato foi ressuspenso em 10 mL de água e posteriormente seguiu-se com a metodologia descrita por DELGADO-ANDRADE *et al.*, (2005).

#### 4.4.3 Condições analíticas

A separação, identificação e quantificação da furosina foram realizadas em equipamento Shimadzu Modelo LC-20AT, com injetor automático SIL-20AC, controlador CBM-20A, forno de coluna CTO-20A e detector de arranjo de diodos SPD-M20A .

A fase móvel foi preparada com 5mM de heptano sulfonado de sódio incluindo 20% de acetonitrila e 0,2% de ácido fórmico. A coluna utilizada foi

Shim-Pack VP-ODS-2 (25cm x 0,5cm, com partícula de 5µm, marca Shimadzu), fase estacionária de C18, com controle de temperatura de 32°C. A eluição foi isocrática e o fluxo de 1mL/min. O volume de injeção foi de 20µL. A identificação foi realizada por comparação dos espectros de absorção e pelo tempo de retenção com padrão puro. A furosina foi quantificada por padronização externo por uma curva de calibração de 5 pontos a 280 nm (DELGADO-ANDRADE *et al.*, 2005).

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DE CARBOXIMETILISINA

A determinação de CML nos alimentos estudado neste capítulo foram realizadas conforme descrito por BOEHM *et al.*, (2004). A quantidade de CML foi determinada por ensaio imunoenzimático ELISA utilizando um anticorpo específico N-carboximetil-lisina (monoclonal 4G9 – Altheon Inc. Ramsey, NY, EUA). O ensaio é específico para quantificação de CML e não mostra reatividade cruzada. As amostras foram previamente incubadas com proteinase K para liberação dos CML das cadeias de proteína. Posteriormente as amostras foram diluídas em tampão. As diluições foram de 1:11 para cereais matinais, 1:55 para as amostras de granola e de 1:110 para as amostras de café.

Na primeira etapa da análise de ELISA os antígenos BSA-AGE foram ligados a superfície da placa de microtitulação. Os complexos não ligados à placa foram lavados. A seguir pipetou-se as amostras diluídas e os padrões externos para a curva de calibração. Os anticorpos específicos de CML competem pela ligação aos antígenos. Os anticorpos não ligados foram lavados. Adicionou-se o agente revelador (ABTS) e realizou-se a quantificação por espectrofotometria a 405nm. A intensidade da cor é inversamente proporcional à concentração de AGE/CML. As amostras foram realizadas em triplicata. A sensibilidade deste ensaio de ELISA é de 5ng/mL



de amostra intra-ensaio e a precisão inter-dias é menor que 4% (BOEHM *et al.*, 2004).

#### 4.6 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS

Validaram-se as metodologias de CALE para a determinação de hidroximetilfurfural e furosina em cada matriz alimentícia estudada. Foram determinados: a exatidão, pelo método de recuperação; os limites de detecção e de quantificação; a precisão e a linearidade da resposta por curva de padrão externo.

Para avaliar a recuperação, foram adicionadas em uma amostra, antes do início da análise, quantidade correspondente a 25, 50 e 75% do teor encontrado na matriz estudada. A porcentagem da recuperação foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ recuperação} = \frac{\text{Concentração adicionada} \times 100}{\text{concentração amostra} + \text{concentração padrão}}$$

Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com o método proposto pelo INMETRO (2007). A amostra adicionada de cada padrão foi diluída até o menor teor mensurável. Essa amostra foi injetada 10 vezes e foram calculados o desvio padrão e o coeficiente de variação dos resultados. O limite de detecção foi considerado aquele 3 vezes o valor do desvio padrão e o limite de quantificação aquele 10 vezes o valor do desvio padrão. A repetibilidade está expressa como o coeficiente de variação de 10 injeções.

## 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das diferentes análises foram apresentados como média, desvio padrão e mediana. Os dados de mediana possibilitam separar a metade inferior da amostra da parte superior, ou seja, metade dos valores terão valores abaixo da mediana e metade valores acima (BERQUÓ *et al.*, 2006)

Para avaliar a normalidade da distribuição dos dados foram avaliados dois parâmetros: *Kurtosis* e *Skewness*. A *Kurtosis* é uma medida do peso das caudas de uma distribuição normal e o *Skewness* mede o grau de simetria da distribuição normal. A distribuição é considerada normal quando, dividimos os valores de *Kurtosis* e *Skewness* pelos seus respectivos desvios padrão e o resultado situar-se entre -2 e +2 (BERQUÓ *et al.*, 2006).

Utilizou-se ANOVA e teste *post hoc Tukey*, com nível de significância de 5% para avaliar se há diferença no teor de nutrientes das marcas de cereais matinais e café analisadas, quando a distribuição dos dados foi normal.

Os resultados que não apresentaram distribuição normal foram transformados em logaritmo neperiano (ln) e o teste reaplicado. Para os dados que não apresentaram distribuição normal testes não paramétricos foram utilizados, *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney*.

Foi feita também Análise de Componentes Principais (ACP) onde os alimentos estudados foram agrupados segundo seus teores de indicadores da RM analisados.

Foram utilizados os programas Microsoft Excel para a tabulação dos dados e o programa SPSS 16.0 (Chicago/EUA) para a execução dos testes estatísticos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Nas tabelas 2,3 e 4 estão apresentados os resultados da composição centesimal de floco de cereais, granola e café respectivamente. Os resultados estão expressos em base úmida.

**Tabela 2.** Composição química de cereal tipo flocos (%).

Produto	Marca*	Umidade	Proteína	Lipídeos	Cinzas	Carboidratos
M	F1	5,03 ± 0,38 <sup>c</sup>	6,48 ± 0,15 <sup>a,b</sup>	0,70 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,91 ± 0,18 <sup>a</sup>	85,88 ± 0,19 <sup>b</sup>
	F2	3,10 ± 0,37 <sup>a</sup>	6,87 ± 0,63 <sup>b</sup>	0,44 ± 0,03 <sup>b</sup>	2,91 ± 0,01 <sup>c</sup>	86,68 ± 0,26 <sup>a</sup>
	F3	4,44 ± 0,45 <sup>b</sup>	6,10 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,95 ± 0,16 <sup>b</sup>	87,38 ± 0,19 <sup>a</sup>
A	F1	3,17 ± 0,01 <sup>c</sup>	4,40 ± 0,36 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,67 ± 0,06 <sup>c</sup>	90,53 ± 0,1 <sup>b</sup>
	F2	2,84 ± 0,21 <sup>b</sup>	4,45 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,74 ± 0,04 <sup>c</sup>	2,34 ± 0,01 <sup>a</sup>	89,63 ± 0,08 <sup>a</sup>
	F3	2,66 ± 0,10 <sup>a</sup>	4,58 ± 1,10 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,00 <sup>b</sup>	1,71 ± 0,67 <sup>b</sup>	90,64 ± 0,46 <sup>b</sup>
Ch	F1	4,32 ± 0,32 <sup>c</sup>	4,60 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,40 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,93 ± 0,06 <sup>b</sup>	88,75 ± 0,12 <sup>b</sup>
	F2	2,58 ± 0,25 <sup>a</sup>	4,37 ± 0,09 <sup>b</sup>	1,47 ± 0,05 <sup>c</sup>	2,60 ± 0,02 <sup>c</sup>	88,98 ± 0,10 <sup>a</sup>
	F3	3,53 ± 0,28 <sup>b</sup>	3,74 ± 0,29 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,16 <sup>b</sup>	1,32 ± 0,00 <sup>a</sup>	90,46 ± 0,18 <sup>a</sup>
<b>Média**</b>		3,54 ± 0,88	5,07 ± 1,11	0,62 ± 0,41	2,03 ± 0,13	88,77 ± 1,38
<b>Intervalo</b>		2,36 – 5,33	3,12 – 6,78	0,12 – 1,53	1,26 – 3,02	82,93–91,56
<b>Mediana</b>		3,25	4,59	0,44	2,02	86,24

Letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05)

\*Média ± desvio padrão, n=3 \*\* Média ± desvio padrão, n=27.

M=milho, A=Açúcar, Ch= Chocolate

Os produtos analisados apresentam teor de carboidratos superior a 88% enquanto os teores protéicos são relativamente reduzidos, variando de 3,7% a 6,8%. As menores concentrações protéicas foram encontradas nos produtos A e Ch que correspondem a flocos de milho com maior concentração de açúcar em detrimento do teor de proteína (de 3,7% a 4,6%

de proteína, respectivamente). Os teores de umidade variaram, da ordem de 2,6% a 5,0% e os de lipídeos variaram de 0,3% a 1,4%.

Os teores médios de macronutrientes encontrados por LANFER MÁRQUEZ *et al.*, (1997) são semelhantes aos encontrados neste trabalho. Os valores de umidade, proteína, lipídeos, cinzas e carboidratos em base úmida são respectivamente: 4,9%, 6,0%, 0,6%, 2,1% e 83%.

Em relação às tabelas de composição de alimentos, os teores observados para composição centesimal de cereais matinais tipo flocos com açúcar na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) foram de 4,3g de umidade, 4,7g de proteínas, 0,7g de lipídeos, 88,8g de carboidratos e 1,5g de cinzas, sendo estes semelhantes aos encontrados neste estudo (NEPA, 2006).

Além disso, os teores de macronutrientes foram comparados ao rótulo do fabricante. Foram observadas grandes diferenças entre os teores de macronutrientes encontrados no estudo e os declarados no rótulo, porém segundo a legislação RDC nº360 de 23/12/2003, os rótulos nutricionais estão em desconformidade se a variação encontrada for maior que 20%. Tendo isso em vista a marca F1 apresentou desconformidade para o flocos do tipo Ch em relação ao conteúdo de lipídeo (0,4% e 2,4% para o estudo e o rótulo respectivamente). Para a marca F2 o flocos do tipo M apresentou desconformidade para o teor de proteínas (6,8% e 4,33% para o estudo e o rótulo respectivamente). A marca F3 apresentou desconformidade para o flocos do tipo Ch em relação ao conteúdo de proteína (0,9% e 3,4% para o estudo e o rótulo respectivamente).

**Tabela 3.** Composição química de cereal tipo granola (%)

Marca*	Produto	Umidade	Proteína	Lipídeos	Cinzas	Carboidratos
G1	TG1	5,01±0,46 <sup>a</sup>	6,90±1,06 <sup>a</sup>	4,18±0,65 <sup>b</sup>	1,49±0,25 <sup>a</sup>	82,42±0,60 <sup>a</sup>
G2	TG2	5,44±0,94 <sup>a,b</sup>	12,55±0,43 <sup>c</sup>	9,68±0,31 <sup>c</sup>	1,98±0,05 <sup>b</sup>	70,35±0,43 <sup>b</sup>
G3	TG3	6,41±1,06 <sup>b</sup>	9,13±0,50 <sup>b</sup>	3,31±0,11 <sup>a</sup>	1,68±0,37 <sup>a,b</sup>	79,47±0,51 <sup>a</sup>
<b>Média**</b>		5,62±0,72	9,53±2,82	5,72±3,45	1,71±0,22	77,41±6,32
<b>Intervalo</b>		4,62 – 7,23	6,23 – 12,95	3,12–10,12	1,26 – 2,05	67,30 –85.28
<b>Mediana</b>		5,48	9,11	4,09	1,82	71,64

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

\*Médias ± desvio padrão, n=3.

\*\*Médias ± desvio padrão, n=9

Assim como os flocos de milho, a granola apresenta teores de carboidratos superiores a 75%, porém as concentrações de proteína e lipídeos são maiores, quando comparados com aquele produto. Os teores protéicos variam de 6,9% a 12,5% e os teores de lipídeos variaram de 3,3% a 9,7%. Essas diferenças encontradas são decorrentes dos diferentes ingredientes adicionados no processamento. Durante a produção deste cereal é adicionado oleaginosas e frutas secas.

Em uma comparação feita com este produto e a TACO observou-se valores semelhantes de umidade e proteína (5,62% e 9,53% para este estudo e 4,4% e 8,9% para a TACO respectivamente). Os outros nutrientes diferiram dos encontrados foram de 5,7%, 1,7% e 77,4% para lipídeos, cinzas e carboidratos respectivamente para este estudo e 2,1%, 3% e 81,6% para lipídeos, cinzas e carboidratos respectivamente para a TACO (NEPA, 2006)

Da mesma forma que os flocos, os dados de macronutrientes encontrados para granola foram comparados ao rótulo dos produtos. Houve grandes variações principalmente em relação ao conteúdo de carboidrato, porém essa variação não chegou a 20%. A marca G3 obteve variação maior que a permitida para as proteínas (9% estudo e 6,7% rotulo). Em relação aos lipídeos, todas as marcas estão em desconformidade com a legislação apresentando variação maior que 20%. Os teores de lipídeos foram de 4g,

9g e 3g para o estudo e de 2g, 7g e 12g para os rótulos analisados para as marcas TG1, TG2 e TG3 respectivamente.

**Tabela 4.** Composição química do café (%).

Marca*	Produto	Umidade	Proteína	Lipídeos	Cinzas	Carboidratos
C1	TC1	3,15±0,34 <sup>a</sup>	13,48±0,27 <sup>a</sup>	14,95±0,24 <sup>b</sup>	4,61±0,01 <sup>a</sup>	63,81±0,21 <sup>b</sup>
C2	TC2	4,62±0,11 <sup>d</sup>	13,79±0,52 <sup>a</sup>	14,31±0,21 <sup>a,b</sup>	4,67±0,03 <sup>a,b</sup>	62,61±0,21 <sup>a</sup>
C3	TC3	4,18±0,06 <sup>c</sup>	13,96±0,07 <sup>a</sup>	14,87±1,27 <sup>b</sup>	4,61±0,03 <sup>a</sup>	62,38±0,35 <sup>a</sup>
C4	TC4	3,90±0,05 <sup>b</sup>	13,65±0,44 <sup>a</sup>	14,38±0,23 <sup>b</sup>	4,62±0,04 <sup>a</sup>	63,45±0,19 <sup>b</sup>
C5	TC5	4,64±0,2 <sup>d</sup>	13,89±0,14 <sup>a</sup>	13,21±0,86 <sup>a</sup>	4,74±0,10 <sup>b</sup>	63,52±0,32 <sup>b</sup>
<b>Média**</b>		4,10±0,61	13,75±0,19	14,34±0,69	4,65±0,04	63,15±0,59
<b>Intervalo</b>		2,86-4,92	12,83-14,44	13,08-15,80	4,56-4,84	60,34-69,50
<b>Mediana</b>		4,17	13,76	14,46	4,59	63,87

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

\*Médias  $\pm$  desvio padrão, n=3.

\*\*Médias  $\pm$  desvio padrão, n=15

Na tabela 4 estão apresentados os resultados da análise de composição química das amostras de café. Os teores médios encontrados de umidade (4%), proteína (13%), lipídeo (14%) cinzas (4%) e carboidratos (63%) são similares aos encontrados pela Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO, 2006 (3%, 15%, 12%, 4% e 66% respectivamente) (NEPA, 2006). Não houve comparação entre os dados do rótulo pois segundo a RDC nº360 de 23/12/2003 alimentos como pó de café não são obrigados a fornecerem tabela nutricional.

Na tabela 5 podemos observar os valores de atividade de água encontrados para os alimentos estudados.

Os valores de flocos variam de 0,295 a 0,395, os de granola entre 0,304 a 0,450 e os de café 0,372 a 0,446 (Tabela 5). A velocidade da reação de Maillard é favorecida nos alimentos com valores de  $A_w$  entre 0,4 a 0,7 (FINOT, 2005). Desta forma, os valores encontrados de atividade de água para os alimentos estudados favorecem o desenvolvimento da RM.

**Tabela 5.** Atividade de água dos alimentos estudados.

Alimento	Marca*	Produto	Atividade de água (Aw)
Flocos	M	F1	0,377 ± 0,02 <sup>b</sup>
		F2	0,295 ± 0,02 <sup>a</sup>
		F3	0,329 ± 0,05 <sup>a,b</sup>
	A	F1	0,395 ± 0,06 <sup>b</sup>
		F2	0,352 ± 0,05 <sup>a,b</sup>
		F3	0,311 ± 0,01 <sup>a</sup>
	Ch	F1	0,389 ± 0,02 <sup>b</sup>
		F2	0,295 ± 0,00 <sup>a</sup>
		F3	0,375 ± 0,05 <sup>b</sup>
Granola	G1	TG1	0,450 ± 0,01 <sup>c</sup>
	G2	TG2	0,304 ± 0,00 <sup>a</sup>
	G3	TG3	0,413 ± 0,05 <sup>b</sup>
Café	C1	TC1	0,372 ± 0,02 <sup>a</sup>
	C2	TC2	0,446 ± 0,03 <sup>c</sup>
	C3	TC3	0,404 ± 0,00 <sup>a,b</sup>
	C4	TC4	0,394 ± 0,00 <sup>a</sup>
	C5	TC5	0,443 ± 0,02 <sup>b,c</sup>

Letras diferentes para cada tipo de alimento indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

\*Média ± desvio padrão,  $n=3$ .

M=milho, A=Açúcar, Ch= Chocolate

## 5.2 COMPOSTOS INTERMEDIÁRIOS FLUORESCENTES

O teor de Compostos Intermediários Fluorescentes (CIF) livre para cereais do tipo flocos (Tabela 6) variou de 12,7 a 46,46 CIF/mg de amostra. Esses teores são inferiores aos reportados na literatura para cereais a base de milho relatados por DELGADO-ANDRADE *et al.*, (2006a e 2008) de 30 a 679CIF/mg e de 40 a 137 CIF/mg, respectivamente. Para os flocos do tipo M

e A as marcas F1 e F2 apresentaram teores semelhantes de CIF livre, havendo diferença estatisticamente significativa para o CIF livre em cereal tipo Ch ( $p < 0,05$ )

Em média, os teores de CIF para as amostras de flocos com chocolate foram significativamente maiores quando comparada às de milho e às de açúcar.

**Tabela 6.** Compostos Intermediários Fluorescentes livres (CIF livre) da reação de Maillard em cereal matinal tipo flocos.

Marca*	CIF livre / mg		
	M	A	Ch
F1	23,29 ± 3,7 <sup>b</sup>	15,32 ± 1,0 <sup>a,b</sup>	21,61 ± 2,9 <sup>a</sup>
F2	18,83 ± 4,4 <sup>b</sup>	18,04 ± 2,5 <sup>b</sup>	46,46 ± 1,4 <sup>b</sup>
F3	12,76 ± 2,1 <sup>a</sup>	14,10 ± 2,5 <sup>a</sup>	24,19 ± 0,7 <sup>a</sup>
<b>Valor médio**</b>	18,29 ± 5,5	15,82 ± 2,65	30,75 ± 11,6
<b>intervalo</b>	10,48–27,85	10,39–22,30	17,45–49,11
<b>mediana</b>	16,62	19,10	21,80

Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

\*Média ± desvio padrão, n=3.

\*\*Média ± desvio padrão, n=9.

M=milho, A=Açúcar, Ch= Chocolate

A variação encontrada para os cereais tipo granola foi de 44,49 a 52,94 CIF livre/mg de amostra. Além disso, o teor médio de CIF livre foi de 49,94 CIF/mg de amostra, o qual é mais elevado comparativamente ao valor médio para cereais tipo flocos (Tabela 7), o que se deve, provavelmente, à maior variedade de ingredientes na formulação (açúcar mascavo, mel, frutas secas e oleaginosas) que facilitariam a ocorrência da RM. As marcas de granola foram semelhantes entre si ( $p > 0,01$ )



**Tabela 7.** Compostos Intermediários Fluorescentes livres (CIF livre) da reação de Maillard em cereal matinal tipo granola.

<b>Marca*</b>	<b>CIF livre / mg</b>
G1	52,94±7,9 <sup>a</sup>
G2	52,09±3,0 <sup>a</sup>
G3	44,49±10,1 <sup>a</sup>
<b>Valor médio**</b>	49,84± 8,18
<b>Intervalo</b>	33,17–61,17
<b>Mediana</b>	51,75

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ )

\*Média ± desvio padrão n=3.

\*\*Média ± desvio padrão, n=9

O teor médio de CIF para café foi de 232,89 CIF livre/mg (tabela 8), que é mais elevado relativamente aos outros alimentos estudados. O alto teor de CIF livre em café pode ser explicado pelo processamento térmico mais severo que este produto sofre. Durante a torrefação de café, as temperaturas variam de 200°C-250°C favorecendo a RM e formação de CIF. Não houve diferença significativa entre as marcas de café estudadas em relação ao teor de CIF livre ( $p>0,01$ ) (BUETLER, 2008).

**Tabela 8.** Compostos Intermediários Fluorescentes livres (CIF livre) da reação de Maillard em Café

<b>Marca*</b>	<b>CIF livre/mg</b>
C1	242,43±5,47 <sup>a</sup>
C2	245,32±15,0 <sup>a</sup>
C3	237,21±12,6 <sup>a</sup>
C4	228,01±12,8 <sup>a</sup>
C5	211,47±26,4 <sup>a</sup>
<b>Valor médio**</b>	232,89±19,3
<b>Intervalo</b>	159,96– 255,28
<b>Mediana</b>	232,42

Letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0,01)

\*Média ± desvio padrão, n=3.

\*\* Média ± desvio padrão, n=15

A variação encontrada para os teores de CIF Total nas amostras de flocos variaram de 109,98 a 174,74 CIF total/mg de amostra como pode ser observado na tabela 9. Como observado já para CIF livre, os teores encontrados em outros estudos foram maiores. DELGADO-ANDRADE *et al.*, (2008) observou variações de 381 a 1102 CIF total/mg e os encontrados por DELGADO-ANDRADE *et al.*, (2006a) variaram de 234 a 2408 CIF total/mg. Para os flocos tipo M e A as marcas F1 e F2 foram semelhantes (p>0,05) havendo diferença estatisticamente significativa apenas no tipo Ch (p<0,05). A marca F3 foi estatisticamente diferente para todas as marcas e tipos de flocos estudados (p<0,05).

**Tabela 9.** Compostos Intermediários Fluorescentes totais (CIF total) da reação de Maillard em cereal matinal tipo flocos.

Marca*	CIF total / mg		
	M	A	Ch
<b>F1</b>	174,74±3,4 <sup>b</sup>	152,69±13,7 <sup>b</sup>	151,91±3,3 <sup>b</sup>
<b>F2</b>	174,56±16,2 <sup>b</sup>	162,53±8,1 <sup>b</sup>	162,49±8,7 <sup>c</sup>
<b>F3</b>	142,73±4,8 <sup>a</sup>	132,51±4,2 <sup>a</sup>	109,98±2,5 <sup>a</sup>
<b>Valor médio**</b>	164,01 ± 18,1	149,25 ± 15,6	141,46 ± 23,9
<b>intervalo</b>	137,30–191,25	127,29–170,58	106,89–173,98
<b>Mediana</b>	147,63	154,08	159,36

Letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05)

\*Média ± desvio padrão, n=3.

\*\*Média ± desvio padrão, n=9 .

M=milho, A=Açúcar, Ch= Chocolate

Os teores de CIF total encontrados para cereais do tipo granola variaram de 314,72 a 342,96 CIF total/mg de amostra, sendo que seu teor médio foi de 331,21CIF total/mg de amostra (tabela 10). Assim como na fluorescência livre, os valores de fluorescência total para as amostras de granola foram maiores quando comparados ao cereal tipo flocos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as marcas estudadas (p>0,05)

Não existem trabalhos na literatura internacional que estudem compostos fluorescentes proveniente da RM com mesmo tipo de flocos de granola impossibilitando a comparação de valores encontrados.

**Tabela 10.** Compostos Intermediários Fluorescentes totais (CIF total) da reação de Maillard em cereal matinal tipo granola

<b>Marca*</b>	<b>CIF total / mg</b>
G1	314,72 ± 7,9 <sup>a</sup>
G2	343,96 ± 25,2 <sup>a</sup>
G3	334,96 ± 51,0 <sup>a</sup>
<b>Valor médio**</b>	331,21 ± 33,63
<b>Intervalo</b>	275,07–389,03
<b>Mediana</b>	324,01

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

\*Média ± desvio padrão n=3.

\*\*Média ± desvio padrão, n=9

Já para o café, observou-se uma variação entre marcas de 744,21 e 799,90 CIF total/mg de amostra, com valor médio de 765,11CIF/mg de amostra (tabela 11). As marcas C1, C2 e C3 foram estatisticamente semelhantes ( $p > 0,05$ ) e as marcas C2 e C4 foram estatisticamente diferentes entre elas ( $p < 0,05$ )

Assim como a granola, não existem trabalhos na literatura internacional que possam ser comparados com estes valores encontrados para café.

**Tabela 11.** Compostos Intermediários Fluorescentes totais (CIF total) da reação de Maillard em Café

<b>Marca*</b>	<b>CIF total /mg</b>
C1	763,64±18,7 <sup>a,b</sup>
C2	799,90±8,38 <sup>b</sup>
C3	756,71±13,2 <sup>a,b</sup>
C4	744,21±11,0 <sup>a</sup>
C5	761,08±59,0 <sup>a,b</sup>
<b>Valor médio**</b>	765,11±32,9
<b>Intervalo</b>	698,43–822,69
<b>Mediana</b>	761,67

Letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05)

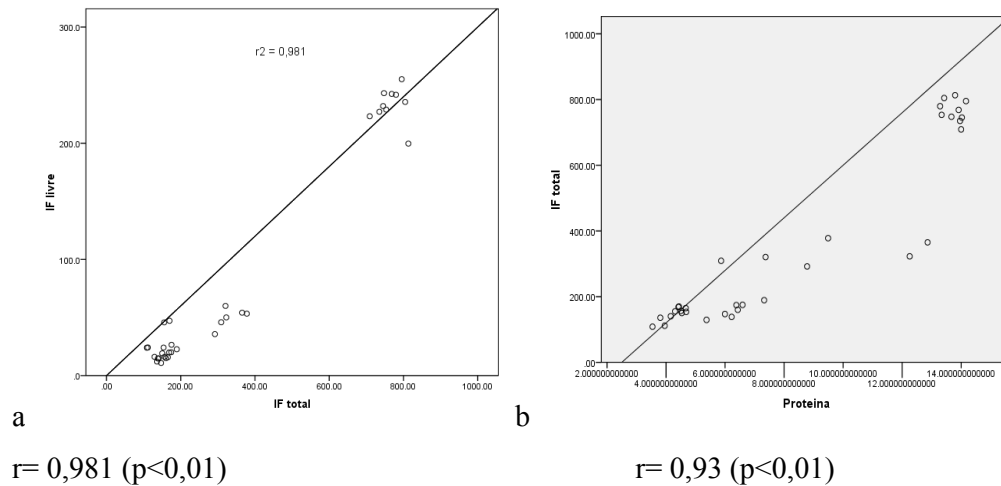
\*Média ± desvio padrão, n=3.

\*\* Média ± desvio padrão, n=15

Verificou-se uma correlação positiva entre o conteúdo de CIF livre e CIF total de  $r=0,981$  ( $p<0,01$ ) (figura 8). Desta forma os resultados sugerem que a análise de CIF livre é suficientemente representativa para avaliar a presença de compostos fluorescentes da reação de Maillard. Entretanto a determinação de compostos fluorescentes totais fornece informações adicionais especialmente em para produtos com alto teor de proteínas (MATIACEVICH *et al.*, 2005 e BOSCH *et al.*, 2007a).

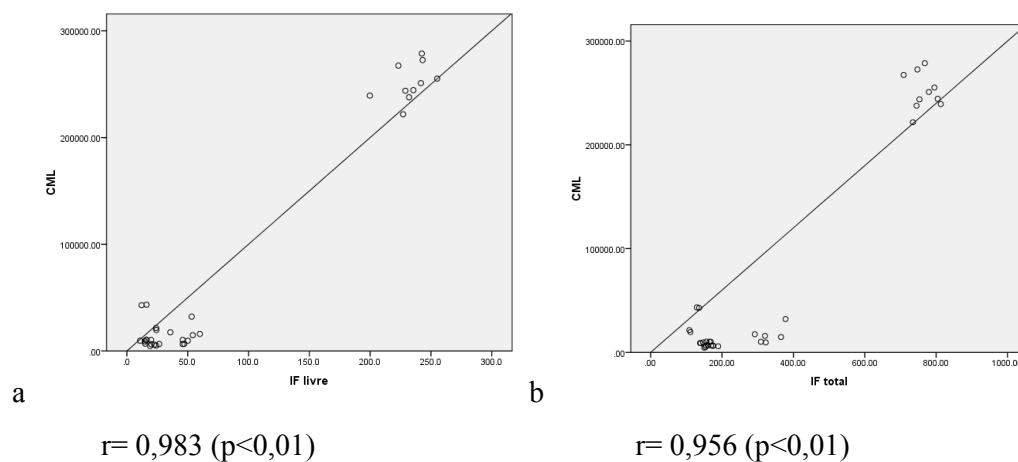
Assim como observado em outros estudos houve uma correlação positiva entre o teor de proteína e o teor de substâncias fluorescentes totais ( $r= 0,93$   $p<0,01$ ). Os outros estudos observaram uma correlação de  $r=0,76$  (DELGADO-ANDRADE *et al.*, 2008)

**Figura 8.** Correlação entre CIF livre e CIF total (a) e Proteína e IF total (b)



Foi observada também uma forte correlação positiva ( $r = 0,9$   $p < 0,01$ ) entre o teor de CIF livre e total com a CML (Figura 9). DELGADO-ANDRADE *et al.*, (2006) observou correlação entre CIF livre e total com HMF ( $r = 0,88$  e  $r = 0,86$  com  $p < 0,01$  respectivamente) e furfural ( $r = 0,69$  e  $r = 0,68$  com  $p < 0,05$  respectivamente) o que não foi observado neste estudo.

**Figura 9.** Correlação entre CIF livre (a) e total (b) e CML



A intensidade de fluorescência em produtos termicamente processados é empregada como marcador da severidade do tratamento térmico ao qual o alimento é submetido e as possíveis alterações nutricionais relacionadas a eles (RUFIAN-HENARES *et al.*, 2002; FERRER *et al.*, 2005; MORALES *et al.*, 1996). Segundo RUFÍÁN-HENARES *et al.*, (2002), valores elevados de CIF em preparações enterais, após esterilização, correlacionam-se positivamente com o teor de produtos de reação de Maillard neste tipo de produto. MORALES, *et al.*, (1997) também observaram esta correlação, empregando sistema lactose/caseína. .

Os dados indicam que o cereal matinal tipo flocos de milho contribui para o maior aporte dos PRMs, quando comparado a granola. Porém dentre os alimentos estudados o café apresenta maior quantidade de PRMs. O monitoramento dos PRMs por fluorescência pode ser uma ferramenta no controle de qualidade de produtos termicamente processados uma vez que existe uma correlação positiva entre a intensidade de fluorescência e os outros indicadores da RM. Apesar de não ser um método específico, é um procedimento rápido para avaliar a extensão da RM em alimentos. A limitação do método, porém, relaciona-se a alimentos que apresentem compostos fluorescentes nos complementos de onda utilizados no método, o que necessariamente irá superestimar os dados (MATIACEVICH e BUERA, 2006 e LECLERE e BIRLOUEZ-ARAGON, 2001).

Entre todos os alimentos estudados o café apresenta maior teor de CIF livre e total. Visto que a fluorescência correspondente a cafeína foi subtraída, o resultado obtido corresponde aos produtos fluorescentes da reação de Maillard. Já entre os cereais matinais estudados, o tipo granola apresenta maior concentração de PRMs.

O monitoramento dos PRMs por fluorescência pode ser um procedimento rápido para avaliação da severidade do tratamento térmico de alimentos. No entanto, este não é um procedimento específico e outras substâncias (como a cafeína, teofilina e teobromina) podem interferir no resultado. Desta forma, é adequado considerar que este método esteja

associado a outros marcadores de produtos da reação de Maillard (MATIACEVICH e BUERA, 2006 e MATIACEVICH *et al.*, 2005)

### 5.3 HIDROXIMETILFURFURAL

Nas tabelas 12 e 13 estão os resultados do limite de detecção e quantificação, repetibilidade e recuperação do método.

RUFÍAN-HENARES *et al.*, (2006b) desenvolveram uma metodologia para determinação de HMF em cereais matinais e encontraram limites de detecção de 0,01mg/kg e de quantificação 0,05mg/kg um pouco menores dos encontrados neste estudo. A precisão foi de 3,67% e a recuperação variou de 97% a 100% maiores do que encontrados neste estudo.

Já GARCIA-VILANOVA *et al.*, (1993) encontraram valores limite de detecção de 0,03ug/g e os teores encontrados em suas as amostras excederam em 100 vezes este limite. A recuperação encontrada foi de 97%, a precisão variou de 1,19% a 3,27%.

MURKOVIC e PICHLER, (2006) validaram a metodologia para quantificar HMF em café. O limite de quantificação foi de 32ng/g, o de quantificação foi de 120ng/g, menores do que encontrados neste estudo. A recuperação encontrada neste estudo foi de 89% e a precisão de 1,4% valores melhores quando comparados aos estudos de MURKOVIC e PICHLER (2006). Já AMEUR *et al.*, (2006) observaram uma média de recuperação de apenas 84,5%.

**Tabela 12** Limites de detecção e quantificação do método e repetibilidade da análise de HMF em cereal matinal tipo flocos, granola e café.

	Flocos	Granola	Café
<b>Limites de detecção (mg/kg)</b>	0,29	0,20	0,08
<b>Limites de quantificação (mg/kg)</b>	0,98	0,67	0,27
<b>Repetibilidade (CV)*</b>	0,55	0,11	0,94

\*CV= coeficiente de variação; (n=10)



**Tabela 13.** Nível de recuperação do HMF em flocos, granola e café.

Níveis de adição	Quantidade adicionada (ug/0,5g)			% de recuperação		
	Flocos	Granola	Café	Flocos	Granola	Café
25%	10	7,5	10	84	90	100
50%	20	15	20	89	93	109
75%	30	22,5	30	98	99	110

Os teores de HMF encontrados em flocos variaram entre 32 a 105mg/kg, porém em 88% das amostras o teor de HMF está abaixo de 68mg/kg. Essa grande variação também foi encontrada em outros estudos. RUFÍÁN-HENARES *et al.*, (2006b) encontraram teores variando entre 12 e 61mg/kg. GARCÍA-VILLANOVA *et al.*, (1993) observaram variação de 3 a 193mg/kg de HMF e cerca de 70% de suas amostras estão abaixo de 25mg/kg (tabela 14). RUFÍÁN-HENARES *et al.*, (2009b) observaram que dentre as farinhas como trigo, aveia e milho, esta em períodos de aquecimento acima de 10 minutos apresentaram os maiores valores de HMF quando comparados a de trigo e aveia. GÖKMEN e SÜENYUVA, (2006) observaram que em fórmulas infantis a base de cereal os valores de HMF variaram de 0,1 a 57mg/kg de amostra. Esses teores são bem inferiores aos encontrados para os flocos de milho estudados neste trabalho, o que poderia ser explicado pelo processamento térmico mais severo destes produtos, quando comparadas às formulas infantis.

Houve diferença significativa entre todas as marcas para os flocos do tipo Ch ( $p < 0,05$ ). Para os flocos do tipo M e A as marcas F2 e F3 foram semelhantes ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 14.** Conteúdo de HMF em cereais tipo flocos (mg/kg)

Marca*	HMF (mg/Kg)		
	M	A	Ch
F1	105,33 ± 3,91 <sup>b</sup>	59,08 ± 2,48 <sup>b</sup>	68,16 ± 1,45 <sup>c</sup>
F2	41,48 ± 8,55 <sup>a</sup>	32,77 ± 6,10 <sup>a</sup>	37,67 ± 0,63 <sup>b</sup>
F3	40,39 ± 3,99 <sup>a</sup>	34,33 ± 0,66 <sup>a</sup>	32,58 ± 1,15 <sup>a</sup>
<b>Média**</b>	62,4±37,18	42,06±14,76	46,13±19,24
<b>Intervalo</b>	41,96 – 113,72	27,91 – 65,83	29,98 – 71,25
<b>Mediana</b>	55,45	40,62	37,60

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

\*Média ± desvio padrão, n=9.

\*\* Média ± desvio padrão, n=81 .

M=milho, A=Açúcar, Ch= Chocolate

Os conteúdos de HMF das amostras de granola variaram entre 20 e 149mg/kg. A marca G3 apresenta em sua composição maior porcentagem de frutas secas o que influi diretamente na quantificação de HMF e explica o maior teor deste indicador neste produto. As três marcas estudadas são diferentes entre si ( $p < 0,05$ ) (tabela 15). Em um estudo com biscoito do tipo “cookies” a base de aveia e outros cereais observou-se grande variação do teor de HMF entre as marcas estudadas (0,5 a 74mg/kg de produto) assim como as variações encontradas para este estudo (AIT AMEUR *et al.*, 2006).

**Tabela 15.** Conteúdo de HMF em granola (mg/kg)

Marca*	HMF (mg/Kg)
G1	20,52 ± 0,32 <sup>a</sup>
G2	71,61 ± 0,83 <sup>b</sup>
G3	149,24 ± 4,59 <sup>c</sup>
<b>Média**</b>	80,45 ± 64,81
<b>Intervalo</b>	18,04 – 184,73
<b>Mediana</b>	73,88

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

\*Média ± desvio padrão, n=3 .

\*\* Média ± desvio padrão, n=27

Os conteúdos de HMF das amostras de café apresentaram menor variação relativamente aos cereais (33 e 74 mg/kg). Estes valores são relativamente menores aos encontrados por MURKOVIC e PICHLER, (2006) que em seu estudo encontrou teores de 300-1900mg/kg. Observa-se diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre as marcas analisadas (tabela 16).

**Tabela 16.** Conteúdo de HMF em café (mg/kg)

<b>Marca*</b>	<b>HMF (mg/kg)</b>
C1	47,75 ± 0,69 <sup>c</sup>
C2	44,09 ± 0,54 <sup>b</sup>
C3	53,16 ± 0,34 <sup>d</sup>
C4	74,32 ± 0,29 <sup>e</sup>
C5	33,44 ± 0,58 <sup>a</sup>
<b>Média**</b>	<b>50,55 ± 15,11</b>
<b>Intervalo</b>	<b>29,16 – 76,71</b>
<b>Mediana</b>	<b>47,84</b>

Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,01$ )

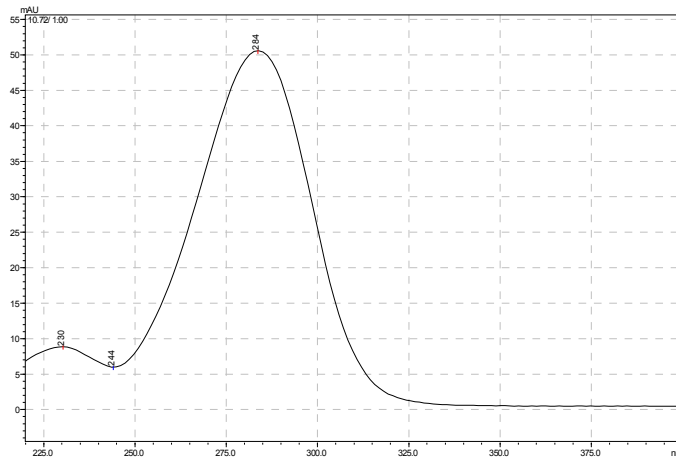
\*Média ± desvio padrão, n=3

\*\* Média ± desvio padrão, n=45 \*

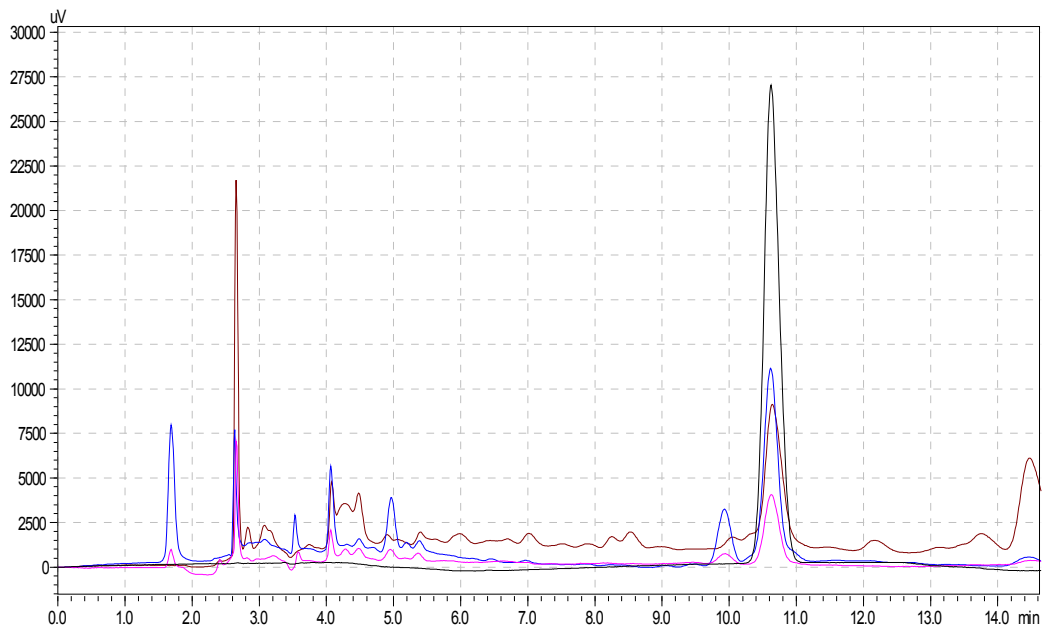
As amostras de granola apresentaram maior conteúdo de HMF pois em sua formulação há ingrediente que além de favorecerem a RM (frutas desidratadas) e também favorecem a caramelização, como o mel e açúcar mascavo. As amostras de cereais do tipo flocos apresentaram teores similares aos encontrados em outros estudos. Houve diferença significativa entre as marcas de um mesmo tipo de cereal principalmente para cereal do tipo Ch e granola. A metodologia para análise de HMF é simples relativamente à etapa preparativa, rápida e não produz muito resíduo. No entanto, é necessário o equipamento para CLAE e o acesso a reagentes de grau cromatográfico (MURKOVIC e PICHLER, 2006; RUFÍAN-HENARES *et al.*, 2006b; TEIXIDÓ *et al.*, 2008)

A figura 10 mostra o espectro de absorção do padrão de HMF. A figura 11 nos mostra o perfil cromatográfico das amostras de flocos, granola e café.

**Figura 10.** Espectro de absorção do padrão de HMF



**Figura 11.** Perfil cromatográfico representativo das amostras de flocos (azul), granola (rosa) e café (marrom) comparadas ao padrão de HMF (preto).



## 5.5 FUROSINA

Nas tabelas 17 e 18 estão os resultados do limite de detecção e quantificação, recuperação e repetibilidade do método.

DELGADO-ANDRADE *et al.*, (2005) obtiveram limite de detecção de 0,09mg/kg e de quantificação de 0,299mg/kg, em estudos com cereais matinais, valores menores dos observados neste estudo. A recuperação de FUR obtida por RADA-MENDOZA *et al.*, (2002) em geléias de frutas foi de 91%.

**Tabela 17** Limites de detecção e quantificação do método e recuperação de furosina em cereais tipo flocos, granola e café

	Flocos	Granola	Café
<b>Limites de detecção (mg/100g de proteína)</b>	1,53	0,50	1,15
<b>Limites de quantificação (mg/100g de proteína)</b>	5,12	1,69	3,86
<b>Repetibilidade (CV)*</b>	1,00	0,47	3,56

\*CV= coeficiente de variação; (n=10)

**Tabela 18.** Recuperação do método de FUR em flocos, granola e café

Níveis de adição	Quantidade adicionada (ug/30mg amostra)			% de recuperação		
	Flocos	Granola	Café	Flocos	Granola	Café
50%	0,54	3,2	1,2	84	90	94
75%	0,80	4,8	1,8	95	93	96
100%	1,00	6.4	2,4	108	100	100

O teor de furosina variou de 61 a 259 mg/100g de proteína nos produtos estudados. Esses teores são menores que os encontrados por

DELGADO-ANDRADE *et al.*, (2005) (54 a 811mg/100g de proteína). Essa diferença de teores pode estar relacionada a diferença de formulação de cereais e pelo conteúdo de fibras e proteínas. RADA-MENDOZA *et al.*, (2002), obtiveram teores entre 15 a 335mg de furosina /100g proteína para geléias de frutas. RUFIAN-HENARES *et al.*, (2009b) encontraram teores de furosina entre 14 a 103mg/100g de proteína em cereais matinais, valores que se aproximam aos deste estudo (tabela 19). DELGADO-ANDRADE *et al.*, (2007b) observaram teores de FUR em cereais matinais comercializados na Espanha que variaram de 81 a 255mg/100g de proteína, sendo que a média das marcas foi de 150mg/100g de proteína, semelhante a média de flocos de milho.

Além disso, RAMIREZ-JIMENEZ *et al.*, (2000) observou que as cascas de pães apresentam maior quantidade de FUR quando comparado a parte central do alimento. Devido a semelhança de textura entre a casca do pão e os cereais matinais do tipo flocos podemos concluir que o teor encontrado neste estudo variou de forma semelhante (55 a 220mg/100g de proteína) ao estudo de RAMIREZ-JIMENEZ *et al.*, (2000).

A marca F1 foi semelhante a marca F2 para os flocos do tipo A e Ch. Já para os flocos do tipo M as marcas F2 e F3 foram semelhantes ( $p>0,05$ )

**Tabela 19.** Conteúdo de furosina em cereais do tipo flocos de milho (M), açucarados (A) e de chocolate (Ch)

Marca*	FUR (mg/100g de proteína)		
	M	A	Ch
F1	259,94 ± 1,5 <sup>b</sup>	62,49 ± 0,7 <sup>a,b</sup>	73,21 ± 2,2 <sup>a</sup>
F2	65,05 ± 1,6 <sup>a</sup>	64,68 ± 1,6 <sup>b</sup>	77,87 ± 1,8 <sup>a</sup>
F3	61,47 ± 1,6 <sup>a</sup>	59,53 ± 1,6 <sup>a</sup>	106,68 ± 1,9 <sup>b</sup>
<b>Média**</b>	128,82±133	61,01±2,09	85,92±18,12
<b>Intervalo</b>	51,67 – 271,63	49,54 – 74,40	64,04 – 118,98
<b>Mediana</b>	68,58	61,57	82,15

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

\*Média ± desvio padrão, n=3.

\*\*Média ± desvio padrão, n=27

M=milho, A=Açúcar, Ch= Chocolate

Para as amostras de granola observaram-se teores variando entre 239 e 363mg/100g de proteína. Esses teores foram mais elevados comparativamente aos encontrados flocos, o que pode estar relacionado com o maior teor de proteína na granola. As marcas estudadas apresentaram diferença estatística para o teor de FUR ( $p < 0,01$ ) (tabela 20).

Não há outros trabalhos na literatura internacional que relatem furosina proveniente da RM com mesmo tipo de flocos de granola.

**Tabela 20.** Conteúdo de furosina em cereais do tipo granola

	Marca*	Tipo de granola
<b>FUR</b>	G1	239,43 ± 1,5 <sup>a</sup>
<b>(mg/100g</b>	G2	315,25 ± 17,2 <sup>b</sup>
<b>proteína)</b>	G3	363,29 ± 8,7 <sup>c</sup>
<b>Média**</b>		305,99 ± 62,44
<b>Intervalo</b>		230,37 – 397,34
<b>Mediana</b>		322,04

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

\*Média ± desvio padrão, n=3

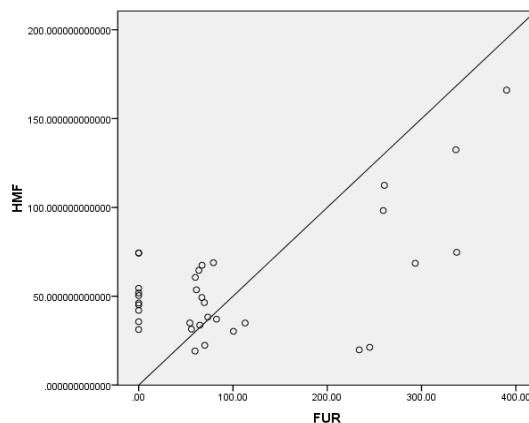
\*\* Média ± desvio padrão, n=27

Não foi detectada FUR nas amostras de café analisadas. HENLE *et al.*, (2005), que empregaram a mesma metodologia deste estudo (CLAE), também não detectaram a substância nestas amostras. Detectaram furosina em concentrações de 70mg/kg de proteína (7mg/100g de proteína) empregando outra metodologia (CG/MS) (NUNES e COIMBRA, 2007). Estudos indicam que em alimentos que sofreram forte tratamento térmico, como o café, a FUR pode ser degradada em CML, outro indicador da fase avançada da RM. A furosina é um indicador de tratamento térmico moderado, sendo um dos produtos das etapas iniciais da reação de Maillard (ERBERSDOBLER e SOMOZA, 2007)

RUIZ *et al.*, (2004) observou em pães que com o aumento da temperatura há uma elevação da quantidade de FUR. Porém, quando este aquecimento é prolongado, observou-se uma diminuição da FUR, o que sugere uma degradação deste para a formação de novos produtos da RM como a CML.

Observou-se correlação positiva ( $r=0,96$ ,  $p<0,01$ ) entre o conteúdo de HMF e FUR para os alimentos estudados, independente da variação observada entre as marcas (figura 12). Os resultados para o teor de furosina em alimentos analisados neste trabalho corroboram com os dados apresentados na literatura internacional (NUNES e COIMBRA, 2007; RAMIREZ-JIMENEZ *et al.*, 2000; RUFIAN-HENARES *et al.*, 2009b)

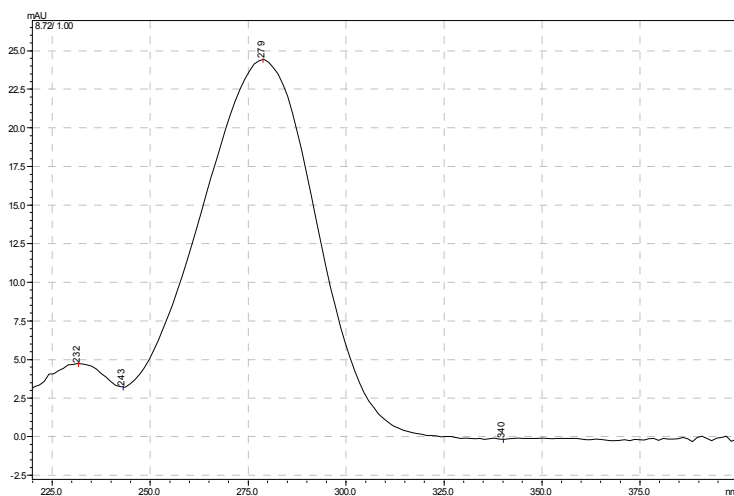
**Figura 12.** Correlação entre teor de HMF e FUR



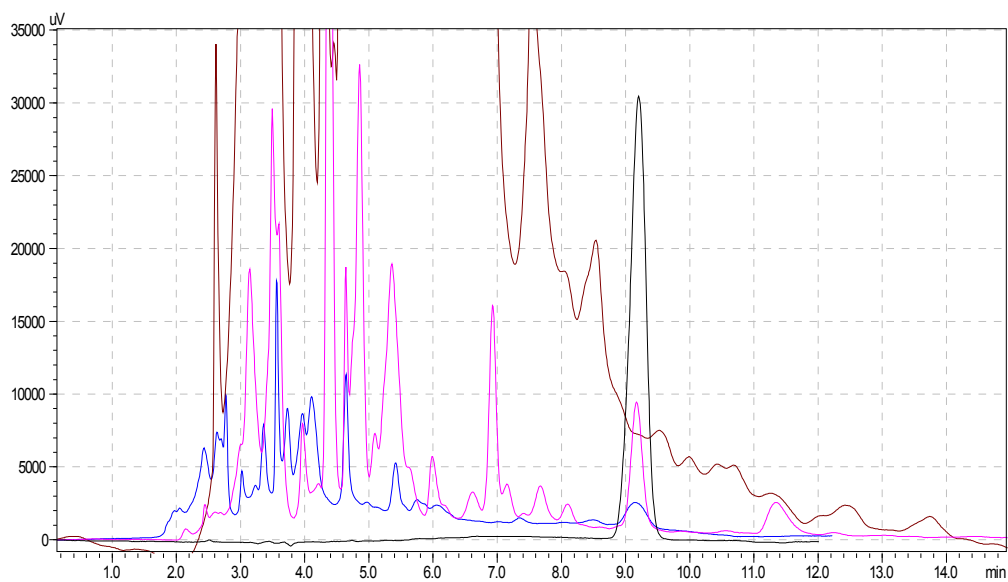


Na figura 13 podemos observar o espectro de absorção do padrão de furosina obtido neste estudo e os perfis cromatográficos representativos das amostras de flocos, granola e café estão na figura 14.

**Figura 13.** Espectro de absorção da furosina



**Figura 14.** Perfil cromatográfico representativo dos flocos (azul), granola (rosa) e café (marrom) comparados ao padrão de FUR (preto).



## 5.6 CARBOXIMETILISINA

O conteúdo médio de CML para flocos de milho foi 112,66 ng/mg de proteína (tabela 21). Apenas a marca F3 apresentou diferença estatisticamente significativa entre os flocos de milho. O conteúdo médio de CML para flocos de açúcar foi de 462,75 ng/mg de proteína e as marcas F1 e F2 foram estatisticamente semelhantes ( $p > 0,05$ ). O conteúdo médio de flocos de chocolate foi de 268,06ng/mg de proteína e todas as marcas estudadas foram diferentes ( $p < 0,05$ ) para este tipo de flocos.

**Tabela 21.** Conteúdo de Carboximetilisina em cereais do tipo flocos de milho (M), açucarados (A) e de chocolate (Ch)

Marca*	CML (ng/mg de proteína)		
	M	A	Ch
F1	91,93 ± 0,04 <sup>a</sup>	216,07 ± 0,79 <sup>a</sup>	105,30 ± 0,21 <sup>a</sup>
F2	92,89 ± 0,55 <sup>a</sup>	232,45 ± 0,12 <sup>a</sup>	150,59 ± 0,08 <sup>b</sup>
F3	153,18 ± 0,33 <sup>b</sup>	939,73 ± 0,25 <sup>b</sup>	548,31 ± 1,08 <sup>c</sup>
<b>Média**</b>	112,66 ± 30,7	462,75 ± 352,48	268,06 ± 208,43
<b>Intervalo</b>	83,60 – 157,94	200,40 – 944,48	101,19 – 573,29
<b>Mediana</b>	148,77	155,27	215,78

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

\*Média ± desvio padrão, n=9.

\*\* Média ± desvio padrão, n=81 .

M=milho, A=Açúcar, Ch= Chocolate

O teor médio de CML foi de 423,51ng/mg de proteína para a granola (tabela 22). As marcas G1 e G2 foram estatisticamente semelhantes ( $p < 0,05$ ). A marca G3 apresentou maior valor de CML o que elevou a média das marcas. O conteúdo de CML para granola não diferiram em relação ao dos cereais do tipo flocos.

**Tabela 22.** Conteúdo de carboximetilisina em granola

<b>Marca*</b>	<b>CML (ng/mg de proteína)</b>
G1	197,44±3,27 <sup>a</sup>
G2	97,27±3,00 <sup>a</sup>
G3	435,83±8,45 <sup>b</sup>
<b>Média**</b>	159,34 ±423,51
<b>Intervalo</b>	76,53–519,90
<b>Mediana</b>	169,97

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (p < 0,05)

\*Média ± desvio padrão, n=3

\*\* Média ± desvio padrão, n=27

O conteúdo médio de CML nas amostras de café analisadas foi de 1826,20ng/mg de proteína (tabela 23). Não houve diferença significativa entre as marcas (p>0,05). O café foi o alimento estudado que apresentou maior conteúdo de CML, o que pode ser explicado pelo tratamento térmico severo a que é submetido.

Alem disso, corrobora com a ausência de FUR neste alimento indicando que a FUR foi degradada para formar CML um produto mais avançado da RM. (ERBERSDOBLER e SOMOZA, 2007).

**Tabela 23.** Conteúdo de CML em café

<b>Marca*</b>	<b>CML (ng/mg de proteína)</b>
C1	1942,52±12,50 <sup>a</sup>
C2	1811,14± 6,27 <sup>a</sup>
C3	1848,47±23,64 <sup>a</sup>
C4	1705,72±12,72 <sup>a</sup>
C5	1823,13±16,20 <sup>a</sup>
<b>Média**</b>	1826,20 ± 125,65
<b>Intervalo</b>	1624,95 – 2022,85
<b>Mediana</b>	1818,64

Letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05)

\*Média ± desvio padrão, n=3

\*\* Média ± desvio padrão, n=45 \*

As concentrações de CML para cereais variaram entre 112,66 e 462,75ng/mg de proteína, teores inferiores aos encontrados por café, que variaram de 1624,95 a 2022,85ng/mg de proteína. DUSCH *et al.*, (1999) observaram níveis variados em produtos de leite com um máximo de 1015ng/mg de proteína em leite evaporado. CHARISSOU *et al.*, (2007b) observou que a glicose é um açúcar mais reativo para a RM e formação de CML quando comparado à frutose e sacarose, o que pode ter favorecido a RM em cereais do tipo flocos de açúcar e chocolate de da granola. BÜSER *et al.*, (1987) observaram um teor médio de 259ng/mg de proteína em leites UHT onde traços de CML são esperados devido tratamento térmico. HARTKOPT *et al.*, (1994) encontrou valores de 30ng/mg de proteína em formulas infantis. O mesmo estudo observou concentração de 11ng/mg de proteína em fórmula infantis com mistura de cereais. Os teores são menores dos encontrados neste estudo para cereais matinais.

Além disso, CHARISSOU *et al.*, (2007a) observou teores entre 5-35ng/mg de proteína para biscoitos, 0-13ng/mg de proteína para pão torrado e de 6-8ng/mg de proteína em cereais matinais. Esses teores são menores quando comparados a este estudo, porém no estudo de CHARISSOU *et al.*, (2007a) foram analisadas apenas duas amostras de cereais matinais o que pode ser um viés de representatividade da amostra além de serem determinadas por outro método analítico (CG-MS).

Além do processamento térmico, produtos com maior quantidade de lipídeos e de proteínas apresentam maior quantidade de CML (GOLDBERG *et al.*, 2004), sendo assim o café, além de passar por processamento térmico mais severo, tem maior quantidade de lipídeos e proteínas quando comparados aos cereais matinais o que pode ter favorecido a maior produção de CML.

Assim como este estudo, GOLDBERG *et al.*, (2004) acredita que apesar dos produtos a base de carboidratos apresentarem menor quantidade de CML quando comparados a alimentos ricos em proteína e lipídeos, os cereais matinais constituem uma importante fonte de PRMs pelo seu forte processamento térmico. Cereais e “snacks” são produzidos por

extrusão termoplástica sob altas pressão e temperatura para formação de *pellets* de vários formatos e densidades. Este tratamento causa maior modificação química, degradação térmica, desidratação e recombinação de fragmentos que podem favorecer a RM (BOSCH *et al.*, 2007a).

Os teores de CML encontrados por GOLDBERG *et al.*, (2004) em alimentos a base de cereais (pães, panquecas e café) não são comparáveis aos encontrados neste estudo, pois a unidade de medida dos teores encontrados estão em unidades/g de amostra.

## 5.7 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS - ACP

A Análise de Componentes Principais (ACP) é um dos métodos estatísticos mais utilizados quando se pretende analisar dados multivariados. Ela permite transformar um conjunto de variáveis não correlacionadas, num novo conjunto de variáveis não correlacionadas chamados de Componentes Principais. O objetivo mais imediato da ACP é verificar se existe um pequeno número dos primeiros componentes principais que seja responsável por explicar uma proporção elevada da variação total associada ao conjunto original (HAIR *et al.*, 2005).

Foi realizada a ACP nos dados obtidos dos indicadores da RM estudados. Como podemos observar a tabela 24, três componentes principais explicaram cerca de 98% da variação dos dados.

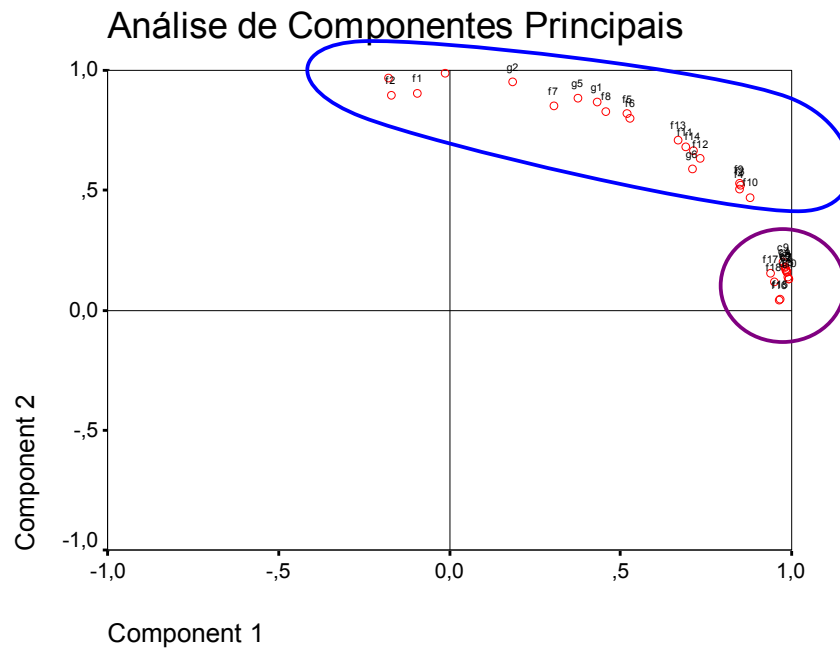
**Tabela 24.** Variância total explicada

Componente	Eigenvalues iniciais		
	Total	% de variância	% cumulativa
1	24,917	73,285	73,285
2	7,282	21,416	94,703
3	1,378	4,054	98,757
4	0,388	1,141	99,898
5	8,475E-02	0,102	100,00

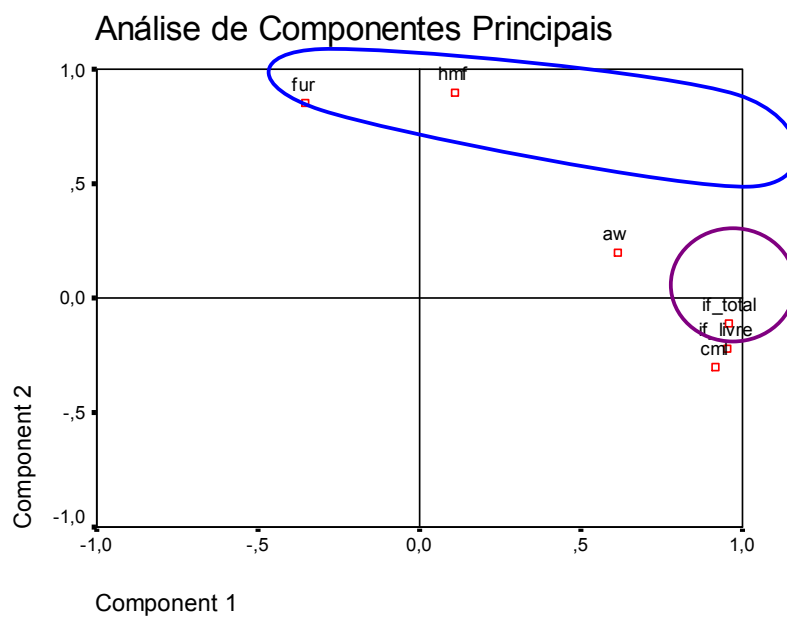
As amostras de flocos e granola apresentaram uma dispersão maior (agrupamento azul) quando comparadas as amostras de café (agrupamento roxo) (figura 15).

Os indicadores determinantes para o agrupamento dos flocos foram o HMF e FUR e para o café os indicadores determinantes foram CIF livre, CIF total e CML (figura 16).

**Figura 15.** Gráfico de ACP das amostras de flocos, granola e café.



**Figura 16.** Gráfico de ACP dos indicadores CIF livre, CIF total, FUR, HMF e CML



## 6. CONCLUSÕES

Os alimentos analisados apresentam composição centesimal que está de acordo com as tabelas de composição de alimentos brasileiras. Houve diferenças entre os valores declarados nos rótulos e os encontrados nas análises bromatológicas porém a maior parte está dentro da variação permitida pela legislação. A presença de carboidratos e proteínas pode favorecer a reação de Maillard durante o processamento térmico, o que é desejável para o desenvolvimento da cor, aroma e sabor.

Indicadores da reação de Maillard foram determinados por espectrofotometria de fluorescência, teste imunoenzimáticos e por CLAE em alimentos de alto consumo e comercializados na cidade de São Paulo em 2009. Os métodos espectrofotométricos de fluorescência e por CLAE foram padronizados e validados respectivamente para as análises de CIF livre e CIF total e para HMF e FUR para os alimentos estudados: cereais matinais do tipo flocos, granola e café.

A análise de CIF livre e total permitiu-nos observar que o café foi o alimento estudado com maior concentração destas substâncias. Dentre os cereais, a granola apresentou maiores valores quando comparada aos cereais do tipo flocos.

Na análise de HMF foram observadas maiores quantidades deste indicador para o cereal tipo granola devido a presença de frutas desidratadas o que pode ter interferido na análise. Seguindo da granola, estão os cereais tipo flocos e por último o café.

A granola também foi o alimento com maior teor de FUR seguido dos cereais do tipo flocos. Não foi possível a quantificação de FUR para o café.

Os cereais matinais apresentaram valores médios semelhantes de CML. Observou-se maior deste indicador para as amostras de café, o que está de acordo com dados da literatura.



Os cereais do tipo flocos contribuem para maior ingestão de PRMs da fase inicial da reação de Maillard (RM) devido sua pouca formação de produtos intermediários e avançados. A granola contribui para maior ingestão de PRMs da fase intermediária da RM representado pelo HMF e FUR, enquanto o café contribui de forma significativa para maior ingestão de PRMs da fase avançada da RM representado pela CML. O café, por ser submetido a tratamento térmico mais severo apresenta maior concentração de PRMs da fase avançada da reação (CML).

Devido a ausência de estudos que indiquem um consenso sobre a quantidade máxima a ser consumida de PRMs, os dados obtidos neste estudos não podem ser classificados como alto ou baixo teor de destes produtos. Sabe-se que os PRMs provenientes de dietas podem contribuir para o total de AGEs in vivo, porém o limite a ser consumido ainda não foi recomendado.

A Análise de Componentes Principais (ACP) possibilitou observar que a distribuição das amostras podem ser explicadas por 3 componentes principais, e que os dois primeiros componentes explicam cerca de 95% da variância das amostras.

## 7. REFERÊNCIAS

ABIC - Associação Brasileira da Indústria de Café. Indicadores da indústria de café no Brasil: Desempenho da produção e consumo interno. Disponível em: <http://www.abic.com.br/estatisticas.html#intro>. Acesso em: 10 ago. 2008

Ait Ameer L, Trystram G, Birlouez-Aragon I. Accumulation of 5-hydroxymethyl-2-furfural in cookies during the backing process: Validation of a extraction method. *Food Chem.* 2006; 98:790-796.

Ames JM. Evidence against dietary advanced glycation endproducts being a risk to human health. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007; 51:1085-1090

Associação Brasileira de Supermercados – ABRAS. Os Números do setor. Disponível em: <http://www.abrasnet.com.br/economia-e-pesquisa/ranking-abras/as-maiores/> Acessado em: 04/03/2010

Baisier WM, Labuza TP. Maillard browning kinetics in a liquid model system. *J.Agric. Food Chem.* 1992; 40: 707-713.

Baynes JW. Dietary ALEs are a risk to human health – NOT! *Mol. Nutr. Food Res.* 2007; 51:1102-1106.

Berquo ES, Souza JMP, Gotlieb SLD. *Bioestatística*. São Paulo: EPU. 3ªEd. 2006; 350p

Birlouez-Aragon I, Pischetsrieder M, Leclere J, Morales FJ, Hasenkopf K, Kientsch-Engel R, Ducauze CJ, Rutledge D. Assessment of protein glycation markers in infant formulas. *Food Chem.* 2004; 87:253-259

Boehm BO, Schilleng S, Rosinger S, Lang GE, Lang GK, Kientsch-Engel R, Stahl P. Elevated serum levels of an advanced glycated end-product N-Carboxymethyl-lysine (CML) are associated with proliferative diabetic retinopathy and macular edema. *Diabetologia.* 2004; 47:1376-1379.

Bosch L, Alegría A, Farré R, Gonzalo C. Fluorescence and colour as markers for the Maillard reaction in milk-cereal based infant foods during storage. *Food Chem.* 2007a; 105:1135-1143.

Bosh L, Sanz ML, Montilla A, Alegria A, Farre R, Del Castillo MD. Simultaneous analysis of lysine, n-carboxymethyllysine and lysinoalanine from proteins. *J. Chromatogr.* 2007b; 860:69-77.

BRASIL. Resolução RDC nº360 de 23 de Dezembro de 2003. Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 23 dez 2003. Disponível em: <http://e->

[legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=9059&word=](http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=9059&word=) Acesso em: 5 jun. 2009.

Buetler T. Dicarbonyls in coffee. *IMARS Highlights*. 2008; 2 (7): 5-7.

Büser W, Erbersdobler HF, Liardon R. Identification and determination of n-epsilon-carboxymethyllysine by gas-liquid-chromatography. *J. Chromatogr.* 1987; 387: 515-519.

Charissou A, Ait-Ameur L, Birlouez-Aragon I. Evaluation of gas chromatography/mass spectrometry method for the quantification of carboxymethyllysine in food samples. *J. Chromatogr.* 2007a; 1140:189-194.

Charissou A, Ait-Ameur L, Birlouez-Aragon I. Kinetics of formation of three indicators of the Maillard reaction in model cookies: Influence of baking temperature and type of sugar. *J. Agr. Food Chem.* 2007b; 55: 4532-4539.

Contreas-Calderon J, Guerra-Hernandez E, García-Villanova B. Indicator of non-enzymatic browning in the evaluation of heat damage of ingredient proteins used in manufactured infant formulas. *Eur. Food Res. Technol.* 2008; 227:117-124.

Delgado T, Corzo N, Santa-María G, Jimeno ML, Olano A. Determination of furosine in milk sample by Íon Pair Reversed Phase Liquid Chromatography. *Chromatographic.* 1992; 33(7/8):374-375.

Delgado-Andrade C, Rufián Henares JA, Morales FJ. Lysine availability is diminished in commercial fibre-enriched breakfast cereals. *Food Chem.* 2007a; 100:725-731.

Delgado-Andrade C, Seiquer I, Navarro MP, Morales FJ. Maillard reaction indicators in diets usually consumed by adolescent population. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007b; 51: 341-351.

Delgado-Andrade C, Seiquer I, Navarro MP. Effects of consumption of Maillard Reaction Products on magnesium digestibility and tissue distribution in rats. *Food Sci. Technol. Int.* 2007c; 13: 109-115.

Delgado-Andrade C, Rufián-Henares J, Morales FJ. Fast method to determine furosine in breakfast cereals by capillary zone electrophoresis. *Eur. Food Res. Technol.* 2005; 221:707-11.

Delgado-Andrade C, Rufián-Henares J, Morales FJ. Study on fluorescence of Maillard reaction compounds in breakfast cereals. *Mol. Nutr. Food Res.* 2006; 50:799-804.

Delgado-Andrade C, Rufian-Henares JA., Morales FJ. Colour and fluorescence measurement as unspecific markers for the Maillard reaction. In: Delgado-Andrade c, Rufian-Henares JA. Assessing the generation and bioactivity of neo-formed compounds in thermally treated foods.1° ed. Granada: Atrios; 2009, p:98.

Delgado-Andrade C, Rufian-Henares J, Morales FJ. Optimised procedure to analyse Maillard reaction associated fluorescence in cereal-based products. Czech J. Food Sci. 2008; 26:339-346.

Drusch S, Faist V, Erbersdobler HF. Determination of N<sup>ε</sup>-carboxymethyllysine in milk products by a modified reversed-phase HPLC method. Food Chem. 1999; 65:547-553.

Erbersdobler HF, Somoza V. Forty years of using Maillard reaction products as indicator of the nutritional quality of foods. Mol. Nutr. Food Res. 2007; 51:423-430.

Ferrer E, Alegria A, Farre R, Clemente G, Calvo C. Fluorescence, browning index, and color in infant formulas during storage. J. Agr. Food Chem. 2005; 53: 4911-4917.

Finot PA. Historical perspective of the Maillard reaction in food science. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2005; 1043:1-8.

Friedman M. Food Browning and its prevention: An overview. J Agr. Food Chem. 1996; 44(3): 631651

Galeazzi MAM, Lima DM, Colugnati FAB, Padovani RM, Rodriguez-Amaya D. Sampling plan for the Brazilian TACO Project. J. food compos. anal. 2002; 15:499-505.

García-Villanova B, Guerra-Hernandes E, Martinez-Gómez E, Montilla J. Liquid chromatography for the determination of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde in breakfast cereals. J. Agric. Food Chem. 1993 ;41:1254-1255.

Glatt H, Schineider H, Liu Y. V79-hCYP2E1-hSULT1A1, a cell line for the sensitive detection of genotoxic effects induced by carbohydrate pyrolysis products and other food-borne chemicals. Mutat. Res. 2005; 580:41-52.

Glenn JV, Stitt AW. The role of advanced glycation end products in retinal ageing and disease. Biochim Biophys Acta. 2009;1790:1190-1116.

Gokmen V, Senyuva HZ. Study of colour and acrylamide formation in coffee, wheat flour and potato chips during heating. Food Chem. 2006; 99(2): 238-243

Goldberg T, Cai W, Peppas M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, Vlassara H. Advanced Glycoxidation End Products in commonly consumed foods. *J. Am. Diet. Assoc.* 2004;104(8): 1287-91.

Guerra-Hernandez E, Corzo N, Garcia-Villanova B. Maillard Reaction Evaluation by furosine determination during infant cereal processing. *J. Cereal Sci.* 1999; 29:171-176.

Hair et al. *Análise multivariada de dados*. Bookman Companhia. 5 edição. 2005

Hartkopf J; Pahlke C; Lüdemann G; Erbersdobler HF. Determination of n-epsilon-carboxymethyllysine by a reversed-phase high-performance liquid-chromatography method. *J. Chromatogr.* 1994; 672: 242-246.

Henle T, Zeheiner G, Klostermeyer H. Fast and sensitive determination of furosine. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1995; 200:235-237.

Henle T, Wlatter H, Klostermeyer H. Evaluation of the extent of the early Maillard reaction in milk products by direct measurement of the Amadori product lactuloselysine. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1991; 193:119-122.

Hodge JE. Chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agr. Food Chem.* 1953; 1(15):928-943.

Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JEB. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care.* 2006; 29(6):1420-32

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro: INMETRO, 2007. 35p.

Instituto Adolfo Lutz. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. São Paulo, IAL, 2004. 1020p

Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Bueting C, Heitmann K, Vlassara H. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Méd. Sci. Res.* 1997; 94:6474-79.

Kikuchi S, Shinpo K, Takeuchi M, Yamagishi S, Makita Z, Sasaki N, Tashiro K. Glycation—a sweet tempter for neuronal death. *Brain Research Reviews.* 2007; 41(2): 306-323

Lanfer Marquez UM, Nishi LE, Barros RMC, Filisetti Cozzi TMCC, Penteadó MVC. Estudo da composição química de flocos de cereais com ênfase nos teores de fenilalanina. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 1997;17(3): 314-319.

Lecle're J, Birlouez-Aragon, I. The fluorescence of advanced Maillard Products is a good indicator of lysine damage during the maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49:4682-4687.

Lin CL; Huang CC; Yu CC, et al. Reduction of advanced glycation end product levels by on-line hemodiafiltration in long-term hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2003;42(3):524-531.

Matiacevich SB, Buera MP. A critical evaluation of fluorescence as a potential marker for the Maillard reaction. *Food Chem.* 2006; 95:423-430.

Matiacevich SB, Santagapita PR, Buera MP. Fluorescence from the Maillard reaction and its potential application in food science. *Crit. Rev. food Sci.* 2005, 45:483-495.

Meade SJ, Miller AG, Gerrard JA. The role of dicarbonyl compounds in non-enzymatic crosslinking: a structure-activity study. *Bioorg Med Chem.* 2003; 11(6):853-62

Monnier VM. Dietary advanced lipoxidation products as risk factors for human health – a call for data. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007; 51: 1091-1093.

Morales FJ, Van Boekel MAJS. A study on advanced Maillard reaction in heated casein sugar solutions. *Int. Dairy J.* 1997; 7:675-83.

Morales FJ, Romero C, Jimenez-Perez S. Fluorescence associated with Maillard reaction in milk and milk-resembling systems. *Food Chem.* 1996; 57: 423-428.

Morales, FJ. Van Boekel MAJS. A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: Fluorescence accumulation. *Int. Dairy J.* 1997a; 7:675-683.

Morales FL, Romero C, Jimenez-Perez S. Chromatographic determination of bound hydroxymethylfurfural as an index of milk protein glycosylation. *J. Agric. Food. Chem.* 1997b; 45:1570-1573.

Morales, FJ. Van Boekel MAJS. A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: Colour formation. *Int. Dairy J.* 1998; 8:907-915.

Murkovic M, Pichler N. Analysis of 5-Hydroxymethylfurfural in coffee, dried fruits and urine. *Mol. Nutr. Food Res.* 2006; 50:842-846.

Nass N, Barling B, Santos NA, Scheubel RJ, Bögermann J, Silber RE, Simm A. Advanced glycation end products, diabetes and ageing. *Z. Gerontol Geriatr.* 2007;40:349-356.

NEPA – Núcleo de Estudo e Pesquisa em alimentação. Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos – TACO. Campinas, Formula Editora, 2006

Nguyen CV. Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: On the relationship of food-AGEs and biological AGEs. *Mol. Nutr. Food Res.* 2006;50:1140-49.

Nunes FM, Coimbra MS. Melanoidins from coffee infusions fraction, chemical, characterization, and effect of the degree of roast. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55:3967-3977.

Nursten H. *The Maillard Reaction: Chemistry, biochemistry and Implications.* Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 2005.

Pischetsrieder. A new CML database. *IMARS Highlights.* 2008; 3(3):19-20.

Rada-Mendoza M, García-Baños J, Villamiel M, Olano A. Study on nonenzymatic browning in cookies, brackers and breakfast cereals by maltulose and furosine determination. *J. Cereals Sci.* 2004; 39:167-73.

Rada-Mendoza M, Olano A, Villamiel M. Furosine as indicator of Maillard reaction in jams and fruit-based infant foods. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50:4141-4145.

Ramirez-Jimenez A, Guerra-Hernandez E, Garcia-Villanova B. Browning indicators in bread. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48:4116-4181.

Resmini P, Pellegrino L, Battelli G. Accurate quantification of furosine in milk and dairy products by a direct HPLC method. *Ital. J. Food. Sci.* 1990; 3:173-183.

Rojas A, Morales MA. Advanced glycation and endothelial functions: A link towards vascular complications in diabetes. *Life Sci.* 2004;76: 715-730.

Rufián-Henares JA, Delgado-Andrade C, Morales FJ. Analysis of heat-damage indices in breakfast cereals: Influence of composition. *J. Cereal Sci.* 2006a; 43:63-69.

Rufián-Henares JA, Delgado-Andrade C, Morales FJ. Application of a fast high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of furanic compounds and glucosylisomaltol in breakfast cereals. *J. AOAC Int.* 2006b; 89:161-165.

Rufian-Henares JA, Delgado-Andrade C. Effect of digestive process on Maillard reaction indexes and antioxidant properties of breakfast cereals. *Food Res. Int.* 2009a; 42:394-400.

Rufian-Henares JA, Delgado-Andrade C, Morales FJ. Assessing the Maillard reaction development during the toasting process of common flours employed by the cereal products industry. *Food Chem.* 2009b; 144:93-99.

Rufián-Henares JA, Garcia-Villanova B, Guerra-Hernandez E. Determination of furfural compounds in enteral formula. *J. Liq. Chromatogr.* 2001; 24(19): 3049-61.

Rufian-Henares JA, Garcia-Villanova B, Guerra-Hernandez E. Generation of furosine and color in infant/enteral formula-resembling systems. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52:5354-5358.

Rufian-Henares JA, Guerra-Hernandez E., García-Villanova B. Maillard reaction in enteral formula processing: furosine, loss of o-phthaldialdehyde reactivity, and fluorescence. *Food Res. Int.* 2002; 35:527-533.

Rufián-Renares JA, Delgado-Andrade C, Morales FJ. Non-enzymatic browning: The case of the Maillard reaction. *In: Delgado-Andrade C, Rufián-Renares JA. Assessing the generation and bioactivity of neo-formed compounds in thermally treated foods. Atrio: Granada, 2009. p. 9-32*

Ruiz JC, Guerra-Hernandez E, Garcia-villanova B. Furosine is a useful indicator in pré-baked breads. *J. Sci. Food. Agric.* 2004; 84:366-370.

Sandu O, Song KY, Cai WJ, et al. Insulin resistance and type 2 diabetes in high-fat-fed mice are linked to high glycotoxin intake. *Diabetes.* 2005; 54(8): 2314-2319.

São Paulo (Cidade). Secretaria Municipal do Estado de São Paulo. Atlas do Trabalho e Desenvolvimento da Cidade de São Paulo. São Paulo: 1997. 100p

Sasaki N, Fukatsu K, Hayashi Y, Yoshida T, Fuji N, Koike T, Wakayama I, Yanagihara R, Garruto R, Amano N, Makita Z. Advanced Glycation End Products in Alzheimer's diseases and other neurodegenerative diseases. *Am. J. Pathol.* 1998;153 (4): 1149-55.

Sattler L, Zerban FW. Unfermentable reducing substances in molasses - volatile decomposition products of sugars and their role in melanoidin formation industrial and engineering chemistry. 1949; 41(7): 1401-1406



Seiquer I, Díaz-Alguacil J, Delgado-Andrade C, López-Frías M, Hoyos AM, Galdó G, Navarro MP. Diets rich in Maillard reaction products affect protein digestibility in adolescent male aged 11-14y. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006;83:1082-1088.

Somoza V. Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: An update. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005; 49:663-675.

Surh YJ, Tannenbaum SR. Activation of the Maillard Reaction Product 5-(Hydroxymethyl) furfural to strong mutagens via allylic sulfonation and chlorination. *Chem. Res. Toxicol.* 1994;7:313:318.

Tan KCB, Chow WS, Ai VHG, Metz C, Bucala R, Lam KSL. Advanced Glycation End Products and endothelial dysfunction in Type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2002; 25(6):1055-59.

Teixidó E, Moyano E, Santos FJ, Galceran MT. Liquid chromatography multi-stage mass spectrometry for the analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods. *J. Chromatogr.* 2008;185: 102-108.

Teixidó E, Santos FJ, Puignon L, Galceran MT. Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 2006;1135: 85-90.

Uchimura MS. Crocância em granola e processo industrial de caramelização do açúcar. Instituto de Tecnologia do Pará. Disponível em: <http://www.sbirt.ibict.br/resposta.do> Acesso em: 12 dez 2008

Uribarri J, Cai W, Pappa M, Goodman S, Ferrucci L, Striker G, Vlassara H. Circulating glycotoxins and dietary Advanced Glycation Endproducts: Two links to inflammatory response, oxidative stress and aging. *J. Gerontol.* 2007;62 (4): 427-33.

van Boekel MAJS. Kinetic aspects of the Maillard reaction: a critical review *Nahrung-Food.* 45(3): 150-159

van Boekel MAJS. Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnology Advances.* 2006; 24(2): 230-233

Vlassara H, Palace MR . Glycoxidation: The menace of diabetes and aging. *Mount Sinai. J. Med.* 2003;70(4): 232-241.

Vorlova L, Borkovcova I, Kalabova K, Vecerek V. Hydroxymethylfurfural contends in foodstuffs determined by HPLC method. *J. Food Nutr. Res.* 2006; 45:34-38.

Xanthis A, Hatzitolios A, Koliakos G, Tatola V. Advanced Glycosylation End Products and nutrition – a possible relation with diabetic atherosclerosis and how to prevent it. *J. Food Sci.* 2007;72: 125-129.

## ANEXO



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – COEP/FSP**  
 Universidade de São Paulo  
 Faculdade de Saúde Pública

OF. COEP/ 214 / 08

Protocolo 1812

Projeto de Pesquisa AVALIAÇÃO DO TEOR DE PRODUTOS DA REAÇÃO DE MAILLARD (PRV) EM CEREJAS MATINAIS E CAFÉ

Pesquisador(a) Juliana Shibao

21 de AGOSTO de 2008.

Prossidora(orientador(a)),

O Sub-Comitê de Ética Ambiental da Faculdade de Saúde Pública – FSP/CEA, analisou as informações quanto aos resíduos químicos a serem gerados durante a execução do projeto de sob responsabilidade do V.S.º acima intitulado.

Cabe informar que a Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo possui desde 10 de novembro de 2004, "Certificado de Aprovação para o Destino de Resíduos Industriais", sob n.º 45001004, expedido pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), específico para o destino de "resíduos de laboratório" que tem como procedimento padrão a contratação de empresa licenciada para o transporte e incineração desses resíduos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública em sua 7.ª/08 Sessão Ordinária, realizada em 15.08.08, considerou o protocolo de pesquisa **APROVADO**.

Atenciosamente,

Cláudio Leone  
 Professor Associado

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa – FSP/COEP

Im.º Sr.º  
 Prof.ª Dr.ª DEBORAH MARKOWICZ BASTOS  
 DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

## CURRICULO LATTES – JULIANNA SHIBAO

### Julianna Shibao

#### Dados Pessoais

**Nome** Julianna Shibao  
**Nascimento** 13/08/1985 - Santos/SP - Brasil

---

#### Formação Acadêmica/Titulação

- 2008** Mestrado em Nutrição em saúde pública.  
 Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil  
 Título: Avaliação do Teor de Produtos da Reação de Mailard (PRM) em cereais matinais e café  
 Orientador: Deborah Helena Marcowicz Bastos
- 2003 - 2006** Graduação em Nutrição.  
 Universidade Católica de Santos, UNISANTOS, Santos, Brasil  
 Título: Edulcorantes: Aspectos químicos, tecnológicos e toxicológicos  
 Orientador: Profª Ms. Andrea Pittelli Boiago Gollücke
- 2000 - 2002** Ensino Médio (2o grau).  
 Colégio Presidente Kennedy, CPK, Brasil
- 1992 - 1999** Ensino Fundamental (1o grau).  
 Colégio Presidente Kennedy, CPK, Brasil
- 2007 - 2008** Aperfeiçoamento em Aprimoramento Profissional em Vigilância Sanitária.  
 Instituto Adolfo Lutz, IAL, Sao Paulo, Brasil  
 Título: Avaliação da Qualidade físico-química de alimentos comercializados em restaurantes self service no município de Praia Grande no ano de 2006  
 Orientador: Roberto Carlos Barsotti  
 Bolsista do(a): Fundação de Desenvolvimento Administrativo

---

#### Formação complementar

- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Princípios Básicos e aplicações em LC/MS-MS.  
 Instituto Adolfo Lutz, IAL, Sao Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Higiene e comportamento pessoal.  
 Serviço Social do Comércio-São Paulo, SESC-SP, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Enriquecimento e diversificação de cardápios.  
 Serviço Social do Comércio- São Paulo, SESC-SP, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Segurança alimentar e nutricional.  
 Serviço Social do Comércio-São Paulo, SESC-SP, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em VII Jornada de Nutrição.

## CURRÍCULO LATTES – DEBORAH HELENA MARKOWICZ BASTOS

Deborah Helena Markowicz Bastos

**Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2**

Graduada em Engenharia Agrônômica pela Universidade de São Paulo (1982), mestrado em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo (1989) e doutorado em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas (1996). Atualmente é Professor Associado da Universidade de São Paulo (obteve o título de Livre-Docente em dezembro de 2007). Trabalhou na Universidade São Francisco (Bragança Paulista, São Paulo) de 1992 a 2002, onde atuou como docente e pesquisador no curso de Ciências Farmacêuticas e na Pró-Reitoria de Graduação, supervisionando o Nucleo de Apoio Didático-Pedagógico. É editor associado do periódico *Molecules* desde 2007, Atua como revisor de periódicos da área - *Journal of Food Composition and Analysis*, *Journal of Food Chemistry*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *Revista de Segurança Alimentar e Nutricional*, *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, *Química Nova*, *Molecules*, entre outros. Tem experiência na área de Nutrição, com ênfase em Composição de Alimentos, atuando principalmente nos seguintes temas: análise e composição de alimentos, análise sensorial de alimentos, alimentos funcionais e higiene e controle de alimentos.  
(Texto informado pelo autor)

**Última atualização do currículo em 24/05/2010**

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/2399624390092442>

### **Dados pessoais**

<b>Nome</b>	Deborah Helena Markowicz Bastos
<b>Nome em citações bibliográficas</b>	Bastos, D.H.M.; Markowicz Bastos, D.H.; Bastos, D.M.; Bastos, Deborah H. Markowicz
<b>Sexo</b>	Feminino
<b>Endereço profissional</b>	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição. Av. Dr. Arnaldo, 715 Cerqueira César 01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617855 Ramal: 244 Fax: (11) 30626748

### **Formação acadêmica/Titulação**

<b>2007</b>	Livre-docência. Faculdade de Saúde Pública -USP. <i>Título:</i> Erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ): compostos bioativos e funcionalidade, <i>Ano de obtenção:</i> 2007.
<b>2008 - 2008</b>	Pós-Doutorado



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)