UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA

Inibição da formação de produtos da reação de Maillard por extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em sistemas modelo alimento

Erica de Lemos Ferreira Monaro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profª Drª Deborah Helena Markowicz Bastos

São Paulo
2012

Inibição da formação de produtos da reação de Maillard por extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em sistemas modelo alimento

Erica de Lemos Ferreira Monaro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profª. Drª. Deborah Helena Markowicz Bastos

São Paulo

2012

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.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Nelson e Elisabete, pela dedicação e amor.

Aos meus irmãos, Karina e Fabiano, pela companhia,

amizade e amor.

Ao meu marido, Gustavo, por todos os anos de apoio,

carinho, amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus por estar sempre presente em minha vida e guiar os meus passos.

À professora Drª Deborah Helena Markowicz Bastos por todos os anos de orientação, dedicação e amizade.

Ao professor Dr. José Alfredo Gomes Arêas e a professora Drª Suzana Caetano da Silva Lannes pelas sugestões e contribuições para a execução desse trabalho.

À Drª Luciana Cristina Brigatto Fontes pela amizade, carinho, colaboração na redação do trabalho e sugestões durante o desenvolvimento do projeto.

À Drª Geni Rodrigues Sampaio por colaborar na execução do projeto, pela amizade e por estar ao meu lado desde que comecei no laboratório.

À Ms. Rosana Aparecida Manólio Soares por estar sempre presente com muito bom humor e pronta para ajudar.

À Drª Liania Alves Luzia pelo carinho, pela alegria que contagia e por ser um exemplo de dedicação.

Às amigas Daniela Moura, Luciana Fontes e Thaise Mendes que tornaram os momentos difíceis mais agradáveis.

Aos amigos e colegas de grupo Áurea, Erica, Mariana, Carol, Telma, Jessica, Thais, Nara, Cintia, Amanda, Marcelo e Gustavo pela amizade, conselhos, momentos de descontração, almoços e cafés.

À Universidade de São Paulo em especial a Faculdade de Saúde Pública e ao Departamento de Nutrição pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela bolsa de mestrado (processo 2009/12027-5).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo auxílio financeiro (processo 2010/19138-4).

Aos funcionários do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública – USP.

À todos que ajudaram de alguma forma para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A reação de Maillard ocorre em alimentos termicamente processados e também em sistemas biológicos, em que é chamada de glicação. Esta reação ocorre entre grupos carbonilas e grupamentos aminas e tem especial importância em alimentos, pois promovem alterações sensoriais importantes ao sabor, aroma, aparência e textura. Em sistemas biológicos, entretanto, podem acarretar mudanças em estruturas moleculares que favorecem o estresse oxidativo e participam da patogenia de complicações micro e macro vasculares características da diabetes, aterosclerose e doenças neurodegenativas. Os compostos carbonílicos ou produtos da reação de Maillard (PRMs) formados em alimentos contribuem para o aumento do *pool* endógeno de compostos carbonílicos. A utilização de substâncias ou alimentos que possam minimizar a formação destes compostos pode constituir-se em uma estratégia para minimizar a sua ingestão. **OBJETIVO:** Avaliar o efeito da adição de extrato etanólico de erva-mate verde na inibição da reação de Maillard em sistemas modelo alimento. **METODOLOGIA:** Foram elaborados modelos de biscoito e lácteos com e sem lipídios. Os teores de produtos da reação de Maillard [furosina (FUR), hidroximetilfurfural (HMF), carboximetilisina (CML) e produtos fluorescentes (IF)] foram avaliados. O extrato etanólico foi obtido por extração contínua a quente da erva-mate verde seca e caracterizado quanto aos teores de compostos fenólicos, cafeína e saponinas por cromatografia líquida. A intensidade de fluorescência dos sistemas foi avaliada por espectrofotometria, os teores de FUR e HMF foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência e de CML por ELISA. **RESULTADOS:** O extrato etanólico de erva-mate apresentou 155µg mg^{-1} de fenólicos totais, 76µg mg^{-1} de cafeína, 5µg mg^{-1} de ácido ursólico e 3µg mg^{-1} de ácido oleanóico. A formação de HMF, FUR e IF nos sistemas modelo de biscoito não foi influenciada pela adição do extrato de erva-mate. O teor de CML do modelo com extrato do sistema de biscoito foi significativamente menor ($p<0,05$) em que os outros tratamentos com aquecimento, a porcentagem de inibição foi de 8%. A formação dos IF nos sistemas modelos lácteos adicionados de extrato foram significativamente menores ($p<0,05$) comparado aos modelos lácteos com aquecimento sem adição de extrato, a porcentagem de inibição foi de 30% para o modelo sem lipídeos e de 27% para o modelo com lipídeos. **CONCLUSÃO**: A adição do extrato etanólico da erva-mate verde foi efetiva em diminuir a reação de Maillard nos modelos de biscoito e lácteos.

PALAVRAS-CHAVES: reação de Maillard, sistema modelo alimento, erva-mate

ABSTRACT

INTRODUCTION: the Maillard reaction (MR) occurs in processed foods during heating, processing and storage and in biological systems, where it is called glycation. The MR is initiated by the condensation of amino groups of proteins with the carbonyl group of reducing sugars and has special importance in foods, because they promote sensory changes important to the flavor, aroma, color and texture. In biological systems, this reaction are involved in the progression of several diseases, such as diabetes, cardiovascular complications and neurodegenerative diseases. The Maillard reaction products contribute to increase the endogenous *pool* of carbonyl compounds. The use of substances or foods that can minimize the formation of these compounds may constitute a strategy to minimize your intake. **OBJECTIVES:** evaluate the effect of addition of the ethanolic extract of yerba mate in inhibition of the Maillard reaction in model food systems. **METHODS:** were developed cookies and milk models food systems. The content of Maillard reaction products [Furosine (FUR), hydroxymethylfurfural (HMF), carboxymethyllysine (CML) and fluorescent compounds (IF)] were evaluated. The yerba mate extract was obtained by hot continuous extraction and characterized for the levels of phenolic compounds and saponins by liquid chromatography. The contents of the fluorescent compounds (IF) was measured by spectrophotometric method, HMF and FUR were analyzed by high performance liquid chromatography and the levels of CML by ELISA. **RESULTS:** The yerba mate extract contained 155µg mg^{-1} of total phenolics, 76µg mg^{-1} of caffeine, 5µg mg^{-1} of ursolic acid and 3µg mg^{-1} of oleanolic acid. The formation of HMF, FUR and IF in cookie systems was not influenced by the addition of the yerba mate extract. The CML content of the cookie model with yerba mate extract was significantly lower ($p<0.05$) than the other treatments with heating. The IF milk models added extract were significantly lower ($p<0.05$) than the IF milk models with heating without extract. **CONCLUSION**: The yerba mate extract reduced the formation of CML in the cookie system and inhibit the Maillard reaction in the intermediate stage in milk systems.

KEY WORDS: Maillard reaction, food model systems, yerba mate

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO 14

1.1 REAÇÃO DE MAILLARD 14

1.2 PRODUTOS DA REAÇÃO DE MAILLARD, SAÚDE E DIETA 17

1.3 PRODUTOS DA REAÇÃO DE MAILLARD EM ALIMENTOS 23

1.4 ERVA-MATE E INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE PRODUTOS DA REAÇÃO DE MAILLARD 29

1.5 JUSTIFICATIVA 32

1.6 OBJETIVO GERAL 33

1.6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 33

1.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 33

2. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) 43

2.1 MATERIAL E MÉTODOS 46

2.1.1 Caracterização do Extrato quanto aos Compostos Bioativos 47

2.1.1.1 Compostos Fenólicos e Cafeína 47

2.1.1.2 Saponinas 49

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO 50

2.2.1 Compostos Fenólicos e Cafeína 50

2.2.2 Saponinas 56

2.3 CONCLUSÃO 58

2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 58

3. DESENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS MODELOS ALIMENTO E AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE PODUTOS DA REAÇÃO DE MAILLARD 62

3.1 MATERIAL E MÉTODOS 65

3.1.1 Modelos Lácteos 65

3.1.2 Modelo de Biscoito 66

3.1.3 Processamento Térmico 67

3.1.4 Determinação dos Produtos da Reação de Maillard 68

3.1.4.1 Determinação de Furosina (FUR) 68

3.1.4.2 Determinação de Hidroximetilfurfural (HMF) 70

3.1.4.3 Determinação de Carboximetilisina (CML) 71

3.1.4.4 Compostos Fluorescentes 72

3.2 ANÁLISE DOS RESULTADOS 73

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 74

3.3.1 Composição Centesimal dos Sistemas Modelo de Biscoito 74

3.3.2 Furosina (FUR) 75

3.3.3 Hidroximetilfurfural (HMF) 79

3.3.4 Carboximetilisina (CML) 83

3.3.5 Compostos Fluorescentes 88

3.4 CONCLUSÃO 91

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 92

ANEXO 1 – SISTEMAS MODELOS LÁCTEOS 98

ANEXO 2- SISTEMAS MODELO DE BISCOITO 99

ANEXO 3 - CURRÍCULOS LATTES 102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação dos compostos fenólicos do extrato de erva-mate por CLUE-ESI/MS no modo de ionização negativo 52

Tabela 2. Parâmetros de validação do método analítico (CLUE-DAD) para caracterização do extrato de erva-mate 53

Tabela 3. Concentração de sólidos solúveis, ácido 5-cafeoilquínico, fenólicos totais e cafeína no extrato etanólico de erva-mate (Ex) 54

Tabela 4. Parâmetros de validação do método analítico para análise dos ácido ursólico e ácido oleanólico..... 57

Tabela 5. Teores de triterpenos no extrato de erva-mate 57

Tabela 6. Composição dos sistemas modelos lácteos..... 65

Tabela 7. Formulação dos sistemas modelo de biscoito..... 66

Tabela 8. Composição centesimal dos sistemas modelo de biscoito..... 74

Tabela 9. Parâmetros de validação do método analítico para análise de furosina (FUR)..... 75

Tabela 10. Teores de furosina (FUR) nos sistemas modelo lácteos..... 78

Tabela 11. Parâmetros de validação do método analítico para análise do hidroximetilfurfural (HMF)..... 80

Tabela 12. Teores de hidroximetilfurfural (HMF) nos sistemas modelo de biscoito 81

Tabela 13. Teores de hidroximetilfurfural (HMF) nos sistemas modelo lácteos 82

Tabela 14. Teor de carboximetilisina (CML) nos sistemas modelo de biscoito 84

Tabela 15. Teor de carboximetilisina (CML) nos sistemas modelos lácteos 86

Tabela 16. Intensidade Fluorescente (IF) de produtos da reação de Maillard no sistemas modelo de biscoito 88

Tabela 17. Intensidade Fluorescente de produtos da reação de Maillard nos sistemas modelos lácteos 89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais etapas da reação de Maillard 15

Figura 2 – Esquema do envolvimento do RAGEs em danos aos tecidos 19

Figura 3 - Estrutura química da furosina 26

Figura 4 - Estrutura química do hidroximetilfurfural..... 27

Figura 5 - Estrutura química da carboximetilisina 27

Figura 6 – Cromatograma CLUE-DAD (λ = 324 nm) com compostos fenólicos presentes no extrato de erva-mate. 51

Figura 7 – Cromatograma CLUE-DAD (λ = 272 nm) com identificação da cafeína (1) presente no extrato de erva-mate 53

Figura 8 - Cromatograma CLAE-DAD (λ = 203 nm) com os picos dos ácidos oleanólico e ursólico presentes no extrato de erva-mate (A) e cromatograma dos padrões dos ácidos oleanólico (1) e ursólico (2) (B) 56

Figura 9 - Cromatograma CLAE-DAD (λ = 280 nm) dos sistemas modelo de biscoito (BCT) (A) e o pico do cromatograma do padrão furosina (1) 76

1. INTRODUÇÃO

1.1 REAÇÃO DE MAILLARD

O escurecimento não enzimático foi inicialmente investigado em 1912 pelo químico Luis Camille Maillard. Esta reação tem apresentado um impacto importante para a ciência de alimentos, pois promove alterações sensoriais importantes para a qualidade de alimentos e provoca alterações no valor nutricional (FINOT, 2005).

Os compostos formados por estas reações são responsáveis por conferirem sabor, aroma e cor aos alimentos e, portanto, fundamentais para sua aceitação e consumo. Podem apresentar atividades biológicas positivas, como atividade antioxidante, antimutagênica e quimioprotetora, e negativas como diminuição do valor nutricional de alimentos, devido ao comprometimento de aminoácidos essenciais, e possível potencial tóxico.

A reação de Maillard caracteriza-se por interações amino-carbonilo de natureza não enzimática entre açúcares redutores ou lipídios oxidados e proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucléicos. A via clássica da reação de Maillard ou glicação (quando a reação ocorre nos organismos vivos) inicia-se com a formação da base de Schiff, composto instável, gerado pela condensação de grupamento carbonila de açúcar redutor com um grupamento amina, oriundo, por exemplo, do aminoácido lisina, composto especialmente susceptível à reação. Na seqüência, a base de Schiff sofre rearranjos, resultando nos produtos de Amadori, conhecidos hoje como Produtos Inicias da Reação de Maillard que apresentam estrutura mais

estável. Os produtos de Amadori apresentam grupos carbonilas reativos, que se condensam com grupos aminas primários acessíveis dando origem aos Produtos Avançados da Reação de Maillard (HODGE, 1953; BARBOSA *et al.,* 2008). Na figura 1 pode ser observado o esquema apresentado por NURSTEN (2005) baseado na proposta de HODGE (1953) das principais etapas da reação de Maillard.

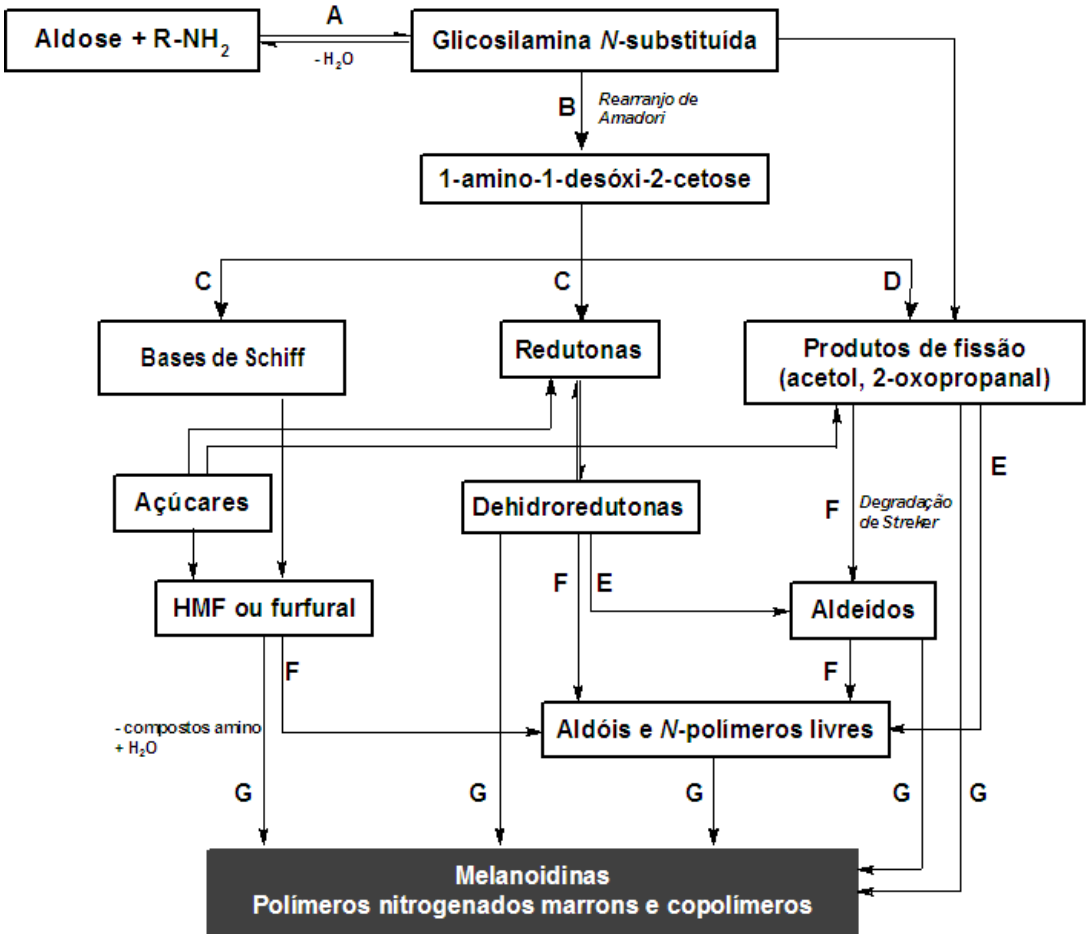


Figura 1 – Principais etapas da reação de Maillard

Reação A: condensação açúcar-grupamento amino. Reação B: Rearranjo de Amadori. Reação C: Degradação de açúcares. Reação D: Fragmentação de açúcares. Reação E: Degradação de aminoácidos (Degradação de Strecker). Reação F: Condensação aldólica. Reação G: Condensação amino-aldeído, formação de compostos nitrogenados. HMF=hidroximetilfurfural.

No organismo vivo, ocorre a reação de condensação entre carbonilas e aminas, a qual é denominada glicação e os produtos estáveis formados são chamados Produtos Avançados de Glicação ou *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs). Os AGEs estão implicados em modificações fisiopatológicas que ocorrem na diabetes, ateroesclerose e doenças neurodegenerativas (MUNCH *et al*., 1997; GUGLIUCCI, 2000; JANDELEIT-DAHM *et al*., 2005; NASS *et al.,* 2007; XANTHIS *et al*., 2007; MONTAGNANI, 2008; KRAUTWALD e MÜNCH, 2010) e podem causar danos aos tecidos por modificar a função da proteína devido à alterações em sua estrutura/configuração, modificar o tecido em si, devido às ligações cruzadas (*cross-links*) inter e intra-molecular, favorecer a formação de radicais livres e induzir resposta inflamatória após ligarem-se a receptores específicos (VISHWANATH, 1986; NASS *et al*., 2007; URIBARRI *et al.,* 2007a; TANG *et al*., 2009).

No diabetes, os danos em proteínas provocados por interações com carbonilas são as principais causas de doenças relacionadas a diabetes. A formação dos AGEs é observada também no envelhecimento e ocorre dentro e fora das células. Estes compostos estão envolvidos na patogenia da maioria de complicações do diabetes como nefropatias e doenças vasculares. Durante o envelhecimento, quantidades crescentes de AGEs são detectadas em muitos tecidos mas em pacientes com diabetes detecta-se quantidades significativamente maiores de AGEs. Além dos AGEs formados endogenamente, a ingestão de alimentos que contenham

“AGEs”, ou produtos da reação de Maillard, contribui para o aumento da quantidade de AGEs nos tecidos (NASS *et al.,* 2007).

1.2 PRODUTOS DA REAÇÃO DE MAILLARD, SAÚDE E DIETA

As reações de escurecimento não enzimático e a formação de produtos da reação de Maillard (PRMs) ocorrem facilmente quando alimentos são processados em temperaturas superiores a 100ºC e são influenciadas por fatores como pH, tempo, temperatura, atividade água, composição do sistema, entre outros (BALTES, 1982; AMES, 1990). Esta reação é importante para a aceitação sensorial de vários alimentos como pães, leite em pó, cereais matinais, café, bolos, carnes, entre outros.

A comunidade científica vem discutindo a relação entre os PRMs presentes nos alimentos atuando como “glicotoxinas” nos organismos. Ainda assim, o papel dos PRMs presentes nos alimentos/dietas na saúde é pouco conhecido (KOSCHINSKY *et al*., 1997; ZHENG *et al.,* 2002; SOMOZA, 2005; BAYNES, 2007; MONNIER, 2007; VLASSARA *et al.,* 2007; XANTHIS *et al*., 2007; ROBERT *et al*., 2011).

Muitos estudos têm mostrado que os produtos da reação de Maillard presentes na dieta elevam os níveis séricos de AGEs e que estão positivamente correlacionados com aumento do estresse oxidativo, disfunções orgânicas e aumento dos níveis de moduladores inflamatórios (CAI *et al.,* 2008; VLASSARA *et al.,* 2008). Outros estudos identificaram que o consumo de PRMs por ratos está associado à síntese de citosinas inflamatórias (TNF-α e proteína C reativa) e ao desenvolvimento de

nefropatologias (LIN *et al*., 2003; VLASSARA e PALACE, 2003; SANDU *et al*., 2005; URIBARRI *et al.,* 2007b).

SCHMIDT e colaboradores, em 1992, identificaram os receptores de AGEs (RAGEs), foi observado que células endoteliais apresentavam moléculas específicas na superfície que mediavam a interação AGE-endotélio. Desde então, este receptor vem sendo intensamente estudado (TESSIER, 2010).

O RAGE pertence à família das imunoglobulinas de superfície celular, as regiões para o fator nuclear-κB e para a interleucina-6 estão localizadas no gene promotor do RAGE controlando a expressão desse receptor e associando o RAGE às respostas inflamatórias. O RAGE é minimamente expresso em células epiteliais, neuronais, vasculares e inflamatórias sob condições fisiológicas. No entanto, sua expressão está aumentada em macrófagos, monócitos, células musculares lisas, células endoteliais e astrócitos sob condições de excesso de AGEs (MAHAJAN *et al.,* 2009; RAMASAMY *et al*., 2009). Este receptor está envolvido em processos patológicos da diabetes, envelhecimento, inflamação, neurodegeneração e tumores (YAN *et al*., 2010). Na figura 2 pode ser observado como os AGEs modulam os danos aos tecidos.

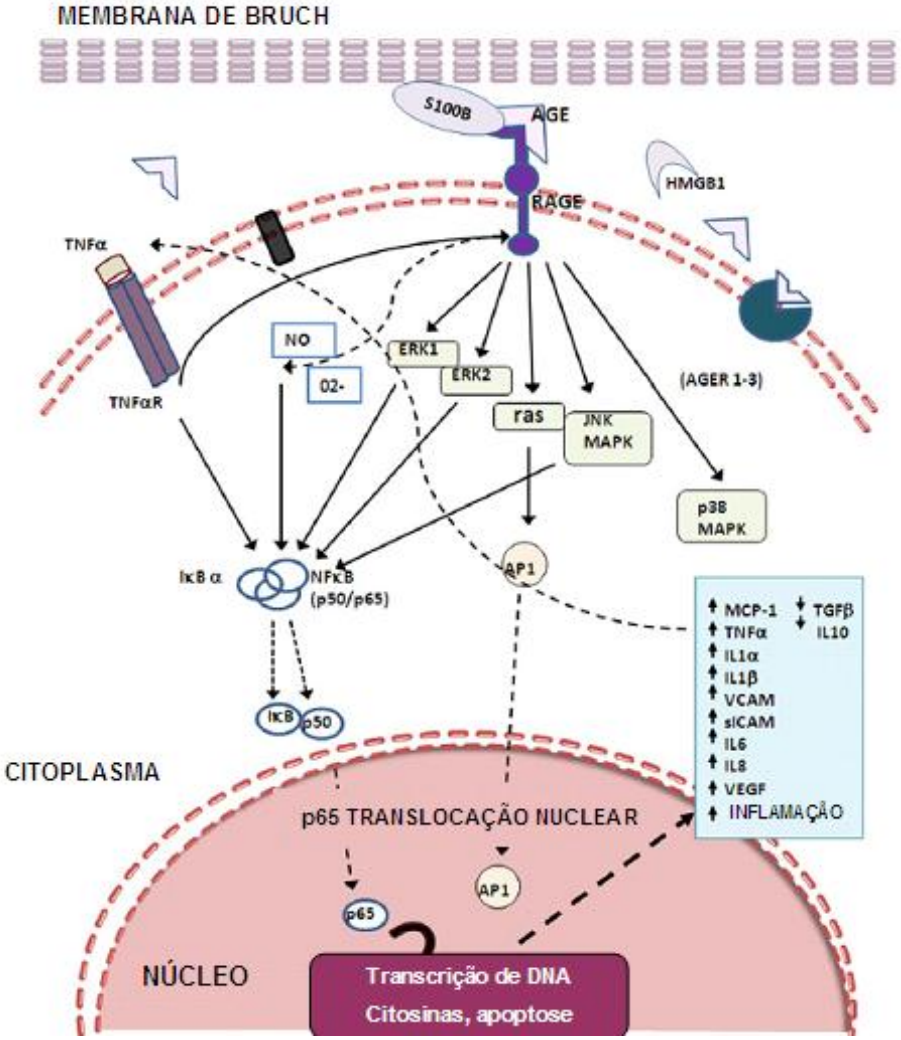


Figura 2 – Esquema do envolvimento do RAGEs em danos aos tecidos (GLENN e STITT, 2009).

TNFα: fator de necrose tumoral, TNFαR: receptor do TNFα, NO: Oxido nítrico, O_2: Oxigênio, IkBα: Inibidor do κB, NFκβ: fator nuclear kappa B, AP1: proteína ativadora 1, JNK: Jun N-terminal quinase, MAPK: Proteína quinase mitógeno-ativada, MCP-1: Proteína quimioatratora de monócitos 1, IL1α: Interleucina 1 Alfa, IL1β: 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-β: Fator de crescimento transformador beta.

A interação AGE-RAGE ativa transcrição do NF-κB, acarretando ao subseqüente aumento da expressão de seus genes-alvo, como endotelina-1, VCAM-1, selectina E, fator tecidual, trombomodulina, VEGF e de citocinas

pró-inflamatórias que incluem a interleucina-1α (IL-1α), IL-6 e o fator de necrose tumoral-α, além do próprio RAGE. O bloqueio do RAGE, por sua vez, inibe a ativação do NF-κB. Os AGEs ligados aos seus receptores levam a disfunção endotelial, ativação acelerada de macrófagos para as células espumosas, diminuição da flexibilidade das células musculares lisas, comprometendo a complacência arterial e torna a fração LDL-colesterol mais sensível a oxidação (GLENN e STITT, 2009; YAN *et al*., 2010).

A dieta é considerada a principal fonte exógena de PRMs e pode exercer importante influência no desenvolvimento de diversos quadros patológicos, especialmente da diabetes. Embora ainda não se conheça quais 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 microbiota do intestino (NASS *et al.,* 2007).

LIN e colaboradores (2003) demonstraram que uma dieta restritiva em PRMs pode prevenir complicações vasculares do diabetes como nefropatias e reduzir a incorporação de AGEs nos tecidos. Ratos diabéticos e não diabéticos foram submetidos a dietas com alto teor de PRMs (12.500 U/mg) e a dietas com baixo teor de PRMs (2.700 U/mg) durante dois meses. O grupo de ratos diabéticos que recebeu dietas com baixo teor de PRMs apresentou níveis séricos de AGEs menores, número reduzido de células inflamatórias e menor lesão vascular que o grupo que foi submetido a uma dieta com altos teores de PRMs.

URIBARRI e colaboradores (2005) analisaram a dieta de 90 indivíduos norte americanos durante três dias e identificaram um consumo diário de PRMs em torno de 16.000 kU. Neste mesmo estudo, o consumo de PRMs e os níveis plasmáticos de carboximetilisina dos indivíduos foram analisados e foi encontrada uma correlação significativa entre teor de PRMs na dieta e níveis plasmáticos de AGEs elevados. E um subgrupo de indivíduos expostos a uma dieta com teores de PRMs reduzidos apresentou uma redução de 30- 40% nos níveis de AGEs séricos. Os autores concluíram que uma dieta rica em PRMs como a dieta do norte americano contribui significativamente para o aumento do *pool* de AGEs endógenos.

Os benefícios de uma dieta restritiva em 'glicotoxinas' também foram reportados por CAI e colaboradores (2007). Os autores demonstraram que animais submetidos a uma dieta com redução de 50% no total de PRMs presentes em uma dieta regular (300.000 U) apresentaram redução do estresse oxidativo, menor dano renal, melhora na resistência a insulina, na albuminúria e glomerulosclerose, maior expectativa de vida e menor expressão dos receptores de AGEs (RAGE) nos tecidos.

A literatura ressalta o papel dos AGEs no desenvolvimento de diversos quadros patológicos da diabetes. A *Diabetes Mellitus* (DM) é uma doença decorrente da falta de insulina ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente os seus efeitos. Suas complicações crônicas decorrem de alterações micro e macrovasculares que levam a disfunção, dano ou falência de vários órgãos. A DM é considerada uma doença crônica de alta prevalência no Brasil e é um problema de saúde pública, a prevalência da

DM está aumentando de forma exponencial, adquirindo características epidêmicas em vários países, particularmente nos países em desenvolvimento, e acredita-se que mudanças no meio ambiente e no comportamento humano justifiquem esse fenômeno (SBD, 2002; WILD *et al*., 2004; OLIVEIRA *et al*., 2010). A taxa de mortalidade e morbidade associadas a diabetes representam grande impacto econômico e social em diferentes grupos etários e regiões geográficas.

O desenvolvimento de doença microvascular específica na retina, no glomérulo renal e nos nervos periféricos, bem como a doença macrovascular aterosclerótica caracterizam as complicações da diabetes. A hiperglicemia é o fator primário desencadeador dessas complicações micro e macrovasculares, sendo a formação endógena dos produtos de glicação avançada um dos principais mecanismos responsáveis pelos danos celulares e teciduais observados nessa doença (BARBOSA, *et al.,* 2009; GUL *et al.,* 2009; NOZYŃSKI *et al.,* 2011; WANG *et al*., 2012).

Frente aos efeitos adversos relacionados aos AGEs/PRMs presentes na dieta, os quais somam-se ao *pool* de AGEs endógenos, favorecendo o surgimento e a progressão das complicações do diabetes, tem-se recomendado uma dieta com menores teores de PRMs. Estudos sugerem a ingestão de 16.000 U PRMs/dia como uma ingestão segura de PRMs, porém estes valores não são considerados uma recomendação de ingestão diária de PRMs e estudos prospectivos ainda são necessários para que se possa determinar uma recomendação de ingestão diária de PRMs (XANTHIS *et al.,* 2007).

Considerando os possíveis efeitos negativos provocados pelos PRMs presentes nos alimentos, a inibição da formação destes compostos em alimentos constitui alternativa para reduzir a sua ingestão uma vez que o consumo de alimentos ricos em PRMs como salgadinhos fritos, café, biscoitos, leite e derivados, carnes, entre outros, tem aumentado significativamente nos últimos anos devido a alterações no padrão alimentar da população (DELGADO-ANDRADE *et al.,* 2007).

1.3 PRODUTOS DA REAÇÃO DE MAILLARD EM ALIMENTOS

A reação de Maillard é a reação química mais importante do processamento de alimentos provocando alterações no sabor, aroma, cor e textura. Vários fatores influenciam a reação e podem ser considerados como variáveis de processamento e de armazenamento. A modificação destas variáveis tem sido utilizada para modificar a reação e, conseqüentemente, para afetar os atributos de qualidade dos alimentos a fim de produzir alimentos sensorialmente mais aceitos pelos consumidores (AMES, 1990; YU e ZANG 2010).

GOLDBERG e colaboradores (2004) demonstraram que alimentos termicamente processados apresentam altos teores de PRMs. Exemplos: amêndoas torradas (66,5 kU/g), manteiga (265 kU/g), maionese (94 kU/g), peito de frango grelhado por 15 minutos (58 kU/g), peito de frango frito por 15 minutos (61 kU/g), carne bovina grelhada por 15 minutos (60 kU/g), atum

assado por 40 minutos (6 kU/g), atum grelhado por 10 minutos (51 kU/g), queijo tipo americano (87 kU/g), queijo tipo brie (56 kU/g), ovo frito (27 kU/g), tofu cru (8 kU/g), tofu assado (41 kU/g), leite de vaca (0,05 kU/mL), leite humano (0,05 kU/mL), fórmulas infantis (4,86 kU/mL) e pão com miolo (0,54 kU/g).

A formação de cor é a primeira alteração que se observa no alimento durante a reação de Maillard e é atribuída à formação de melanoidinas, que são polímeros nitrogenados com coloração marrom. As melanoidinas são responsáveis pela coloração escura de alimentos como café, cacau, pão, biscoitos, entre outros. O escurecimento de alimentos nem sempre é desejável como no caso de sucos, chocolate branco e leite (WANG *et al.*, 2011). Dados da literatura vêm relacionando alterações de cor devido a reação de Maillard e formação de compostos com atividade antioxidante. No geral, a formação de melanoidinas tem sido frequentemente associada a formação de compostos com atividade antioxidante (MANZOCCO *et al.*, 2001; ZIELINSKI *et al*., 2010; ZENG-YAN *et al.,* 2011).

As alterações no sabor/aroma provocadas pela reação de Maillard dependem: (1) do tipo de açúcar e aminoácidos envolvidos e (2) do teor de água, da temperatura, tempo e pH da reação. O primeiro fator determina o tipo de compostos formados e o segundo fator influencia a cinética da reação (VAN BOEKEL, 2006). Os estágios intermediários e finais da reação são os mais importantes para formação de sabor/aroma, especialmente, a degradação de Strecker, na qual aminoácidos são degradados (STANIMIROVA *et al.*, 2011).

A textura é o resultado de muitas interações complexas de componentes da matriz e o processamento pode interferir estas interações de modo favorável ou não. A reação de Maillard modifica a textura dos alimentos por meio de ligações cruzadas (*cross-links*) entre proteínas, o que altera as propriedades funcionais das proteínas. A modificação da quantidade e natureza das proteínas nos alimentos é um meio pelo qual a indústria de alimentos tem manipulado a textura de alimentos durante o processamento (GERRARD, 2002). No entanto, pouco se sabe sobre a extensão da ligação cruzada provocada pela reação de Maillard em alimentos processados, o impacto desse processo sobre a qualidade dos alimentos e como a reação pode ser controlada para maximizar a qualidade dos alimentos.

Os marcadores utilizados para avaliação da perda nutricional de alimentos termicamente processados e indicadores da reação de Maillard em alimentos são furosina (FUR), hidroximetilfurfural (HMF), carboximetilisina (CML) e produtos fluorescentes (ERBERSDOBLER e SOMOZA, 2007).

A furosina (ε-*N*-2-furoilmetil-l-lisina) (Figura 3) é gerada por meio da hidrólise ácida dos compostos de Amadori (precursores da formação dos AGEs). Estes compostos são formados pela interação do grupo ε-amino da lisina com glicose, lactose ou maltose resultando respectivamente em frutoselisina, lactuloselisina e maltoloselisina com conseqüente perda do grupamento amino no início da reação de Maillard. Por esta razão, a estimativa do dano das proteínas causada pelo aquecimento é geralmente

baseada na determinação da quantidade de furosina formada durante a hidrólise ácida dos alimentos (GUERRA-HERNANDEZ *et al*., 1999; RADA-MENDOZA *et al.,* 2004; DELGADO-ANDRADE *et al.,* 2005). A furosina é o mais específico e mais importante indicador da fase inicial da reação de Maillard.

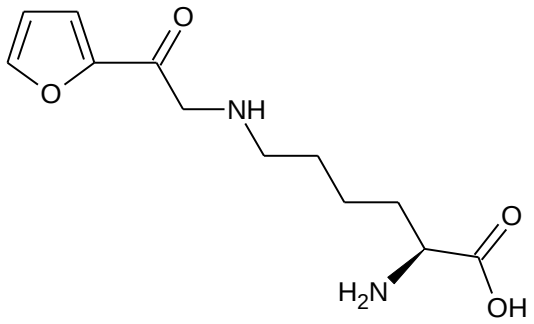


Figura 3 - Estrutura química da furosina

O hidroximetilfurfural (5-hidroximetil-2-furfural) (Figura 4) é um composto intermediário da seqüência da reação de Maillard também formado pela degradação de açúcares (frutose e glicose) a altas temperaturas (RUFIÀN-HENARES *et al.,* 2001). O HMF tem sido estudado em produtos alimentícios principalmente por ter sido associado a efeitos mutagênicos, danos ao DNA. Além disso, seus derivados como 5-clorometilfurfural e 5-sulfoximetilfurfural revelaram-se cititóxicos, genotóxicos e carcinogênicos (SURH e TANNENBAUM, 1994; GLATT *et al*., 2005; TEIXIDÓ *et al.,* 2006).

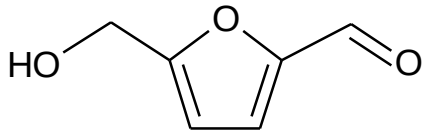


Figura 4 - Estrutura química do hidroximetilfurfural

A carboximetilisina (Nε-carboximetilisina) (Figura 5) é um dos melhores indicadores de produtos finais da reação de Maillard e da qualidade nutricional de produtos que sofreram forte tratamento térmico (GOLDBERG *et al.,* 2004; CHARISSOU *et al.,* 2007; HULL *et al*., 2012). A CML pode ser formada pela oxidação da furosina, a partir do metilglioxal, da peroxidação lipídica ou pelo glioxal, um produto da autoxidação de açúcares (AMES, 2008). A CML pode ser sintetizada também *in vivo*, em sistemas biológicos. Esta substância está associada a fisiopatologia de várias doenças degenerativas, estresse oxidativo, mediadores inflamatórios e complicações vasculares em diabéticos pela ligação da CML em receptores RAGE presentes em monócitos, macrófagos, células nervosas e epiteliais (YAMAGISHI, 2011).

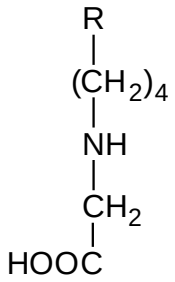


Figura 5 - Estrutura química da carboximetilisina

A determinação de compostos fluorescentes é utilizada como marcador de estágios intermediários da reação de Maillard. Substâncias fluorescentes são precursores de pigmentos marrons formados no estágio final da reação e apresentam diferentes estruturas químicas (MORALES e Van BOEKEL, 1997).

A investigação dos efeitos da reação de Maillard em sistemas modelo alimento lácteo submetido a tratamento térmico e em sistemas modelo de biscoito constitui interesse especial pois esta reação afeta o valor nutricional de proteínas, gera compostos anti-nutricionais, modifica as características sensoriais e propriedades funcionais destes alimentos e derivados. O leite é um alimento muito susceptível a formação de PRMs durante o processamento térmico como a pasteurização e tratamento UHT (*Ultra High Temperature*). A reação entre lactose e lisina é uma das reações de Maillard mais relevantes para a perda nutricional deste alimento (FERRER *et al.,* 2000; BIRLOEZ-ARAGON *et al*., 2002; 2004). Os biscoitos também são alimentos susceptíveis a reação de Maillard durante o processamento, pois são submetidos ao aquecimento e a maioria dos componentes dos biscoitos são a farinha de trigo, o açúcar e a gordura. Durante o processamento térmico ocorre degradação de açúcares e acumulo de PRMs como furfural (AMEUR *et al*., 2006; 2007).

A redução da formação de PRMs nos alimentos seria uma alternativa para reduzir a ingestão destes compostos uma vez que alimentos com produtos da reação de Maillard são amplamente consumidos e contribuem

significativamente para o aumento da ingestão de PRMs e do *pool* endógeno de AGEs.

1.4 ERVA-MATE E INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE PRODUTOS DA REAÇÃO DE MAILLARD

A erva-mate é uma árvore nativa da América do Sul. A extração da erva-mate gera cerca de 710 mil postos de trabalho diretos, com um volume de recursos da ordem de 180 milhões de reais por ano. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, o Brasil produziu 227.462 toneladas de erva-mate no ano de 2010 na região Sul, maior região produtora de erva-mate no Brasil. A implantação e manutenção de ervais em áreas de preservação da mata atlântica são importantes atividades agrícolas com vistas ao desenvolvimento sustentável.

O consumo de bebidas a base de erva-mate remonta de centenas de anos. A propriedade estimulante desta planta era conhecida pelos indígenas antes da chegada dos europeus na América. Sua utilização na medicina popular e por herboristas é recomendada para artrite, cefaléia, constipação intestinal, reumatismo, obesidade, fadiga, edema, hipertensão, digestão lenta e distúrbios hepáticos. Devido a isto, a erva-mate encontra-se inclusa em importantes farmacopéias como a Martingdale e a British Herbal Pharmacopoeia (ANESINI *et al*., 2005).

As xantinas: cafeína e teobromina, os compostos fenólicos, principalmente os ácidos cafeoilquínicos ou clorogêncios

(MAZZAFERA,1997; CARINI,1998; FILIP *et al.,* 2001; BASTOS *et al.,* 2005; BASTOS *et al*., 2006; BRAVO e LECUMBERRI, 2007), e as saponinas (PIRES *et al.,* 1997; MARTINET *et al*., 2001; GNOATTO *et al*., 2005) são responsáveis por vários dos efeitos farmacológicos citados.

A atividade antioxidante da erva-mate é atribuída aos compostos fenólicos presentes em sua composição, os principais são os ácidos fenólicos, sendo mais abundantes os ácidos clorogênicos, seguidos dos derivados do ácido hidroxicinâmico e, por último, os flavonóides (sendo a rutina o flavonóide mais abundante nessa classe).

Extratos de erva-mate verde são capazes de atuar como agentes anti-glicação, inibindo a ação do metilglioxal mesmo em concentrações equivalentes aquelas de aminoguanidina, um agente anti-glicação sintético. Um dos trabalhos que demonstram este efeito utilizou modelos contendo antitrombina III e palminogênio-plasmina, proteínas ricas em resíduos de lisina e arginina que sofrem o ataque de açúcares redutores, o que leva à diminuição de sua atividade. Neste trabalho foi utilizado extrato aquoso não sendo possível avaliar quais mecanismos ou substâncias atuam como agente anti-glicação (GUGLIUCCI e MENINI, 2002). Em 2005, LUCENFORD e GUGLIUCCI avaliaram atividade anti-glicação de extratos aquosos de erva-mate e chá verde (*Camelia sinensis*) empregando sistema modelo em que a albumina sérica bovina (BSA) foi incubada com metilglioxal e os AGEs formados foram dosados por fluorescência (espectrofotometria). Foi avaliada também a perda de fluorescência do triptofano após incubação com o metilglioxal na presença ou ausência dos agentes inibidores de glicação.

Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE foi utilizada para avaliar o desenvolvimento de ligações cruzadas, que levam à mudanças conformacionais da BSA, o que interfere na sua mobilidade eletroforética. Concluiu-se que o extrato aquoso de erva-mate exerce ação anti-glicação de maneira dose-dependente similar à ação da aminoguanidina. O mesmo efeito não foi observado para o chá-verde.

GUGLIUCCI e colaboradores (2009) avaliaram os efeitos anti-glicação de alguns compostos bioativos presentes na erva-mate, ácido cafeico, ácido 5-cafeolquínico e ácido oleanólico, utilizando os sistemas modelo albumina bovina sérica e histonas de feto bovino. Os autores concluíram que o ácido cafeico e o ácido 5-cafeolquínico são responsáveis pela atividade anti-glicação da erva-mate.

A avaliação da atividade de inibição de glicação de extratos *Cyperus rotundus* e de *Teucrium polium*, assim como flavonóides glicosídeos isolados do extrato etanólico de *Stelechocarpus cauliflorus* em sistema modelo contendo frutose e albumina, apresentou resultados positivos tanto para o decréscimo da formação de AGEs quanto para a prevenção de dano oxidativo às proteínas (ARDESTANI e YAZDANPARAST, 2007; WIRASATHIEN *et al.,* 2007). Outros extratos vegetais como de tanchagem (*Plantago asiática),* feijão-mungo (*Vigna radiata*), maracujá-doce (*Passiflora alata*), maracujá (*Passiflora edulis*), crisântemo (*Chrysanthemum sp*.) e folhas de goiaba (*Psidium guajava* L.) também apresentaram atividade anti-glicação em sistemas modelo contendo albumina (CHOI *et al*., 2008; PENG

et al., 2008; RUDNICKI *et al*., 2007; TSUIJI-NAITO *et al*., 2009; WU *et al*., 2009).

Os possíveis mecanismos de inibição da formação de produtos da reação de Maillard e/ou glicação baseiam-se na (1) captura de radicais livres gerados em estágios iniciais da reação, (2) bloqueio de grupos carbonílicos ou dicarbonílicos reativos provenientes de açúcares redutores, bases de Schiff ou produtos de Amadori, (3) quebra de proteínas ligadas (*cross-links*) e (4) bloqueio de receptores de AGEs (ZIEMAN e KASS, 2004; WU *et al*., 2011).

1.5 JUSTIFICATIVA

Há uma inter-relação entre as reações oxidativas, que envolvem compostos carbonílicos, formados pela reação de Maillard, e ambas alteram a estrutura e propriedades de açúcares, proteínas, lipídeos, vitaminas e DNA em alimentos e em sistemas biológicos.

O aumento do consumo de alimentos termicamente processados tem resultado em progressivo aumento da ingestão de PRM, cujas atividades biológicas não são bem conhecidas, embora se reconheça seu papel prejudicial com relação à diabetes e a insuficiência renal.

A pesquisa sobre extratos de plantas que possam ser consumidos de forma segura e que reduzam a formação de produtos da reação de Maillard em alimentos pode contribuir para a redução da ingestão de PRMs e

favorecer aspectos de prevenção relacionados às complicações à saúde causada por estes produtos.

1.6 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da adição de um extrato de erva-mate verde em sistemas modelo alimento na inibição da formação de produtos da reação de Maillard.

1.6.1 Objetivos Específicos

- Identificar e quantificar os compostos presentes no extrato etanólico de erva-mate;
- Avaliar se o extrato etanólico de erva-mate em sistemas modelo contendo lactose e caseína, com ou sem lipídios, é capaz de diminuir o teor de furosina, hidroximetilfurfural, carboximetilisina e produtos fluorescentes;
- Avaliar se o extrato etanólico de erva-mate em sistemas modelo contendo farinha de trigo é capaz de diminuir o teor de furosina, hidroximetilfurfural, carboximetilisina e produtos fluorescentes.

1.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ames J.M. Control of the Maillard reaction in food systems. Trends Food Sci. Technol. 1990; 1: 150–154.

Ames JM. Determination of Nε-(Carboxymethyl)lysine in Foods and Related Systems – Ann. N.Y. Acad. Sci. 2008;1126: 20-24.

Ameur L A, Mathieu O, Lalanne V, Trystram G, Birlouez-Aragon I. Comparison of the effects of sucrose and hexose on furfural formation and browning in cookies baked at different temperatures. Food Chem. 2007; 101: 1407-1416.

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

Anesini C, Ferraro G, Filip R. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. Food Chem. 2005; 97: 459-464.

Ardestani A, Yazdanparast R. *Cyperus rotundus* suppresses AGE formation and protein oxidation in a model fructose-mediated protein glycoxidation. Int. J. Biol. Macromol. 2007; 41: 572-578.

Baltes W. Chemical changes in food by the maillard reaction. Food Chem. 1982; 9: 59-73.

Barbosa JHP; Oliveira SL; Seara LTO. Papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. Arq. Bras. Endocrinol. Metab. 2008; 52(6): 940-950.

Barbosa, JHP; Oliveira, Sl; Seara, LT. Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. Rev. Nutr. 2009; 22(1),113-124.

Bastos DHM, Fornari AC, Queiroz YS, Soares RAM, Torres EAFS. The Chlorogenic Acid and Caffeine Content of Yerba Maté. Acta Farmaceutica Bonaerense. 2005; 24 : 95-5.

Bastos DHM, Fornari AC, Queiroz YS. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) leaves. Braz. Arch. Biol. Tech. 2006; 49: 399-404.

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

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

Birlouez-Aragon I, Sabat P, Gouti N. A new method for discriminating milk heat treatment. Int. Dairy J. 2002; 12: 59-67.

Bravo L; Lecumberri E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis* StHill) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. Food Res. Int. 2007; 40: 393-405.

Cai W, He JC, Zhu L, Chen X, Wallenstein S, Striker GE, Vlassara H. Reduced oxidant stress and extended lifespan in mice exposed to a low glycotoxin diet. Am. J. Pathol. 2007; 170:1893-1902.

Cai W, He JC, Zhu L, Chen X, Zheng F, Striker GE, Vlassara H. Oral glycotoxins determine the effects of calorie restriction on oxidant stress, AGE-related diseases, and lifespan. Am. J. Pathol. 2008; 173:327-336.

Carini M, Facino RM, Aldini G, Calloni M, Colombo L. Characterization of phenolic antioxidants from maté (*Ilex paraguariensis*) by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 1998; 12: 1813-1819.

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. Agric. Food Chem. 2007b; 55: 4532-4539.

Choi SY, Jung SH, Lee HS, Park KW, Yun BS, Lee KW. Glycation inhibitory activity ad the identification of an active compound in *Plantago asiatica* extract. Phytotherapy Res. 2008; 22: 323-329.

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

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

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, Alegría A, Courtois G, Farré R. High-performance liquid chromatographic determination of Maillard compounds in store-brand and name-brand ultra-high-temperature-treated cow`s milk. J. Chromatogr. 2000; 881: 599-606.

Filip R, López P, Gilberti G, *Coussio J, Ferraro G*. Phenolic compounds in seven South American Ilex species. Fitoterapia. 2001; 72: 774-778.

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

Gerrard JA. Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. Trends Food Sci Tech. 2002; 13(12): 391–399.

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. Mutation 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.

Gnoatto SC, Schenkel, EP, Bassani VL. HPLC Method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. J. Braz. Chem. Soc. 2005; 16 (4): 723-726.

Goldberg T, Cai W, Peppa M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, Vlassara H. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. J. Am. Diet. Assoc. 2004;104: 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.

Gugliucci A, Bastos D H M, Schulze J, Souza M F F. Caffeic an chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitory of AGE geration by methylglyoxal in model proteins. Fitoterapia. 2009; 1-6.

Gugliucci A, Menini T. The botanical extracts of Achyrocline satureoides and Ilex paraguariensis prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III. Life Sci. 2002; 72, 279–92.

Gugliucci A. Glycation as the glucose link to diabetic complications. JAOA. 2000;100: 621-634.

Gul A, Rahman MA, Salim A, Simjee SU. Advanced glycation end products in senile diabetic and nondiabetic patients with cataract. J. Diabetes Complicat. 2009; 23(5): 343-348.

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

Hull GLJ, Woodside JV, Ames JM, Cuskelly GJ. Ne-(carboxymethyl)lysine content of foods commonly consumed in a Western style diet. Food Chem. 2012; 131: 170–174.

Jandeleit-Dahm K A, Lassila M, Allen T J. Advanced glycation end product in diabetes-associated atherosclerosis and renal disease. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2005; 1043: 759-766.

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. Proc. Natl. Acad. Sci. 1997; 94: 6474-79.

Krautwald M, Münch G. Advanced glycation end products as biomarkers and gerontotoxins – A basis to explore methylglyoxal-lowering agents for AlzheimerTs disease? Experimental Gerontology. 2010; 45: 744–751

Lin R, Choudhury R P, Cai W, Lu M, Fallon J T, Fisher E A, Vlassara H. Dietary glycotoxins promote diabetic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Atherosclerosis. 2003; 168: 213-220.

Lin CL, Huang CC, Yu CC, Yang HY, Chuang, FR Yang, CW. 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.

Lunceford, N, Gugliucci, A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than gree tea. Fitoterapia. 2005; 76:419-427.

Mahajana N, Malika N, Bahlb A, Dhawana V. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and its inflammatory ligand EN-RAGE in non-diabetic subjects with pre-mature coronary artery disease. Atherosclerosis, 2009; 207: 597–602.

Manzocco L; Calligaris S; Mastrocola D; Nicoli MC; Lerici CR. Review of nonenzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. Trends Food Sci Tech. 2001; 11(9): 340–346.

Martinet A, Ndjoko K, Terreaux C, Marston A, Hostettmann K, Schutz YNMR. NMR and LC-MSn characterization of two minor saponins from Ilex paraguariensis. Phytochemical Analysis. 2001; 12: 48-52.

Mazzafera P. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. Food Chem. 1997; 60: 67-71.

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

Montagnani M. Diabetic cardiomyopathy: how much does it depend on AGE? Br. J. Pharmacol. 2008; 154: 725–726.

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

Munch G. Thome J, Foley P, Schinzel R, Riederer P. Advanced glycation endproducts in ageing and Alzheimer's disease. Brain Res. Rev. 1997; 23: 134–143.

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

Nożyński J, Zakliczyński M, Konecka-Mrówka D, Przybylski R, Zembala M, Zielińska T *et al.* Advanced glycation end-products in myocardium-supported vessels: Effects of heart failure and diabetes mellitus. J Heart Lung Transplantat. 2011;30(5): 558-564.

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

Oliveira AF, Valente JG, Leite IC. Fração da carga global do diabetes mellitus atribuível ao excesso de peso e à obesidade no Brasil. Rev Panam Salud Publica. 2010;27(5):338–44.

Peng X, Zheng Z, Cheng KW, Shan F, Ren GX, Chen F, Wang M. Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation end products. Food Chem. 2008; 106: 475-481.

Pires VS, Guillaume D, Gosmann G, Schenkel EP. Saponins from Ilex dumosa, an erva-maté (Ilex paraguariensis) adulterating plant. J. Agric. Food Chem. 1997; 45: 1027-1031.

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

Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. RAGE: therapeutic target and biomarker of the inflammatory response—the evidence mounts. J Leukoc Biol 2009; 86: 505– 12.

Robert L, Robert AM, Labat-Robert J. The Maillard reaction – Illicite (bio)chemistry in tissues and food. Pathol. Biol. 2011; 58: 214–219.

Rudnicki M, Oliveira M R, Perreira t V, Reginatto F H, Dal-Pizzol F, Morreira J C F. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. Food Chem. 2007; 100: 719-724.

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

Sandu O, Song K Y, Cai W J. Insulin resistance and type 2 diabetes in high-fat-fed mice are linked to high glycotoxin intake. Diabetes. 2005; 54(8): 2314-2319.

Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, Esposito C, Hegarty H, Hurley W, Clauss M, et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. J Biol Chem. 1992; 267(21):14987-97.

Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). Consenso Brasileiro sobre Diabetes 2002: diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito tipo 2. Rio de Janeiro: Diagraphic; 2003. Disponível em: diabetes.org.br/ educacao/docs/Consenso_atual_2002.pdf. Acessado em março de 2012.

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.

Stanimirova I; Boucon C; Walczaka B. Relating gas chromatographic profiles to sensory measurements describing the end products of the Maillard reaction. *Talanta*. 2011; 83(4): 1239–1246.

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.

Tang, DL et al. The receptor for advanced glycation end products regulates (rage) nuclear transcription factor kappa b (nf-kappa b) activation. Clinical Immunology. 2009; 131: 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.

Tessier, FJ. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation - Pathologie Biologie. 2010; 58: 214–219.

Tsuji-Naito K, Saeki h, Hamano M. Inhibitory effects of *Chrysanthemum* species extrtacts on formation of advanced glycation end products. Food Chem. 2009; 116: 854-859.

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. Geront. 2007a; 62 (4): 427-33.

Uribarri J, Cai W, Sandu O, Peppa M, Goldberg T, Vlassara H. Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. Ann. N. Y. Acad.Sci. 2005; 1043: 461-466.

Uribarri J, Stirban A, Sander W, Negrean M, Buenting CE, Koschinsky T, Vlassara H. Single oral challenge by advanced glycation end products acutely impairs endothelial function in diabetic and nondiabetic subjects. Diabetes Care. 2007b; 30(10):2579-82.

van Boekel MAJS. Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. Biotechnol Adv. 2006; 24: 230– 233.

Vishwanath V, Frank KE, Elmets CA, Dauchot PJ, Monnier VM. Glycation of skin collagen in type I diabetes mellitus. Correlation with long-term complications. Diabetes. 1986; 35(8): 916-21.

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

Vlassara H, Striker G. Glycotoxins in the diet promote diabetes and diabetic complications. Curr. Diabetes Rep. 2007; 7(3): 235-41.

Vlassara H, Uribarri J, Cai W, Striker G. Advanced glycation end product homeostasis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2008; 1126: 46-52.

Wang HY; Qian H; Yao WR. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. Food Chem. 2011; 128(3): 573–584.

Wang Z, Jiang Y, Liu N, Ren L, Zhu Y, An Y, Chen D. Advanced glycation end-product N^{ε}-carboxymethyl-Lysine accelerates progression of atherosclerotic calcification in diabetes. Atherosclerosis. 2012; 221(2):387-396.

Wild SH, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care. 2004; 27(5):1047-53.

Wirasathien L, Pengsuparp T, Suttisri R, Ueda H, Moriyasu M, Kawanishi K. Inhibitors of aldose reductase and advanced glycation ebd-products formation from the leaves of *Stelechocarpus cauliflorus* R.E.F. Phytomedicine. 2007; 14: 546-550.

Wu CH, Huang SM, Lin JA, Yen GC. Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs. Food Funct. 2011; 2(5): 224-34.

Wu JW, Hsieh CL, Wang HY, Chen HY. Inhibitory effects of guava (*Psidium guajava* L.) lea extracts and its active compounds on the glycation process of protein. Food Chem. 2009; 113: 78-84.

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.

Yamagishi S. Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. Experimental Gerontol. 2011; 46: 217–224.

Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Soluble RAGE: Therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging. Biochem Pharmacol. 2010; 79: 1379–1386.

Yu AN, Zhang AD. The effect of pH on the formation of aroma compounds produced by heating a model system containing L-ascorbic acid with L-threonine/L-serine. Food Chem. 2010; 119(1): 214–219.

Zeng Y; Zhang X; Guan Y; Yuanxia S. Characteristics and Antioxidant Activity of Maillard Reaction Products from Psicose-Lysine and Fructose-Lysine Model Systems. J Food Sci. 2011; 76(3): 398-403.

Zheng F, He C, Cai W, Hattori M, Steffes M, Vlassara H. Prevention of diabetic nephropathy in mice by a diet low in glycoxidation products. Diabetes Metab. Res. Rev. 2002; 18(3): 224-37.

Zieliński H, Amigo-Benavent M, Castillo Mdd, Horszwald A, Zielińska D. Formulation and baking process affect Maillard reaction development and antioxidant capacity of ginger cakes. J. Food Nutr. Res. 2010; 49(3): 140-148.

Zieman SJ, Kass DA. Advanced glycation endproduct crosslinking in the cardiovascular system: potential therapeutic target for cardiovascular disease. Drugs. 2004;64:459-470.

2. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*)

A *Ilex paraguariensis*, espécie popularmente conhecida como erva-mate, é nativa da América do Sul e tem sua área de ocorrência natural restrita. O Brasil é o maior produtor mundial com uma produção de 425.641 toneladas no ano de 2010 (FAO, 2012), sendo a região Sul do país a maior produtora do país, além de consumidora devido à tradição do chimarrão. A erva-mate é um produto constituído exclusivamente pelas folhas e ramos, das variedades de *Ilex paraguariensis*, na forma inteira ou moída obtidos por meio de tecnologia apropriada, segundo a legislação brasileira (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).

As folhas da erva-mate são utilizadas na preparação de bebidas consumidas em larga escala, no Paraguai, Uruguai, Argentina e Brasil na forma de chimarrão (infusão da erva com água quente servida em cuias), tererê (maceração da erva em água fria ou gelada) e chá-mate (infusão da erva-mate torrada).

As atividades farmacológicas e os benefícios a saúde associados a erva-mate são atribuídos a presença de xantinas (cafeína e teobromina), compostos fenólicos, principalmente os ácidos cafeoilquínicos (MAZZAFERA,1997; CARINI,1998; FILIP *et al.,* 2001; BASTOS *et al.,* 2005; BASTOS *et al*., 2006; BRAVO e LECUMBERRI, 2007), e saponinas (PIRES *et al.,* 1997; MARTINET *et al*., 2001; GNOATTO *et al*., 2005).

A presença de ácidos fenólicos na erva-mate foi relatada em 1935 quando Woodard e Cowland (apud ALI-KARIDIS, 1987) reportaram a presença de uma substância chamada de *coffetannin,* que quando hidrolisada, resultava em ácido cafeico.

Os ácidos clorogênicos pertencem à família dos ácidos cinâmicos que contém uma série de ácidos trans-cinâmicos em sua estrutura e são formados pela esterificação do ácido quínico com um dos seguintes ácidos trans-cinâmicos: o ácido cafeico (3,4-di-hidroxicinamico), o ferúlico (3-metoxi, 4-hidróxi), sinápico (3,5-dimetóxi, 4-hidróxi) ou o p-cumárico (4-hidróxi) (BASTOS *et al*., 2007a; BASTOS *et al*., 2007b). Mono e di-ésteres de ácido cafeico (ácidos cafeoilquínicos), ácido p-cumárico, ácidos p-cumaroilquínicos e ácido ferúlico (feruloilquínicos) são os principais ácidos fenólicos encontrados na erva-mate (BASTOS *et al*., 2007a; DUGO *et al.,* 2009). Os derivados de cafeoil (ácidos cafeoilquínicos) encontrados na erva-mate incluem o ácido cafeico, ácido clorogênico (ácido 5-O-cafeoilquínico), ácido neo-clorogênico, ácido crypto-clorogênico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico (FILIP *et al*., 2001; MEJÍA *et al*., 2010).

Cafeína (1,3,7-trimetilxantina) e teobromina (3,7-dimetilxantina) são alcalóides purínicos presentes nas plantas. Dentre estes compostos, a cafeína está presente em maior quantidade na erva-mate. GNOATTO *et al.* (2007) e REGINATTO *et al.* (1999) detectaram em amostras de erva-mate teores de cafeína de 0,8% e 0,6%, respectivamente, e de teobromina de 0,1%.

A cafeína está relacionada com efeitos estimulantes no sistema nervoso central, com funções cardíacas, renais e musculares. O efeito no sistema nervoso central melhora as atividades mentais (BOKUCAHA e SKOBELEVA, 1980; CONNOLLY e KINGSBURY, 2010; REVELLE *et al*., 2012). GLADE (2010) publicou em uma recente revisão que o consumo de cafeína não está relacionado apenas com atividades no sistema nervoso central mas também com aumento da disponibilidade de energia, aumento do gasto energético diário, diminuição da fadiga, melhora do desempenho físico, melhora do desempenho cognitivo, aumento da capacidade de concentração, aumento da memória a curto prazo, entre outros.

As saponinas são um grupo de compostos os quais são encontrados amplamente nas plantas, caracterizadas por apresentarem propriedades emulsificantes. Consistem em moléculas complexas com agliconas acopladas a cadeias glicosídicas que podem ser divididas em dois grupos segundo o tipo de aglicona: esteroidal ou triterpenóide. A erva-mate possui quantidades significantes de saponinas triterpenóides, sendo os ácidos ursólico e oleanólico os triterpenos mais comuns (BASTOS *et al.,* 2007b; OLESZEK e BIALY, 2006).

Diversas atividades biológicas vêm sendo atribuídas a erva-mate ao longo do tempo *(Ilex paraguariensis*) e questionamentos sobre a toxicidade do seu consumo são levantados, por isso, ANDRADE e colaboradores publicaram, em 2012, um estudo que avaliou a toxicidade de extratos aquosos de erva-mate em animais. Os animais foram expostos durante semanas a uma dose de extrato seco de 2 g kg^{-1} de peso. Os parâmetros

toxicológicos considerados foram sinais clínicos, peso corporal, alterações no consumo de água e comida, testes histopatológicos e hematológicos e exames macroscópicos dos órgãos. Os autores não encontraram alterações nos parâmetros toxicológicos devido a administração do extrato e concluíram que o consumo de erva-mate nas doses testadas é bem tolerado.

O objetivo deste capítulo foi caracterizar o extrato de erva-mate que foi adicionado nos sistemas modelos alimento quanto aos teores de compostos fenólicos, cafeína e sapogeninas.

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde cancheada (erva-mate submetida ao processo de sapeco, secagem, malhação, trituração e cancheamento), utilizada para preparação do extrato etanólico, foi obtida em mercado local, da marca Barão de Cotegipe, categoria Premium, embalada a vácuo, produzida na cidade de Barão de Cotegipe (RS) em março de 2011, do lote 0311A.

O extrato etanólico de erva-mate (Ex) foi obtido por processo de extração contínua a quente em aparelho Goldfish (Tecnal – TE 044). A relação massa de erva-mate/volume de etanol foi 5 g 100 mL^{-1} e o tempo de extração de 50 minutos, os quais foram estabelecidos por BASTOS *et al.* (2009). O etanol foi evaporado em rota-evaporador (BÜCHI – R 210), o extrato foi dissolvido em água e liofilizado para ser adicionado nos sistemas modelo alimento.

2.1.1 Caracterização do Extrato quanto aos Compostos Bioativos

A composição do extrato etanólico de erva-mate, quanto ao teor de compostos bioativos, foi caracterizada em relação ao teor de compostos fenólicos, cafeína e saponinas.

2.1.1.1 Compostos Fenólicos e Cafeína

As análises do perfil de compostos fenólicos e cafeína foram realizadas em cromatógrafo líquido Agilent modelo 1200 SL, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) e espectrômetro de massas com fonte de íons eletrospray à pressão atmosférica (API-ESI), modelo Agilent 6150, utilizando coluna Agilent Zorbax SB-C18 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm).

A fase móvel foi constituída de acido fórmico (Merck) 0,1% (v:v) em água deionizada (A) e metanol grau HPLC (Gold, CER Brasil) (B). O extrato foi evaporado, ressupendido em fase móvel e filtrado com filtro para seringa 0,22 µm (Millipore). A programação do gradiente foi a seguinte: 12% de B até 1,8 minutos, 12 - 30% B até 5 minutos, 30% de B de 5 a 13 minutos, retorno a 12% de B aos 14 minutos e mantendo por mais 7 minutos nesta condição para equilibrar a coluna. O fluxo de fase móvel foi de 320 µL min^{-1} e temperatura do forno mantida a 40°C. O volume de injeção foi de 3 µL.

As condições do espectrômetro de massas foram: voltagem na fonte de ionização ± 3000 volts, fluxo de gás nebulizador (nitrogênio) a 12 L min^{-1}, temperatura 350°C e pressão do nitrogênio a 30 psi. A análise dos compostos fenólicos foi realizada no modo de ionização negativo e a análise

de cafeína no modo positivo, na mesma corrida cromatográfica. Inicialmente foi realizada análise *scan* em ambos os modos e os íons mais abundantes de cada pico selecionados para análise do modo SIM (*single ion monitoring*).

A identificação do ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) e da cafeína foram realizadas com base no tempo de retenção, espectro de absorção UV e espectro de massas, em comparação com os padrões de referência. A identificação dos demais compostos fenólicos, sem padrão de referência, foi realizada pelos espectros de absorção UV (similaridade com espectro do 5-CQA superior a 90%) e de massas, com base nos resultados anteriormente descritos por BASTOS *et al.* (2007) e JAISWAL *et al.* (2010). A quantificação foi realizada pelo DAD, por meio de curva de calibração externa de 5 pontos com o padrão referência: cafeína a 272 nm (5 a 100 µg mL^{-1}, r=0,9999) e 5-CQA a 324 nm (50 a 100 µg mL^{-1}, r=0,9999). Os demais compostos fenólicos foram quantificados pela curva do 5-CQA e os resultados somados ao do 5-CQA para estimativa do teor de fenólicos totais.

A metodologia foi validada pelo detector de arranjo de diodos (DAD), utilizado para quantificação dos compostos do extrato. Foi determinada a repetibilidade e tempo de retenção do 5-CQA e da cafeína, por meio da análise de dez replicatas do extrato intra-dia (repetibilidade). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados com base nos parâmetros das curvas de calibração do 5-CQA e cafeína, conforme metodologia proposta pela ICH (*International Conference on Harmonisation*) e avaliada por RIBANI *et al.* (2004): LD= 3,3*(*s*/S) e LQ= 10*(*s*/S), sendo *s* o desvio padrão residual da curva de regressão e S o coeficiente angular.

2.1.1.2 Saponinas

As saponinas são caracterizadas pela presença de cadeias glicosídicas e agliconas triterpenóides ou esteroidais. A porção aglicona das saponinas presentes na erva-mate é composta, principalmente, por dois triterpenos, os ácidos ursólico e oleanólico (OLESZEK & BIALY, 2006). A extração dos triterpenos foi realizada segundo metodologia descrita por GNOATTO *et al*. (2005) com modificações. Foram evaporados 250 mL de extrato em rotaevaporador e o resíduo foi resuspendido em 100 mL água. O extrato aquoso ficou mantido em refluxo por 2 horas com 15 mL de HCl (4 M) a 135ºC para hidrólise das saponinas. Após esfriar, o extrato hidrolisado foi submetido a extração líquido-líquido com 50 mL de clorofórmio 4 vezes. O extrato clorofórmico foi evaporado e o resíduo foi redissolvido em 100 mL de acetonitrila. Alíquotas de 1 mL foram filtradas com filtro para seringa 0,22 µm (Millipore) e colocadas no vial para serem injetadas.

A determinação dos ácidos oleanólico e ursólico foram realizadas em cromatógrafo líquido Shimadzu modelo LC-20 AT equipado com injetor automático SIL-20AC, controlador CBM-20A, forno de coluna CTO-20A e detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A, utilizando a coluna ACE 5 C18 (250 x 4,0 mm, 5 µm).

A fase móvel foi isocrática constituída de acetonitrila grau HPLC (Gold, CER Brasil) e água deionizada (97:3). O fluxo da fase móvel foi de 1 mL min^{-1} e o volume de injeção foi de 20 µL.

A identificação dos ácidos oleanólico e ursólico foi realizada com base no tempo de retenção e espectro de absorção UV, em comparação com os padrões de referência. A quantificação foi realizada pelo DAD, por meio de curva de calibração externa de 5 pontos com o padrão referência: ácido oleanólico a 203 nm (20 a 200 µg mL^{-1}, r=0,9995) e ácido ursólico a 203 nm (20 a 200 µg mL^{-1}, r=0,9999).

Para validação da metodologia de análise dos ácidos ursólico e oleanólico determinou-se os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), a repetibilidade das áreas dos ácidos, por meio da análise de dez replicatas do extrato intra-dia e a recuperação. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados com base nos parâmetros das curvas de calibração dos ácidos, conforme metodologia proposta pela ICH (*International Conference on Harmonisation*) e avaliada por RIBANI *et. al* (2004): LD= 3,3*(*s*/S) e LQ= 10*(*s*/S), sendo *s* o desvio padrão residual da curva de regressão e S o coeficiente angular. A Recuperação é a relação entre o valor observado e o valor esperado de uma medição. Adicionou-se concentrações dos padrões ácido ursólico e oleanólico semelhantes às encontradas nas amostras (50 µg mL^{-1}).

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1 Compostos Fenólicos e Cafeína

Com base nos espectros de absorção UV e espectro de massas, foram identificados dez compostos fenólicos no extrato de erva-mate, sendo

três isômeros do ácido cafeoilquínico, três do ácido dicafeoilquínico, dois da cafeoil-glicose, o ácido feruloilquínico e a rutina. Não foram encontrados os ácidos caféico, ferúlico e *p*-cumárico nas formas livres. A identificação dos compostos é apresentada no cromatograma (Figura 6) e na Tabela 1.

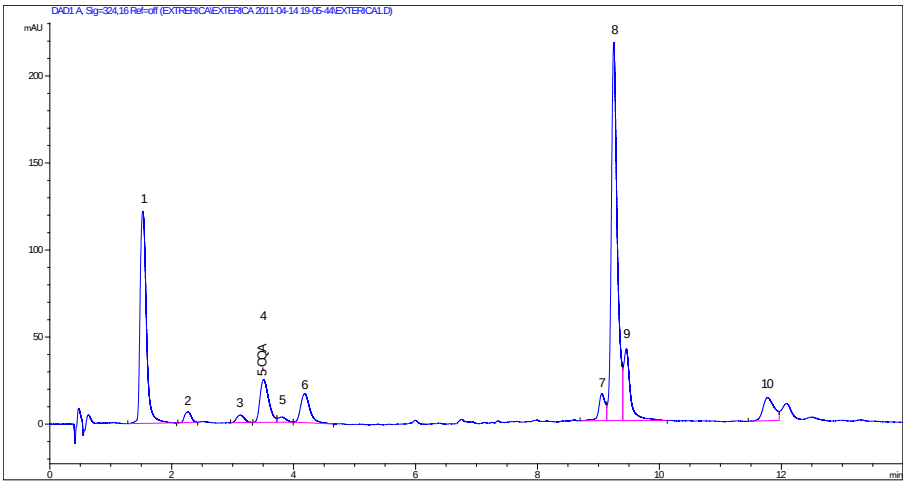


Figura 6 – Cromatograma CLUE-DAD (λ = 324 nm) com compostos fenólicos presentes no extrato de erva-mate.

1 e 6 - Isomero do ácido cafeoilquínico
2 e 3 - Cafeoil-glicose
4 - Isomero do ácido 5-cafeoilquinico,
5 - Ácido feruloilquinico
7, 8 e 10- Isomero do ácido di-cafeoilquinico
9 - Rutina

Tabela 1. Identificação dos compostos fenólicos do extrato de erva-mate por CLUE-ESI/MS no modo de ionização negativo

Pico	TR (min)*	Íon molecular (*m/z*)	Íon(s) produto (*m/z*)	Composto
1	1,5	353	191, 179	Isomero do ácido cafeoilquínico
2	2,2	341	179	Cafeoil-glicose
3	3,1	341	-	Cafeoil-glicose
4	3,5	353	191	Isomero do ácido 5-cafeoilquinico
5	3,8	367	193	Ácido feruloilquinico
6	4,2	353	179	Isomero do ácido cafeoilquínico
7	9,1	515	353	Isomero do ácido di-cafeoilquinico
8	9,3	515	353	Isomero do ácido di-cafeoilquinico
9	9,5	609	301	Rutina
10	11,8	515	353	Isomero do ácido di-cafeoilquinico

* TR = tempo de retenção em minutos (DAD)

O cromatograma com a identificação da cafeína está apresentado na Figura 7. A confirmação da identidade do composto no detector de massas foi realizada utilizando os íons com *m/z* 195 (molecular) e 138 (produto), no modo de ionização positivo.

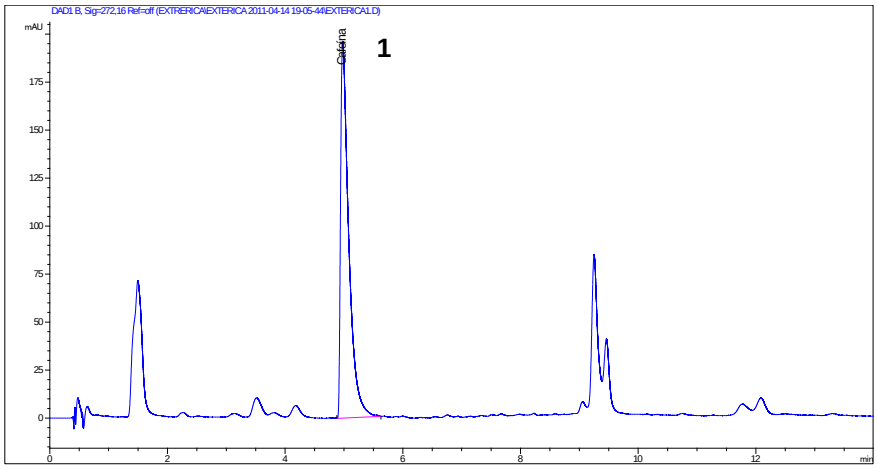


Figura 7 – Cromatograma CLUE-DAD (λ = 272 nm) com identificação da cafeína (1) presente no extrato de erva-mate

Na Tabela 2 estão apresentados os dados de validação do método de análise de ácidos fenólicos e cafeína.

Tabela 2. Parâmetros de validação do método analítico (CLUE-DAD) para caracterização do extrato de erva-mate

	5-CQA	Cafeína
Repetibilidade TR (CV%)	0,51	0,27
Repetibilidade Área do Pico (CV%)	1,35	0,06
Limite de Detecção (ng mL^{-1})	3,71	2,72
Limite de Quantificação (ng mL^{-1})	11,25	8,23

5-CQA - ácido 5-cafeoilquínico; TR - Tempo de Retenção; CV- Coeficiente de Variação

Segundo os parâmetros estabelecidos pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002), a repetibilidade das áreas e tempo de

retenção do 5-CQA e da cafeína estão em conformidade com o limite proposto para concentrações do analito na ordem de 1-10%.

Na Tabela 3, estão apresentados os resultados dos sólidos solúveis, da quantificação de compostos fenólicos e cafeína do extrato etanólico de erva-mate utilizado durante o desenvolvimento do trabalho.

Tabela 3. Concentração de sólidos solúveis, ácido 5-cafeoilquínico, fenólicos totais e cafeína no extrato etanólico de erva-mate (Ex)

	Sólidos Solúveis ($mg\ mL^{-1}$)	Compostos ($\mu g\ mg^{-1}$ Ex)			
		5-CQA	Outros Fenólicos	Fenólicos Totais	Cafeína
Ex* (n=3)	3,94 ± 0,07	11,03 ± 0,46	144,27 ± 5,72	155,30 ± 6,18	76,20 ± 2,93

* Médias ± desvio padrão, n= número de amostras analisadas
5-CQA - ácido 5-cafeoilquínico

A concentração de cafeína encontrada no extrato de erva-mate foi de 7,62%, valores superiores aos citados na literatura, que variam entre 2,40 e 5,00% (BASTOS *et al*., 2006). O teor elevado de cafeína no extrato pode ser justificado pelo método de extração com etanol em temperatura aproximadamente de 70ºC.

O extrato apresentou teor de cafeína maior que a concentração média de cafeína encontrada na erva-mate verde (1,00%) (ESMELINDRO *et al.,* 2002) .

O teor de 5-CQA presente no extrato deste trabalho foi de 11,03 µg mg^{-1} e de outros fenólicos de 144,27 µg mg^{-1}, o que equivale a uma concentração de fenólicos totais de 15,53%.

A concentração de fenólicos totais encontrada neste estudo foi maior que a encontrada por FILIP e colaboradores (2001) em amostras de extratos aquosos de erva-mate (9,60%), o que pode ser explicado por diferenças no método de extração, como a utilização de etanol, e na matéria-prima, como região de plantio com clima e solo diferentes.

BASTOS e colaboradores (2006) avaliaram os teores de 5-CQA em extratos aquosos de erva-mate verde (*Ilex paraguariensis*) em diferentes estágios de processamento de plantas de diferentes regiões. Os teores de 5-CQA encontrados nos extratos foram superiores (40 a 75 µg mg^{-1} de extrato) que o encontrado neste trabalho (11,03 µg mg^{-1} de extrato), o que pode ser explicado pela utilização de água na extração e por diferença na relação massa de erva-mate/volume de solvente.

O perfil de compostos encontrados no extrato obtido neste trabalho foi semelhante ao encontrado por ISOLABELLA e colaboradores (2010) em amostras de erva-mate. Os compostos identificados foram a cafeína, o flavonóide rutina e os ácidos fenólicos derivados do cafeoil (ácido cafeico e ácido clorogênico). Também se detectou os ácidos 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico.

Derivados de ácidos cafeoilquínico também foram identificados em amostras de erva-mate (*Ilex paraguariensis)* por FILIP *et al.* (2001). Os

extratos aquosos de erva-mate apresentaram os ácidos 5-cafeoilquínico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico. O teor de 5-CQA encontrado foi 28 µg mg^{-1} de extrato.

No presente trabalho podemos observar que a família dos ácidos clorogênicos é a mais abundante na erva-mate dos compostos fenólicos, sendo o 5-cafeoilquínico o mais comum, conforme já relatado na literatura (BASTOS *et al*., 2007a).

2.2.2 Saponinas

A identificação dos ácidos ursólico e oleanólico está apresentada na Figura 8.

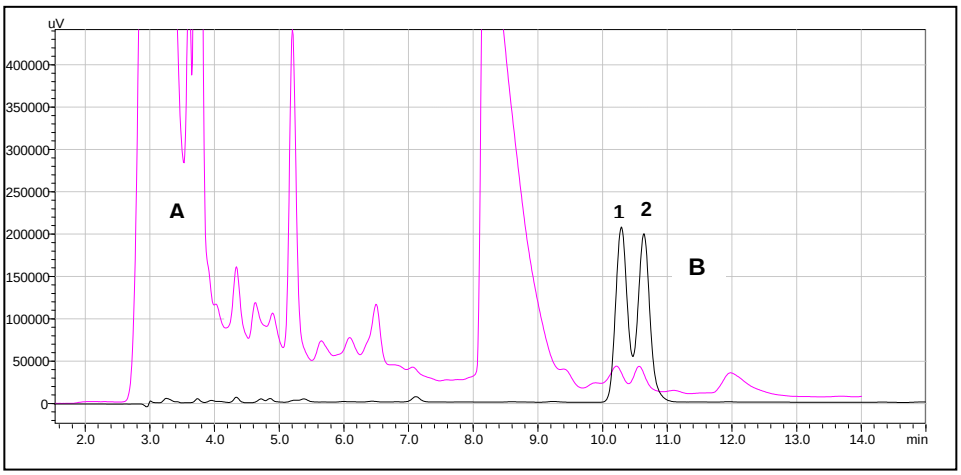


Figura 8 - Cromatograma CLAE-DAD (λ = 203 nm) com os picos dos ácidos oleanólico e ursólico presentes no extrato de erva-mate (A) e cromatograma dos padrões dos ácidos oleanólico (1) e ursólico (2) (B)

Os dados de validação do método estão presentes na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros de validação do método analítico para análise dos ácido ursólico e ácido oleanólico

	Ácido oleanólico	Ácido ursólico
Limite de Quantificação (µg mL^{-1})	26,14	11,90
Limite de Detecção (µg mL^{-1})	8,62	3,93
Repetibilidade (CV%)	2,69	2,39
Recuperação (%)	81,90	84,17

CV-Coeficiente de Variação

A Repetibilidade das áreas dos ácidos está dentro do limite estabelecido pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002) para concentrações do analito na ordem de 1-10%.

A porcentagem de recuperação para o ácido ursólico foi 84,17% e para o ácido oleanólico 81,90%, concentrações aceitáveis para a concentração de analito presente na amostra.

Na Tabela 5 estão apresentados os teores dos ácidos ursólico e oleanólico no extrato etanólico de erva-mate.

Tabela 5. Teores de triterpenos no extrato de erva-mate

	Sólidos Solúveis (mg mL^{-1})	Compostos (µg mg^{-1} Ex)		
		Ácido ursólico	Ácido oleanólico	Total
Ex* (n=3)	3,94 ± 0,07	4,90 ± 0,36	3,17 ± 0,31	8,07

* Médias ± desvio padrão, n= número de amostras analisadas

O teor de triterpenos encontrado no extrato foi 31,80 µg mL^{-1}. GNOATTO e colaboradores (2005) analisaram extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* e encontraram 352 µg de triterpenos por mL de extrato aquoso. O menor teor dos ácidos ursólico e oleanólico encontrado no presente trabalho pode ser explicado pela utilização de etanol na extração, as sapogeninas são mais solúveis em água, e pela diferença na relação massa de erva-mate/volume de solvente utilizada nos trabalhos.

GNOATTO e colaboradores (2008) identificaram em amostras de erva-mate teor de equivalentes à ácido ursólico de 100 mg g^{-1} de erva. O elevado teor de sapogeninas é explicado pela utilização de maceração como método de extração e matéria-prima de regiões de plantio diferente, o que pode interferir na composição da erva-mate.

2.3 CONCLUSÃO

As metodologias utilizadas para caracterização foram adequadas e permitiram a quantificação da cafeína (7,62%), ácidos fenólicos (15,53%) e triterpenos (0,81%) presentes no extrato que foi adicionado aos sistemas modelo alimento.

2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alikaridis F. Natural constituents of Ilex species. J Ethnopharmacol. 1987; 20(2): 121-144.

Andrade F, Albuquerque CAC, Maraschin M, Silva EL. Safety assessment of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) dried extract: Results of acute and 90 days subchronic toxicity studies in rats and rabbits. Food Chem Toxicol. 2012; 50: 328–334.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. Appendix D: guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Washington: AOAC, 2002.

Bastos DHM, Fornari AC, Queiroz YS, Soares RAM, Torres EAFS. The Chlorogenic Acid and Caffeine Content of Yerba Maté. Acta Farmaceutica Bonaerense. 2005; 24 : 95-5.

Bastos DHM, Fornari AC, Queiroz YS. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) leaves. Braz. Arch. Biol. Tech. 2006; 49: 399-404.

Bastos DHM, Massumi TK, Bombo AJ. Alcoholic e.g. raw Paraguay tea extract based nutrient natural antioxidant consists of a liposoluble highly active substitute for synthetic antioxidants. 2009; Patent Number: BR200604916-A.

Bastos DHM, Oliveira DM, Matsumoto RLT, Carvalho PO, Ribeiro ML. Yerba mate: Pharmacological properties, research and biotechnology. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology. 2007b; 1(1): 37-46.

Bastos, DHM, Saldanha LAS, Catharino RR, Sawaya ACHF, Cunha IBS, Carvalho PO, Eberlin MN. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. Molecules. 2007a; 12:423-432.

Bokuchava MA, Skobeleva NI. The biochemistry and technology of tea manufacture. Crit Rev Food Sci Nutr.1980;12(4):303-70.

Bravo L, Lecumberri E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis* StHill) amd its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. Food Res. Int. 2007; 40: 393-405.

Carini M, Facino RM, Aldini G, Calloni M, Colombo L. Characterization of phenolic antioxidants from maté (*Ilex paraguariensis*) by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 1998; 12: 1813-1819.

Connolly S, Kingsbury TJ. Caffeine modulates CREB-dependent gene expression in developing cortical neurons. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010; 397(2):152-156.

Dugo P, Cacciola F, Donato P, Jacques RA, Caramao EB, Mondello L. High efficiency liquid chromatography techniques coupled to mass spectrometry for the characterization of mate extracts. J Chromatography. 2009; 1216: 7213–7221.

Esmelindro MC, Toniazzo G, Waczuk A, Dariva C, Oliveira D. Caracterização físico-química da erva-mate: influência das etapas do processamento industrial. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2002; 22(2): 193-204.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em:. http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx. Acessado em maio de 2012.

Filip R, López P, Gilberti G, Coussio J, Ferraro G. Phenolic compounds in seven South American Ilex species. Fitoterapia. 2001; 72: 774-778.

Glade MJ. Caffeine-Not just a stimulant. Nutrition. 2010;26(10):932-938.

Gnoatto SC, Schenkel, EP, Bassani VL. HPLC Method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. J. Braz. Chem. Soc. 2005; 16 (4): 723-726.

Gnoatto SCB, Bassani VL, Coelho GC, Schenkel EP. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. ST.-HIL., AQUIFOLIACEAE). Quim. Nova. 2007; 30(2): 304-307.

Gnoatto SCB, , Dassonville-Klimpt A, Nascimento SD, Gale´ra P, Boumediene K, Gosmann G, Sonnet P, Moslemi S. Evaluation of ursolic acid isolated from *Ilex paraguariensis* and derivatives on aromatase inhibition. Eur J Med Chem. 2008; 43: 1865-1877.

Isolabella S, Cogoi L, López P, Anesini C, Ferraro G, Filip R. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. Food Chem. 2010; 122: 695–699.

Martinet A, Ndjoko K, Terreaux C, Marston A, Hostettmann K, Schutz YNMR, (2001) NMR and LC-MS n characterisation of two minor saponins from Ilex paraguariensis. Phytochemical Analysis. 2001; 12: 48-52.

Mazzafera P. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. Food Chem. 1997; 60: 67-71.

Mejía EGL, Songa YS, Hecka CI, Ramírez-Maresb MV. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and *in vitro* inhibition of colon cancer cell proliferation. J Functional Foods. 2010; 2: 23–34.

Ministério da Saúde. Portaria nº 234, de 25 de março de 1998. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade para erva-mate. Diário Oficial da União. 26 mar 1998: Seção 1:7.

Oleszek W, Bialy Z. Chromatographic determination of plant saponins—An update (2002–2005). *J. Chrom. A*. 2006; 1112 (1,2):78-91

Pires VS, Guillaume D, Gosmann G, Schenkel EP. Saponins from *Ilex dumosa*, an erva-maté (Ilex paraguariensis) adulterating plant. J. Agric. Food Chem. 1997; 45: 1027-1031.

Reginatto FH, Athayde ML, Gosmann G, Schenkel EP. Methylxanthines accumulation in Ilex species - caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other Ilex species. J Braz Chem Soc. 1999; 10 (6): 443-446.

Revelle W, Condon DM, Wilt J. Caffeine. Encyclopedia of Human Behavior, Ed. 2ª, In: Ramachandran V, 2012. 423-429.

Ribani M, Bottoli CBG, Collins, CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Quím. Nova. 2004; 27(5): 771-780.

3. DESENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS MODELOS ALIMENTO E AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE PRODUTOS DA REAÇÃO DE MAILLARD

A utilização de sistemas modelos alimento para estudar a reação de Maillard tem sido amplamente discutida na literatura. A complexidade das reações químicas que ocorrem nos alimentos durante o aquecimento é o principal motivo pelo o qual os sistemas modelos têm sido utilizados para avaliar a cinética e os fatores que influenciam a reação.

Alimentos lácteos são produtos de extrema importância para a indústria de alimentos, apresentam excelente valor nutricional e são amplamente consumidos pela população. A reação de Maillard promove alterações no valor nutricional das proteínas, modifica as características sensoriais e propriedades funcionais de alimentos lácteos, portanto, avaliar a reação de Maillard nestes alimentos é de grande interesse para a comunidade científica (VAN BOEKEL, 1998; ROZYCKI *et al.,* 2010; GUAN *et al*., 2012).

Os sistemas lácteos permitem estudar a reação entre açúcares redutores e aminoácidos. O açúcar característico do leite é a lactose, um açúcar redutor que reage com o aminoácido lisina proveniente da caseína durante o processamento térmico e o armazenamento (AMES, 1992). Esta reação dá origem a fase inicial da reação e formação dos produtos de Amadori, cuja degradação leva a formação de produtos avançados da reação de Maillard. O 5-hidroximetil-2-furfural (HMF) é formado nos sistemas

lácteos via reação de produtos de Amadori e via isomerização e degradação da lactose (MORALES *et al*.,1997; MORALES e JIMÉNEZ-PÉREZ, 1998; MORALES *et al.,* 2000). A furosina (ε-*N*-2-furoilmetil-l-lisina) é formada durante a hidrólise ácida da lactuloselisina (ε–*N*-deoxilactose-l-lisina), um produto de Amadori, e é utilizada para avaliar a extensão do processamento térmico e da reação de Maillard em alimentos lácteos (RESMINI e PELLEGRINO, 1990; FERRER *et al*., 2000; BAPTISTA e CARVALHO, 2004). Os produtos fluorescentes são formados antes da formação de pigmentos escuros e nos sistemas lácteos são utilizados para monitorar o progresso da reação e a consequente formação de produtos avançados da reação de Maillard (MORALES *et al*., 1996a; ROZYCKI *et al*., 2010).

Segundo o Sindicato das Indústrias de Massas e Biscoitos no Estado de São Paulo (SIMABESP), o Brasil ocupa a 2ª posição de maior produtor mundial de biscoitos com o registro de 1.206 milhões de toneladas produzidas em 2009, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. Mesmo não sendo um alimento básico como o pão, os biscoitos são aceitos e consumidos por pessoas de qualquer idade. Em 2009, o SIMABESP registrou no ano um consumo de biscoitos per capita de 6,3 Kg.

A legislação de alimentos brasileira define biscoito como “os produtos obtidos pela mistura de farinha(s), amido(s) e ou fécula(s) com outros ingredientes, submetidos a processos de amassamento e cocção, fermentados ou não. Podem apresentar cobertura, recheio, formato e textura diversos” (ANVISA, 2005). O biscoito apresenta em sua formulação, principalmente, farinha de algum cereal, açúcar e gordura o que favorece

reações de degradação de açúcares durante o aquecimento. O escurecimento de biscoitos é resultado, principalmente, da reação de caramelização. Durante o aquecimento os açúcares são degradados e açúcares redutores são formados, os quais participam da reação de caramelização e da reação de Maillard reagindo com os aminoácidos presentes no meio. O principal produto formado durante o processamento térmico de biscoitos é o 5-hidroximetil-2-furfural que tem sido apontado como o melhor indicador de processamento de térmico deste alimento (AMEUR *et al.*, 2006; 2007; GÖKMEN *et al*., 2007; 2008). A carboximetilisina é outro produto da reação de Maillard utilizado para avaliar a intensidade da reação nestes alimentos e pode ser formada por diferentes vias nos biscoitos: via reação de glioxal (produto de oxidação de açúcares e de lipídios) com agrupamento amina livre e via oxidação da furosina (CHARISSOU *et al*., 2007; AMES, 2008; URIBARRI *et al*., 2010).

As modificações na qualidade dos alimentos devido a reação de Maillard são inúmeras, algumas desejáveis e outras indesejáveis. Portanto, deve-se otimizar os processos e buscar estratégias para encontrar o equilíbrio entre os efeitos desejáveis e indesejáveis da reação. As estratégias podem minimizar perdas nutricionais, melhorar o sabor, maximizar a produção de antioxidantes, minimizar alterações de cor, alterar a formação de produtos da reação de Maillard, diminuir a formação de fatores anti-nutricionais, entre outros efeitos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar se o extrato de erva-mate inibe a formação de produtos da reação de Maillard em sistemas modelo alimento de biscoito e lácteos.

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1 Modelos Lácteos

Foram elaborados dois modelos lácteos (Anexo 1), um com adição de lipídios (LL) e outro sem adição (L). As formulações dos modelos lácteos estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Composição dos sistemas modelos lácteos

Ingredientes (%)	Modelo lácteo	
	Sem Lipídios (L)	Com lipídios (LL)
Caseína	3,5	3,5
Lactose	4,5	4,5
Lipídios*	--	3,0
Água	92,0	89,0

* O creme de leite com teor de 25,33% de gordura foi adicionado nos sistemas como fonte de lipídio.

Cada sistema foi submetido a quatro tratamentos: sem processamento térmico (C), com processamento térmico a 121ºC por 30 minutos (CT), com adição de butil-hidroxi-tolueno (BHT), um aditivo alimentar com finalidade antioxidante, na concentração permitida pela legislação de alimentos 0,01% (B) (ANVISA, 1999) e com adição do extrato

etanólico de erva-mate na concentração 0,5% (E). Determinou-se a concentração do extrato de 0,5% a partir de testes preliminares que indicaram que concentrações menores que 0,5% não tiveram efeito na formação de produtos da reação de Maillard.

Considerando a caracterização do extrato de erva-mate apresentada no capítulo 2, a adição do extrato nos sistemas na concentração de 0,5% resultou na adição de 0,078% de fenólicos totais, 0,038% de cafeína, $2,45.10^{-3}$% de ácido ursólico e $1,58.10^{-3}$% de ácido oleanólico.

3.1.2 Modelo de Biscoito

O modelo de biscoito (B) foi formulado segundo o método 10-50D, descrito pela AACC (1995) com modificações. A formulação do biscoito está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7. Formulação dos sistemas modelo de biscoito

Ingredientes (%)	Modelo Biscoito
Farinha de trigo	53,68
Açúcar	24,07
Margarina	16,25
Fermento químico	1,20
Água destilada	4,29
Sal	0,51

Também foram feitos quatro tratamentos para o modelo de biscoito: sem processamento térmico (C), com processamento térmico a 210ºC por

10 minutos (CT), com adição de BHT, um aditivo alimentar com finalidade antioxidante, na concentração permitida pela legislação de alimentos 0,01% (B) (ANVISA, 1999) e com adição do extrato etanólico de erva-mate na concentração 0,5% (E).

Considerando a caracterização do extrato de erva-mate apresentada no capítulo 2, a adição do extrato nos sistemas na concentração de 0,5% resultou na adição de 0,078% de fenólicos totais, 0,038% de cafeína, $2,45.10^{-3}$% de ácido ursólico e $1,58.10^{-3}$% de ácido oleanólico.

Os biscoitos foram uniformizados nos seguintes parâmetros: diâmetro médio de 3,66 cm (± 0,15 cm) e espessura média de 0,40 cm (± 0,20 cm) medidos com paquímetro (Anexo 2).

A composição centesimal para cada tratamento foi determinada segundo métodos da AOAC (1995). O teor de carboidratos foi determinado por diferença.

3.1.3 Processamento Térmico

Modelos Lácteos

O processamento térmico dos tratamentos CT, B e E dos dois sistemas foram realizados em autoclave (Sanyo – MLS37511) por 30 minutos a 121ºC (± 2 ºC).

Os sistemas modelo foram preparados nos dias dos testes, autoclavados ao mesmo tempo e no mesmo equipamento. Todos os sistemas com aquecimento foram expostos as mesmas condições.

Modelo de Biscoito

Cada modelo de biscoito com aquecimento foi submetido a tratamento térmico em forno elétrico (Layr – Crystal) e aquecido a 210ºC por 10 minutos. Para evitar diferenças de aquecimento entre os tratamentos durante o forneamento monitorou-se a temperatura dentro do forno com um termostato digital modelo A80 (Add Therm) acoplado com um sensor de temperatura PT-100 e padronizou-se as posições dos tratamentos na forma dentro do forno assim como o número de fornadas, de modo que todos os tratamentos fossem expostos as mesmas condições de aquecimento.

3.1.4 Determinação dos produtos da reação de Maillard

3.1.4.1 Determinação de Furosina (FUR)

A análise foi realizada conforme o protocolo descrito na ISO 18329 com modificações. O sistema de biscoito (50 mg) e os sistemas lácteos (10 mL) foram hidrolisados com ácido clorídrico (10,6 M) por 23 horas a 110ºC em tubos rosqueados com atmosfera modificada por adição de nitrogênio e filtrados em filtro 0,45 µm. Deste filtrado foram coletados 500 µL e submetidos à extração de fase sólida (SPE), cartucho Bond Elut C18 (Varian Inc.) pré acondicionado com 5 mL de metanol e 10 mL de água. A amostra foi eluída com 3 mL de ácido clorídrico (3 M).

A determinação de furosina foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 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 (DAD).

A fase móvel utilizada foi 5 mM de heptano sulfonado de sódio incluindo, 20% de acetonitrila e 0,2% de ácido fórmico. A coluna utilizada foi Shim-Pack VP-ODS-2 (25 cm x 0,5 cm, com partícula de 5 µm, marca Shimadzu). A eluição foi isocrática, o fluxo de 0,8 mL min^{-1} e o volume de injeção foi de 20 µL. A identificação foi feita baseada na comparação com o tempo de retenção e espectro de absorção do padrão externo e a quantificação foi realizada por meio de padronização externa através de uma curva analítica de 5 pontos (1,5 a 50,0 µg mL^{-1}, r=1,000) elaborada com padrão puro furosina (Polypeptide, SC494) em comprimento de onda de 280 nm. Os resultados foram expressos em micrograma de furosina por grama ou mililitro de sistema.

Para validação do método determinou-se os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), a repetibilidade da área do pico da FUR, por meio da análise de dez replicatas dos sistemas intra-dia e a recuperação. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados com base nos parâmetros da curva de calibração do HMF, conforme metodologia proposta pela ICH (*International Conference on Harmonisation*) e avaliada por RIBANI *et al.* (2004): LD= 3,3*(*s*/S) e LQ= 10*(*s*/S), sendo *s* o desvio padrão residual da curva de regressão e S o coeficiente angular. Para determinar a recuperação, adicionou-se o padrão furosina na concentração de 3 µg mL^{-1} nos sistemas.

3.1.4.2 Determinação de Hidroximetilfurfural (HMF)

A determinação de HMF foi realizada de acordo com AMEUR e colaboradores (2006), com modificações. O sistema biscoito (1 g) e os sistemas lácteos (10 mL) foram homogeneizados com 2,5 mL e 5 mL de ácido tricloroacético (40%), respectivamente. As amostras foram agitadas por 5 minutos, centrifugadas 4500 g por 10 minutos a 4ºC, filtradas em filtro 0,45 µm e injetadas.

A determinação de HMF foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência 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 utilizada foi água acidificada com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila na proporção 95:5 (v:v). A coluna utilizada foi Shim-Pack VP-ODS-2 (25 cm x 0,5 cm, com partícula de 5 µm, marca Shimadzu). A eluição foi isocrática, o fluxo de 1,0 mL min^{-1} e o volume de injeção foi de 100 µL. A identificação foi feita baseada na comparação com o tempo de retenção e espectro de absorção do padrão externo e a quantificação foi realizada por meio de padronização externa por meio de curvas analíticas de 5 pontos elaboradas com padrão puro 5-hidroximetil-2-furfural (Fluka) (0,01 a 0,25 µg mL^{-1}, r=0,999 para sistemas modelo de biscoito e 0,5 a 10,0 µg mL^{-1}, r=1,000 para sistemas modelos láteos) no comprimento de onda de 280 nm. Os resultados foram expressos em micrograma de HMF por grama ou mililitro de sistema.

Para validação do método foram utilizados como parâmetros de validação os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), a repetibilidade da área do pico do HMF, por meio da análise de dez replicatas dos sistemas intra-dia e a recuperação. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados com base nos parâmetros da curva de calibração do HMF, conforme metodologia proposta pela ICH (*International Conference on Harmonisation*) e avaliada por RIBANI *et al.* (2004): LD=3,3*(*s*/S) e LQ= 10*(*s*/S), sendo *s* o desvio padrão residual da curva de regressão e S o coeficiente angular. Para avaliar a recuperação, foram adicionadas concentrações do padrão HMF semelhantes às encontradas nas amostras (0,1 µg mL^{-1} para o sistema de biscoito e 1 µg mL^{-1} para os sistemas lácteos).

3.1.4.3 Determinação de Carboximetilisina (CML)

A determinação de CML foi realizada conforme descrito por BOEHM *et al.* (2004). O teste utilizado foi o ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) baseado no anticorpo monoclonal anti-CML, um anticorpo especifico para N^{ε}-carboximetilisina (monoclonal 4G9 – Altheon Inc. Ramsey, NY, EUA). O ensaio é especifico para quantificação de CML. As amostras dos sistemas modelo de biscoito foram previamente incubadas com proteinase K para liberação da CML ligadas a cadeias de proteína. As amostras dos modelos lácteos foram liofilizadas e não foram digeridas com proteinase K devido a interferências da matrix.

A análise consiste em três etapas: (1) os antígenos Bi-BSA-AGE foram ligados a superfície da placa e os complexos não ligados à placa foram lavados, (2) as amostras e o padrão externo foram pipetados na placa, os anticorpos específicos para CML foram adicionados, os antígenos e a CML presente nas amostras competem pela ligação aos antígenos e os anticorpos não ligados são lavados, (3) adição do agente revelador (ABTS) e quantificação por espectrofotometria a 405 nm. A intensidade da cor é inversamente proporcional à concentração de AGE/CML.

3.1.4.4 Compostos Fluorescentes

A análise de produtos da reação de Maillard fluorescentes livres e totais (ligados a proteínas) foi realizada conforme descrito por MORALES e VAN BOEKEL (1997) com modificações para os modelos lácteos. Os sistemas modelo (5 mL) foram submetido à desproteinização com 5 mL de ácido tricloroacético (40%), centrifugados (13.000 g, por 10 minutos a 4ºC), filtrados (filtro 0,45 µm) e diluídos (1:3) para a análise de fluorescência livre. Para medição da fluorescência total, os sistemas foram hidrolisados com 3 mL da solução de enzima pronase E (1500 U mL^{-1} em solução 1 M de borato de sódio, pH 8,2) por 36 horas a 40ºC em banho com agitação, centrifugados (13.000 g, por 10 minutos a 4ºC), filtrados e diluídos (1:30).

Os produtos fluorescentes livres e totais presentes nos sistemas modelo de biscoito foram analisados conforme metodologia descrita por DELGADO-ANDRADE e colaboradores (2006) com modificações. Os sistemas modelo (500 mg) foram homogeneizados com 7 mL de água

deionizada com agitação vigorosa por 1 minuto. As amostras foram centrifugadas a 3000 g por 10 minutos a 4 ºC. O sobrenadante foi coletado e a extração foi realizada mais uma vez. O sobrenadante foi clarificado com 1 mL das soluções de Carrez I (ferrocianeto de potássio 15%) e Carrez II (acetato de zinco 30%) e centrifugado a 4500 g por 5 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi filtrado (0,45 µm) e diluído (1:3) com água destilada. Para análise da fluorescência total, os sistemas (100 mg) foram hidrolisados com 3 mL da solução de enzima pronase E (1500 U mL^{-1} em solução 1 M de borato de sódio, pH 8,2) por 36 horas a 40ºC em banho com agitação, centrifugados (13.000 g, por 10 minutos a 4ºC), filtrados e diluídos (1:10).

A fluorescência foi medida em comprimentos de onda de 347 nm de excitação e 415 nm de emissão em leitor de fluorescência de placa (Spectramax, M5, Molecular Devices). As medidas foram expressas em intensidade de fluorescência (IF) por grama ou mililitro de sistema. A linearidade da resposta fluorescente foi verificada com uma curva de 5 pontos de sulfato quinino ($1,95.10^{-3}$ a $5,10^{-1}$ µg mL^{-1}, r = 1,000).

3.2 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão. Para análise dos dados utilizou-se Análise de Variância (ANOVA) e o teste de *Tukey*, com nível de significância de 5%, para avaliar se houve diferença significativa entre os tratamentos dos sistemas modelo alimento em relação a formação dos produtos da reação de Maillard. Os testes estatísticos foram

realizados no programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 16.0.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Composiçao centesimal dos sistemas modelo de biscoito

Os resultados da composição centesimal dos sistemas modelo de biscoito estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Composição centesimal dos sistemas modelo de biscoito

	TRATAMENTOS			
	BC	BCT	BB	BE
Umidade (%)*	$20,49^{a} \pm 0,28$	$7,32^{b} \pm 0,14$	$6,92^{b} \pm 0,05$	$7,37^{b} \pm 0,04$
Proteínas (%)*	$6,00^{a} \pm 0,05$	$6,72^{b} \pm 0,11$	$6,76^{b} \pm 0,15$	$6,73^{b} \pm 0,17$
Lipídios (%)*	$10,62^{a} \pm 0,39$	$12,41^{b} \pm 0,07$	$12,45^{b} \pm 0,06$	$12,73^{b} \pm 0,12$
Carboidratos (%)*	$61,74^{a} \pm 0,52$	$72,11^{b} \pm 0,32$	$72,50^{b} \pm 0,32$	$71,83^{b} \pm 0,40$
Cinzas (%)*	$1,15^{a} \pm 0,02$	$1,44^{b} \pm 0,04$	$1,36^{b} \pm 0,04$	$1,35^{b} \pm 0,02$

* Médias ± desvio padrão, n=número de amostras analisadas = 3
Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p < 0,05$)
BC – Biscoito sem tratamento térmico
BCT- Biscoito com tratamento térmico
BB - Biscoito adicionado de BHT com tratamento térmico
BE - Biscoito adicionado de extrato de erva-mate com tratamento térmico

Os biscoitos com processamento térmico não apresentaram diferença significativa quanto aos teores de umidade, proteína, lipídios, carboidratos e cinzas.

A composição dos sistemas modelo de biscoito foi semelhante a composição apresentada em tabelas brasileiras de composição de alimentos, como a TACO (2011) e a TBCA-USP (versão 5.0).

Os tratamentos com aquecimento apresentam composição diferente do tratamento controle que não foi assado devido à maior umidade na massa crua.

3.3.2 Furosina (FUR)

Os dados de validação do método estão presentes na Tabela 9.

Tabela 9. Parâmetros de validação do método analítico para análise de furosina (FUR)

	FUR
Limite de Quantificação (µg mL^{-1})	4,10
Limite de Detecção (µg mL^{-1})	1,35
Repetibilidade Sistema Lácteo (CV%)	0,74
Repetibilidade Sistema Lácteo com Lipídios (CV%)	1,07
Recuperação Sistema Biscoito (%)	83,86
Recuperação Sistema Lácteo (%)	98,48
Recuperação Sistema Lácteo com Lipídios (%)	92,15

CV-Coeficiente de Variação

A repetibilidade das áreas da FUR está dentro do limite estabelecido pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002) de até 6% para as concentrações do analito encontradas nos sistemas modelo alimento.

A porcentagem de recuperação para os sistemas está dentro do limite estabelecido pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002) de 80-115%.

Na Figura 9 estão apresentados os cromatogramas do padrão de furosina (pico 1) e do tratamento controle com temperatura (BCT) do modelo de biscoito (A).

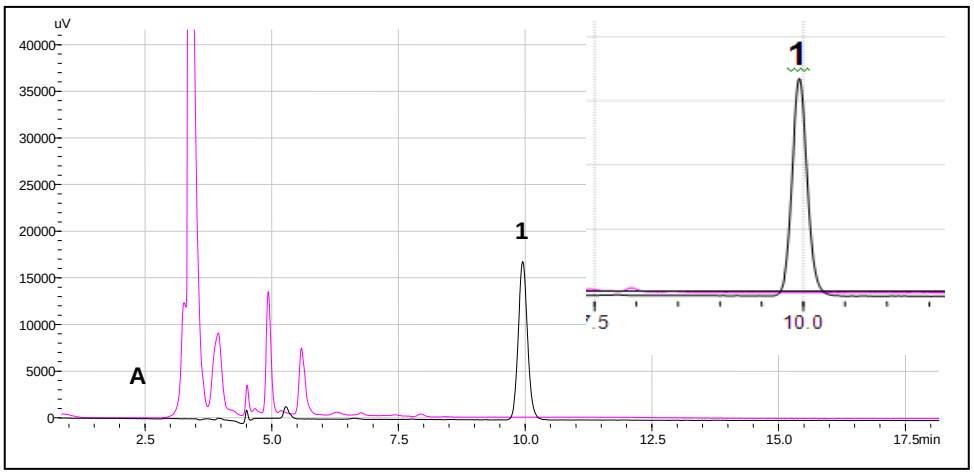


Figura 9 - Cromatograma CLAE-DAD (λ = 280 nm) dos sistemas modelo de biscoito (BCT) (A) e o pico do cromatograma do padrão furosina (1).

Não foi detectada furosina em nenhum tratamento dos sistemas modelo de biscoito (LD = 1,35 µg mL^{-1}) (Figura 9). O elevado teor de carboidrato na formulação do sistema não favorece a formação de furosina, o que justifica a não detecção de furosina neste modelo.

Considerando a furosina um indicador da reação de Maillard, os dados apresentados no presente trabalho indicam que a reação de Maillard

não é a reação mais relevante para o escurecimento deste alimento e sim a caramelização.

GÖKMEN e colaboradores (2008) avaliaram a formação de furosina como marcador térmico em biscoitos de diferentes composições de açúcares e agentes de crescimento. O biscoito formulado de forma semelhante ao do presente trabalho apresentou teor de furosina muito pequeno (5 mg Kg^{-1}) e menor que o do biscoito formulado com glicose (200 mg Kg^{-1}). Os autores consideraram a quantidade de açúcares redutores um fator limitante para o progresso da reação de Maillard e concluíram que a furosina não é um marcador fidedigno para avaliar a extensão do tratamento térmico mas sim um indicador para avaliar a disponibilidade de lisina e um índice de qualidade protéica.

Na Tabela 10, podem ser observados os teores de furosina nos sistemas modelo lácteos.

Tabela 10. Teores de furosina (FUR) nos sistemas modelo lácteos

TRATAMENTOS (n=3)	FUR (µg mL^{-1}) *
LC	$92,73^{a} \pm 2,94$
LCT	$178,89^{c,d} \pm 1,74$
LB	$181,03^{c,d} \pm 6,55$
LE	$169,14^{c} \pm 4,28$
LLC	$125,69^{b} \pm 4,27$
LLCT	$197,68^{e} \pm 3,10$
LLB	$191,58^{d,e} \pm 9,64$
LLE	$187,57^{d,e} \pm 0,82$

* Médias ± desvio padrão, n= número de amostras analisadas
Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$)

LC – Sistema Lácteo sem tratamento térmico; LCT- Sistema Lácteo com tratamento térmico; LB – Sistema Lácteo adicionado de BHT com tratamento térmico; LE - Sistema Lácteo adicionado de extrato de erva-mate com tratamento térmico
LLC – Sistema Lácteo com lipídios sem tratamento térmico; LLCT- Sistema Lácteo com lipídios com tratamento térmico; LLB – Sistema Lácteo com lipídios adicionado de BHT com tratamento térmico; LLE - Sistema Lácteo com lipídios adicionado de extrato de erva-mate com tratamento térmico

O processamento térmico dos sistemas modelo lácteos foi suficiente para que ocorresse a formação de furosina, os tratamentos sem aquecimento (LC e LLC) apresentaram teores de furosina significativamente menores ($p<0,05$) que os tratamentos com aquecimento (Tabela 10). O efeito do aquecimento na qualidade do leite ou sistemas lácteos são resultantes da interação entre agrupamentos amina, degradação de proteínas, insolubilização de proteínas do soro do leite, interação entre caseína e β-lactoglobulina e interação entre carboidratos e proteínas (FERRER *et al.*, 2000; BAPTISTA e CARVALHO, 2004; FEINBERG *et al.,* 2006; HILLER e LORENZEN, 2010).

Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos com aquecimento sem extrato (CT e LB) e com extrato (E) tanto para o modelo sem lipídios (L) como para o modelo com lipídios (LL), o que indica que a adição do extrato não influenciou a formação de furosina.

Os teores de furosina encontrados nos tratamento com aquecimento foram semelhantes aos teores encontrados por RESMINI e colaboradores (1990) e por FEINBERG e colaboradores (2006) em amostras de leites esterilizados.

Outros trabalhos que avaliaram a formação de furosina em leites encontraram teores menores que o presente trabalho pois as amostras foram submetidas a tratamentos térmicos mais brandos que o utilizado neste trabalho (FERRER *et al*., 2000; BAPTISTA e CARVALHO, 2004).

Na etapa inicial, a lactose e o agrupamento amina da lisina formam as bases de Schiffs que sofrem rearranjos formando os produtos de Amadori. A furosina é formada pela hidrólise ácida dos produtos de Amadori. Considerando que o extrato não alterou a formação de furosina nos sistemas lácteos, descarta-se a hipótese de atuação do extrato na etapa inicial da reação de Maillard.

3.3.3 Hidroximetilfurfural (HMF)

Os dados de validação do método estão presentes na Tabela 11.

Tabela 11. Parâmetros de validação do método analítico para análise do hidroximetilfurfural (HMF)

	HMF
Limite de Quantificação (µg mL^{-1})	0,02
Limite de Detecção (µg mL^{-1})	0,01
Repetibilidade Sistema Biscoito (CV%)	0,27
Repetibilidade Sistema Lácteo (CV%)	0,18
Repetibilidade Sistema Lácteo com Lipídios (CV%)	0,12
Recuperação Sistema Biscoito (%)	87,00
Recuperação Sistema Lácteo (%)	81,00
Recuperação Sistema Lácteo com Lipídios (%)	84,00

CV-Coeficiente de Variação

A Repetibilidade das áreas do HMF está dentro do limite estabelecido pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002) de até 8% para as concentrações do analito encontradas neste trabalho.

A porcentagem de recuperação para os sistemas está dentro do limite estabelecido pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002) de 75-120%.

AMEUR e colaboradores (2006) validaram a metodologia de análise de hidroximetilfurfural em biscoitos e encontraram 95% de recuperação, 0,18% de repetibilidade (CV) e 0,36 µg mL^{-1} de limite de detecção, resultados similares dos encontrados no presente trabalho.

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

Na Tabela 12, estão apresentados os teores de HMF nos sistemas modelo de biscoito.

Tabela 12. Teores de hidroximetilfurfural (HMF) nos sistemas modelo de biscoito

TRATAMENTOS (n=3)	HMF (µg g^{-1}) *
BC	$0,17^{a} \pm 0,00$
BCT	$1,21^{b} \pm 0,03$
BB	$1,26^{b} \pm 0,07$
BE	$1,15^{b} \pm 0,08$

* Médias ± desvio padrão, n=número de amostras analisadas
Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$)
BC – Biscoito sem tratamento térmico
BCT- Biscoito com tratamento térmico
BB - Biscoito adicionado de BHT com tratamento térmico
BE - Biscoito adicionado de extrato de erva-mate com tratamento térmico

Não se observou diferença significativa na formação de HMF entre os tratamentos com processamento térmico. A adição de extrato de erva-mate não influenciou a formação de HMF indicando que o extrato não modificou a degradação de açúcares, principal mecanismo de formação do HMF. Este resultado era esperado, pois não há indícios de que os componentes do extrato modifiquem a degradação de açúcares.

O baixo teor de HMF no tratamento sem aquecimento é justificado pelo fato de não ocorrer formação significativa de HMF em alimentos crus e frescos (RUFIAN-HENARES *et al*, 2009b; VORLOVA *et al*, 2006).

Os resultados apresentados no presente trabalho coincidem com os encontrados por AMEUR e colaboradores (2007) que avaliaram alterações

físicas e químicas em biscoitos durante o aquecimento e concluíram que o aumento de temperatura está relacionado com o aumento da degradação de açúcares, diminuição da atividade água e formação de hidroximetilfurfural.

Na Tabela 13, estão apresentados os teores de HMF nos sistemas modelo lácteos.

Tabela 13. Teores de hidroximetilfurfural (HMF) nos sistemas modelo lácteos

TRATAMENTOS (n=3)	HMF (µg mL^{-1}) *
LC	ND
LCT	$9,60^{c} \pm 0,30$
LB	$10,27^{c} \pm 0,79$
LE	$10,69^{c} \pm 0,15$
LLC	$0,07^{a} \pm 0,00$
LLCT	$9,25^{b} \pm 0,47$
LLB	$9,56^{b,c} \pm 0,39$
LLE	$10,24^{b,c} \pm 0,29$

* Médias ± desvio padrão, n= número de amostras analisadas
Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$)
ND – não detectado
LC – Sistema Lácteo sem tratamento térmico; LCT- Sistema Lácteo com tratamento térmico; LB – Sistema Lácteo adicionado de BHT com tratamento térmico; LE - Sistema Lácteo adicionado de extrato de erva-mate com tratamento térmico
LLC – Sistema Lácteo com lipídios sem tratamento térmico; LLCT- Sistema Lácteo com lipídios com tratamento térmico; LLB – Sistema Lácteo com lipídios adicionado de BHT com tratamento térmico; LLE - Sistema Lácteo com lipídios adicionado de extrato de erva-mate com tratamento térmico

Não foi detectado HMF no sistema lácteo sem aquecimento (LC), indicando que a formação de HMF depende, principalmente, de temperatura, fato já relatado por outros autores (MORALES *et al*., 1996b;

MORALES *et al*., 1998). O teor de HMF encontrado no sistema lácteo com lipídios sem aquecimento pode ser atribuído ao creme de leite, adicionado na formulação como fonte de lipídios, que sofre processamento térmico durante a produção.

O teste de HMF utilizado para avaliação do processamento térmico de leites é um bom parâmetro para avaliar a degradação da lactose durante o aquecimento (PATTON, 1950; MORALES *et al.,* 2000). Considerando a formulação dos sistemas lácteos, o HMF formado após o aquecimento é resultado, sobretudo, da degradação da lactose adicionada na concentração de 4,5%.

O extrato de erva-mate verde não interferiu a formação de HMF nos sistemas lácteos, os tratamentos com extrato (LE e LLE) não apresentaram diferença significativa em relação aos tratamentos sem extrato.

Visto que a formação do HMF depende, principalmente, da degradação de açúcares e não da reação de Maillard, reação na qual se espera que o extrato atue, o resultado observado (relativamente à ação do extrato de erva-mate sobre a formação de HMF nos modelos de biscoito e lácteos) está coerente.

3.3.4 Carboximetilisina (CML)

Na Tabela 14, estão apresentados os teores de CML encontrados nos sistemas modelo de biscoito.

Tabela 14. Teor de carboximetilisina (CML) nos sistemas modelo de biscoito

TRATAMENTOS (n=2)	CML (ng mg^{-1}) *	CML (ng mg^{-1} proteína) *
BC	$2,63^{a} \pm 0,06$	$43,80^{a} \pm 1,07$
BCT	$5,87^{c} \pm 0,01$	$87,31^{c} \pm 0,12$
BB	$5,82^{c} \pm 0,03$	$86,02^{c} \pm 0,48$
BE	$5,40^{b} \pm 0,05$	$80,25^{b} \pm 0,69$

* Médias ± desvio padrão, n= número de amostras analisadas
Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p<0,05$)
BC – Biscoito sem tratamento térmico
BCT- Biscoito com tratamento térmico
BB - Biscoito adicionado de BHT com tratamento térmico
BE - Biscoito adicionado de extrato de erva-mate com tratamento térmico

Os modelos adicionados do extrato de erva-mate (BE) apresentaram teores de CML significativamente ($p<0,05$) menores que os modelos com (BB) e sem o antioxidante sintético (BCT). A porcentagem de inibição da formação de CML foi de 8% em relação ao modelo controle com aquecimento (BCT).

O teor de CML encontrado no biscoito sem aquecimento pode ser explicado pela formação de CML durante o armazenamento.

Os teores de CML detectados em biscoitos citados na literatura variam de 5 a 35 ng mg^{-1} proteína (CHARISSOU *et al.*, 2007). A diferença entre valores na concentração de CML pode ser explicada por diferenças na formulação e no processamento térmico das amostras.

Nos biscoitos, a CML forma-se, principalmente, por meio da reação de produtos reativos de oxidação de açúcares e lipídios (glioxal, metilglioxal) com resíduos de aminoácidos, o extrato pode ter inibido a formação de CML comprometendo esta reação.

A CML é um indicador de estágios avançados da reação de Maillard utilizado para avaliar a formação de PRMs nos alimentos, portanto, considerando que o extrato diminuiu a formação de CML no sistema de biscoito, pode ser proposto que o extrato de erva-mate atuou na inibição da formação de produtos da reação de Maillard neste sistema.

Estratégias de redução da formação de produtos da reação de Maillard têm despertado interesse da comunidade científica e outros trabalhos também apresentaram resultados positivos na redução de PRMs em sistemas modelos.

SILVÁN e colaboradores (2011) encontraram em seu trabalho que a adição do ácido ferúlico na concentração de 0,25% em sistema modelo contendo proteína e frutose reduziu em 85% a formação de CML. A elevada porcentagem de redução pode ser explicada pela baixa temperatura (60ºC) em que os modelos foram submetidos.

SREY e colaboradores (2010) avaliaram o efeito da adição de rutina, α-tocoferol, ferúlico ácido, tiamina, monofosfato de tiamina e pirofosfato de tiamina em bolos na formação de carboximetilisina e carboxietilisina (CEL). Os bolos adicionados de ácido ferúlico, rutina, tiamina, monofosfato de tiamina e pirofosfato de tiamina apresentaram teores de CML menores.

Outros compostos como curcumina, flavonóides, terpenos e vitaminas, e extratos de plantas como *Rosmarinus officinalis*, *Camellia sinensis, Cinnamomum zeylanicum* , *Plantago asiatica*, *Apocynum venetum, Ginkgo biloba*, entre outros, também foram relacionados a diminuição da formação de produtos da reação de Maillard e/ou com atividade anti-glicação

em sistemas modelos (GUGLIUCCI e MENINI, 2002; LUNCEFORD e GUGLIUCCI, 2005; GUGLIUCCI e BASTOS, 2009; GUGLIUCCI *et al*., 2009; WU *et al*., 2011).

Os teores de CML presentes nos sistemas modelos lácteos estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Teor de carboximetilisina (CML) nos sistemas modelos lácteos

TRATAMENTOS (n=2)	CML (mg g^{-1}) *	CML (mg mL^{-1}) *	CML (mg g^{-1} proteína) *
LC	$1,66^{a}$ ± 0,05	$0,12^{a}$ ± 0,01	$3,57^{a}$ ± 0,11
LCT	$2,23^{b}$ ± 0,07	$0,17^{b}$ ± 0,01	$4,79^{b}$ ± 0,15
LB	$2,20^{b}$ ± 0,14	$0,17^{b}$ ± 0,01	$4,73^{b}$ ± 0,31
LE	$2,31^{b}$ ± 0,10	$0,17^{b}$ ± 0,01	$4,97^{b}$ ± 0,21
LLC	$1,78^{a}$ ± 0,02	$0,13^{a}$ ± 0,01	$3,83^{a}$ ± 0,04
LLCT	$2,17^{b}$ ± 0,14	$0,16^{b}$ ± 0,01	$4,66^{b}$ ± 0,29
LLB	$2,24^{b}$ ± 0,08	$0,17^{b}$ ± 0,01	$4,82^{b}$ ± 0,18
LLE	$2,17^{b}$ ± 0,07	$0,16^{b}$ ± 0,01	$4,67^{b}$ ± 0,14

* Médias ± desvio padrão, n= número de amostras analisadas
Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p<0,05$)
LC – Sistema Lácteo sem tratamento térmico; LCT- Sistema Lácteo com tratamento térmico; LB – Sistema Lácteo adicionado de BHT com tratamento térmico; LE - Sistema Lácteo adicionado de extrato de erva-mate com tratamento térmico; LLC – Sistema Lácteo com lipídios sem tratamento térmico; LLCT- Sistema Lácteo com lipídios com tratamento térmico; LLB – Sistema Lácteo com lipídios adicionado de BHT com tratamento térmico; LLE - Sistema Lácteo com lipídios adicionado de extrato de erva-mate com tratamento térmico

Os modelos lácteos sem aquecimento (LC e LLC) apresentaram teores de CML significativamente menores ($p<0,05$) que os modelos com aquecimento, porém, maiores que os relatados na literatura que variam de 0,56 mg g^{-1} proteína (ASSAR *et al.,* 2009) a 1,02 mg g^{-1} proteína (DRUSCH *et al*., 1999). A formação de CML nos modelos sem aquecimento pode ter ocorrido de forma mais intensa que o relatado na literatura devido ao

armazenamento, processo de liofilização das amostras e oxidação da furosina.

Os teores de CML dos modelos com aquecimento (LCT e LLCT), adicionados de BHT (LB e LLB) e de extrato de erva-mate (LE e LLE) foram significativamente maiores ($p<0,05$) que os modelos sem aquecimento mas não foram diferentes entre si, o que indica que o extrato não modificou a formação de CML nos sistemas lácteos nas condições de aquecimento proposta. O processamento térmico utilizado neste trabalho foi mais vigoroso que os processos utilizados para tratamento do leite, como o UHT e a pasteurização, o que explica os teores de CML elevados detectados nas amostras. A elevada formação de CML devido ao tratamento térmico pode ter prejudicado a atuação do extrato na reação de Maillard e a redução da formação de CML.

Leites submetidos a processamentos térmicos mais brandos que o aquecimento proposto neste trabalho apresentam teores de CML menores. Leites submetidos ao "*ultra-high temperature-UHT*" apresentaram de 0,029 a 0,046 mg g^{-1} proteína, segundo FENALLE *et al.* (2006), e 0,343 mg g^{-1} proteína, segundo DRUSCH *et al*. (1999), e o submetido a pasteurização apresenta, em média, 0,016 mg g^{-1} proteína (FENALLE *et al*., 2006; DRUSCH *et al*.,1999; ASSAR *et al*., 2009).

3.3.5 Compostos Fluorescentes

Estão apresentadas na Tabela 16 as intensidades fluorescentes dos produtos fluorescentes da reação de Maillard nos sistemas modelo de biscoito.

Tabela 16. Intensidade Fluorescente (IF) de produtos da reação de Maillard nos sistemas modelo de biscoito

IF	BC	BCT	BB	BE
IFL* (n=3)	1695,64[a] ± 62,73	2044,93[b] ± 32,61	2281,73[c] ± 54,11	2026,93[b] ± 41,65
IFT* (n=3)	14669,40[a] ± 967,99	24205,52[b] ± 1592,74	32465,02[c] ± 1726,78	25102,13[b] ± 942,59

* Médias ± desvio padrão, n= número de amostras analisadas
Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p < 0,05$)
IFL – Intensidade Fluorescente Livre por grama de biscoito
IFT - Intensidade Fluorescente Total por grama de biscoito
BC – Biscoito sem tratamento térmico
BCT- Biscoito com tratamento térmico
BB - Biscoito adicionado de BHT com tratamento térmico
BE - Biscoito adicionado de extrato de erva-mate com tratamento térmico

Segundo os dados apresentados, o processamento térmico de 210 ºC por 10 minutos foi suficiente para que ocorresse a formação de produtos da reação de Maillard, pois tanto a intensidade fluorescente livre quanto a total foram significativamente menores nos tratamentos sem aquecimento em relação aos tratamentos com aquecimento.

A adição do extrato de erva-mate na formulação dos biscoitos não influenciou a formação de produtos fluorescentes livre e totais, uma vez que, o tratamento com e sem adição de extrato não apresentaram diferença significativa.

Considerando a formulação do modelo de biscoito, o escurecimento é resultado, predominantemente, da degradação de açúcares, ou seja, da reação de caramelização, e provavelmente, por este motivo, o extrato não inibiu a formação de produtos fluorescentes.

A hipótese de atuação do extrato de erva-mate na inibição da formação de produtos da reação de Maillard propõe que o extrato atue na segunda fase da reação, a etapa de propagação, na qual produtos formados na etapa inicial propensos a oxidação e a geração de radicais livres levam a formação de compostos carbonílicos altamente reativos.

Na Tabela 17, estão apresentados os resultados de intensidade fluorescente dos sistemas modelo lácteo com e sem lipídios.

Tabela 17. Intensidade Fluorescente de produtos da reação de Maillard nos sistemas modelos lácteos

TRATAMENTOS	IFL * (n=3)	IFT * (n=3)
LC	$117,65^{a} \pm 4,01$	$4734,87^{a} \pm 364,36$
LCT	$211,91^{b} \pm 3,71$	$18007,03^{c} \pm 498,14$
LB	$219,13^{b} \pm 8,33$	$22169,21^{d} \pm 979,71$
LE	$210,20^{b} \pm 10,51$	$12415,07^{b} \pm 860,56$
LLC	$224,66^{b} \pm 3,50$	$9658,75^{b} \pm 287,86$
LLCT	$395,16^{d} \pm 10,78$	$30291,31^{e} \pm 71,57$
LLB	$394,30^{d} \pm 12,11$	$31597,58^{e} \pm 835,94$
LLE	$275,13^{c} \pm 15,14$	$22155,76^{d} \pm 1316,52$

* Médias ± desvio padrão, n= número de amostras analisadas
Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$)
IFL – Intensidade Fluorescente Livre por mililitro de sistema
IFT - Intensidade Fluorescente Total por mililitro de sistema
LC – Sistema Lácteo sem tratamento térmico; LCT- Sistema Lácteo com tratamento térmico; LB – Sistema Lácteo adicionado de BHT com tratamento térmico; LE - Sistema Lácteo adicionado de extrato de erva-mate com tratamento térmico; LLC – Sistema Lácteo com lipídios sem tratamento térmico; LLCT- Sistema Lácteo com lipídios com tratamento térmico; LLB – Sistema Lácteo com lipídios adicionado de BHT com tratamento térmico; LLE - Sistema Lácteo com lipídios adicionado de extrato de erva-mate com tratamento térmico

Sendo considerado um indicador de fase intermediária da reação de Maillard, o teste de compostos fluorescentes confirma a hipótese de atuação do extrato de erva-mate. O extrato de erva-mate inibiu a formação de compostos fluorescentes totais tanto no sistema sem lipídios (L) como no sistema com lipídios (LL), a intensidade fluorescente dos tratamentos com extrato (LE e LLE) foi significativamente menor que a intensidade dos tratamentos com aquecimento sem adição de extrato (LCT e LLCT), a porcentagem de inibição foi de 31% para o modelo sem lipídios (L) e de 27% para o modelo com lipídios (LL).

Em relação à adição do antioxidante sintético (BHT) não se observou inibição da formação de produtos da reação de Maillard, o que pode indicar que o efeito da adição do extrato encontrado pode ser atribuído ao perfil de compostos da erva-mate como ácido caféico, ácido 5-cafeoilquínico e o ácido ferúlico, e não a qualquer composto antioxidante.

O efeito anti-glicação da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) já foi reportado na literatura. Em 2005, LUCENFORD e GUGLIUCCI avaliaram atividade anti-glicação de extratos aquosos de erva-mate e chá verde (*Camelia sinensis*) empregando sistemas modelo no qual a albumina sérica bovina (BSA) foi incubada com metilglioxal. Foi concluído que o extrato aquoso de erva-mate exerce ação anti-glicação de maneira dose-dependente similar à ação da aminoguanidina, efeito atribuído a atividade antioxidante da erva-mate, extinguindo radicais livres. Os autores também observaram que a erva-mate não influenciou nas ligações cruzadas induzidas por compostos dicarbonílicos.

GUGLIUCCI e colaboradores (2009) avaliaram os efeitos anti-glicação de alguns compostos bioativos presentes na erva-mate, ácido cafeico, ácido 5-cafeoilquínico e ácido oleanólico, utilizando os sistemas modelo albumina sérica bovina e histonas de feto bovino. Os autores observaram que o ácido cafeico e o ácido 5-cafeoilquínico são responsáveis pela atividade anti-glicação da erva-mate.

Extratos de chá verde também apresentaram efeito inibitório da reação de Maillard. SCHAMBERGER e LABUZA (2007) adicionaram flavonóides de chá verde (epicatequina e epigalocatequina galato) em leite submetido ao tratamento térmico UHT (Ultra High Temperature). A adição destes compostos no leite reduziu o escurecimento durante o aquecimento e o armazenamento e não prejudicou a aceitação deste produto. Os autores observaram menor alteração de cor e redução da intensidade fluorescente das amostras tratadas com os flavonóides em relação as amostras controle.

Portanto, pode-se propor que o mecanismo de inibição da formação de produtos da reação de Maillard do extrato de erva-mate nos sistemas lácteos é o sequestro de radicais hidroxila e superóxido provenientes da etapa inicial da reação e/ou de produtos da oxidação de lipídios reduzindo a formação de compostos carbonílicos ou dicarbonílicos altamente reativos evitando a propagação da reação.

3.4 CONCLUSÃO

O extrato pode ser considerado um inibidor da formação de produtos da reação de Maillard em alimentos, permitindo o desenvolvimento de

produtos alimentícios com menores teores de produtos da reação de Maillard como alternativa para redução da ingestão destes produtos.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. 9 ed. Saint Paul: AACC, 1995.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 104, de 14 de maio de 1999. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 17 de maio de 1999.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos", Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 23 de setembro de 2005.

Ames JM. Determination of Nε-(Carboxymethyl)lysine in Foods and Related Systems – Ann. N.Y. Acad. Sci. 2008;1126: 20-24.

Ames JM. The Maillard reaction. In: Biochemistry of Food Proteins. Ed. B. J. F. Hudson, 1992: 99-153

Ameur L A, Mathieu O, Lalanne V, Trystram G, Birlouez-Aragon I. Comparison of the effects of sucrose and hexose on furfural formation and browning in cookies baked at different temperatures. Food Chem. 2007; 101: 1407-1416.

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

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis, 16th ed. Arlington, 1995.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. Appendix D: guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Washington: AOAC, 2002

Assar SH, Moloney C, Lima M, Magee R, Ames JM. Determination of Nε-(carboxymethyl)lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. Amino Acids. 2009; 36 (2): 317-326.

Baptista JAB, Carvalho RCB. Indirect determination of Amadori compounds in milk-based products by HPLC/ELSD/UV as an index of protein deterioration. Food Res Int. 2004; 37(8): 739–747.

Birlouez-Aragon I, Piscetsrieder M, Leclère J, Morales FJ, Hasenkopft K, Kientsch-Engel R, Ducauze CJ, Rutledge D. Assessment of protein glycation 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.

Charissou A, Ait-Ameur L, Birlouez-Aragon I. Evaluation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the quantification of carboxymethyllysine in food samples. J Chrom A. 2007;1140 (1): 189-194.

Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - CNNPA. Resolução n. 12, de 1978. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO. Alimentos e bebidas: 47 padrões de identidade e qualidade. São Paulo, 1978. 281 p

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

Drusch S, Faist V, Erbersdobler HF. Determination of Nϵ-carboxymethyllysine in milk products by a modified reversed-phase HPLC method. Food Chem. 1999; 65(4): 547-553.

Feinberg M, Dupont D, Efstathiou T, Louâpre V, Guyonnet JP. Evaluation of tracers for the authentication of thermal treatments of milks. Food Chem. 2006; 98(1): 188-194.

Fenaille F, Parisod V, Visani P, Populaire S, Tabet JC, Guy PA. Modifications of milk constituents during processing: a preliminary benchmarking study. Int Dairy J. 2006; 16 (7): 728–739.

Ferrer E, Alegría A, Courtois G, Farré R. High-performance liquid chromatografhic determination of Maillard compounds in store-brand and name-brand ultra-high-temperature-treated cow`s milk. J. Chromatogr. 2000; 881: 599-606.

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. Mutation Res. 2005; 580:41-52.

Gökmen V, Açar Ö Ç, Köksel H, Acar J. Effects of dough formula and baking conditions on acrylamide and hydroxymethylfurfural formation in cookies. Food Chem. 2007; 104(3): 1136-1142.

Gökmen V, Serpen A, Açar, ÖÇ, Morales FJ. Significance of furosine as heat-induced marker in cookies. J Cereal Sci. 2008; 48(3): 843-847.

Goldberg T, Cai W, Peppa M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, Vlassara H. Advanced Glycoxidation End Products in Commonly Consumed Foods. J. Am. Diet. Assoc. 2004;104: 1287-91.

Guan YG, Wang SL, Yu SJ, Yu SM, Zhao ZG. Changes in the initial stages of a glucose-proline Maillard reaction model system influences dairy product quality during thermal processing. J. Dairy Sci. 2012; 95(2):590–601.

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.

Gugliucci A, Bastos D H M, Schulze J, Souza M F F. Caffeic an chlorogenic acids in Ilex paraguariensis extracts are the main inhibitory of AGE geration by methylglyoxal in model proteins. Fitoterapia. 2009; 1-6.

Gugliucci A, Menini T. The botanical extracts of *Achyrocline satureoides* and Ilex *paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III. Life Sci. 2002; 72, 279–92.

Gugliucci A. Glycation as the glucose link to diabetic complications. JAOA. 2000;100: 621-634.

Hiller B; Lorenzen PC. Funcional properties of milk proteins as affected by Maillard reaction induced oligomerisation. Food Res Int. 2010; 43(4): 1155-1166.

ISO 18329:2004. Milk and milk products – Determination of furosine content- Ion-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography method.

Lunceford, N, Gugliucci, A Ilex paraguariensis extracts inhibit AGE formation more efficiently than gree tea. Fitoterapia. 2005; 76:419-427.

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

Morales FL, Jimenez-Perez S. Study of Hydroxymethylfurfural Formation from Acid Degradation of the Amadori Product in Milk-Resembling Systems. J. Agric. Food Chem. 1998; 46 (10): 3885–3890.

Morales FL, Romero C, Jimenez-Perez S. Characterization of industrial processed milk by analysis of heat-induced changes. Int. J. Food Sci. Technol. 2000; 35: 193–200.

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

Morales FL, Romero C, Jimenez-Perez S. Evaluation of heat-induced changes in Spanish commercial milk: hydroxymethylfurfural and available lysine content . Int J Food Sci Technol. 1996b; 31(5): 411-418.

Morales FL, Romero C, Jimenez-Perez S. Fluorescence associated with Maillard reaction in milk and milk-resembling systems. Food Chem. 1996a; 57(3):423-428.

Patton S. Studies of Heated Milk. I. Formation of 5- Hydroxymethyl-2-furfural. J. Dairy Sci. 1950; 33(5):324-328.

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

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

Ribani M, Bottoli CBG, Collins, CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Quím. Nova. 2004; 27(5): 771-780.

Rozycki SD, Buera MP, Piagentini AM, Costa SC, Pauletti MS. Advances in the study of the kinetics of color and fluorescence development in concentrated milk systems. J Food Engineer. 2010; 101: 59–66.

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. 2009a; 144:93-99.

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

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

Silván JM, Assar SH, Srey C, del Castillo MD, Ames JM. Control of the Maillard reaction by ferulic acid. Food Chem. 2011; 128(1): 208-213.

Srey C, Hull GL J, Connolly L, Elliott CT, del Castillo MD, Ames JM. Effect of Inhibitor Compounds on Nε-(Carboxymethyl)lysine (CML) and Nε-(Carboxyethyl)lysine (CEL) Formation in Model Foods. J Agric Food Chem. 2010; 58 (22): 12036–12041.

TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. NEPA – UNICAMP. 4ª ed. Campinas: NEPAUNICAMP, 2011.

TBCA-USP – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos da Universidade de São Paulo. [acesso em 7 maio 2012]. Disponível em: http:// www.fcf.usp.br/tabela/resultado.asp?IDLetter=A&IDNumber=54

Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, Yong A, Striker GE, Vlassara H. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. J Am Diet Assoc. 2010; 110(6):911-916.

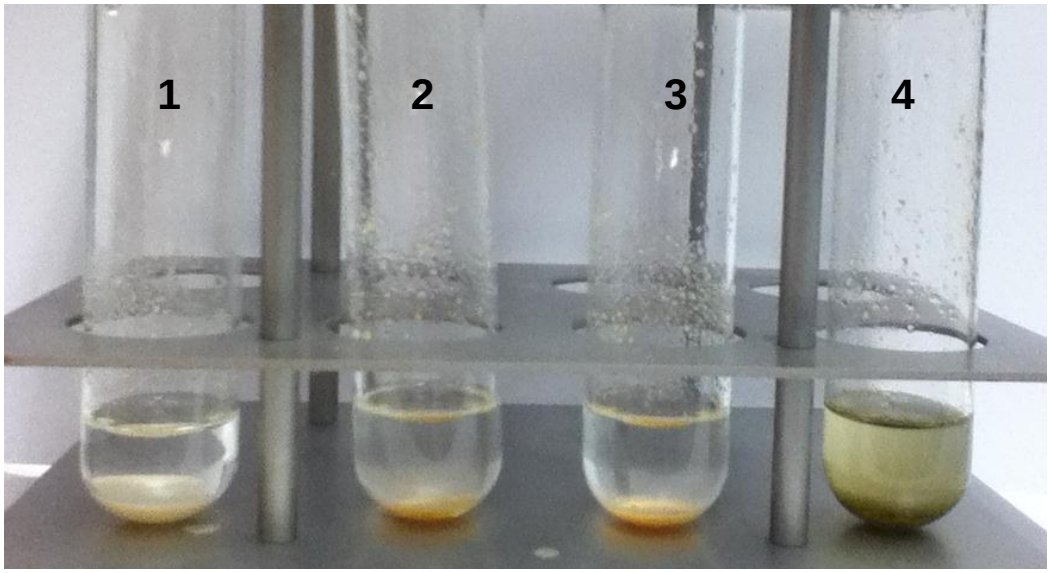
van Boekel MAJS. Effect of heating on Maillard reactions in milk. Food Chem. 1998; 62(4): 403-414.

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

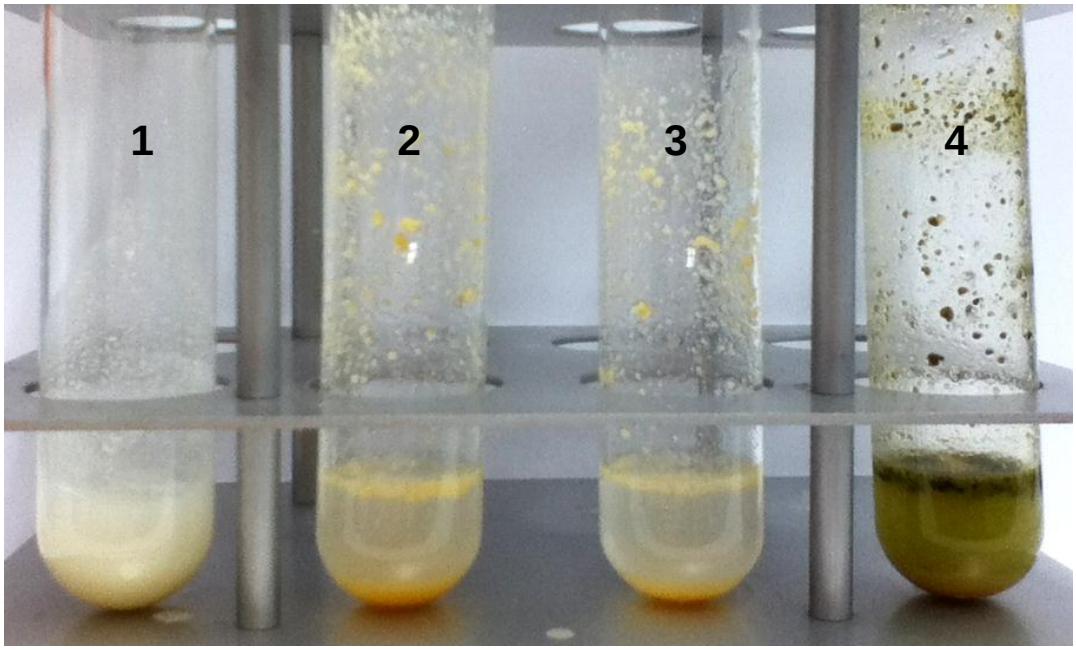
Wu CH, Huang SM, Lin JA, Yen GC. Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs. Food Funct. 2011; 2(5): 224-34.

ANEXO 1 – SISTEMAS MODELOS LÁCTEOS

SISTEMAS MODELO LÁCTEO SEM LIPÍDIOS



SISTEMAS MODELO LÁCTEO COM LIPÍDIOS

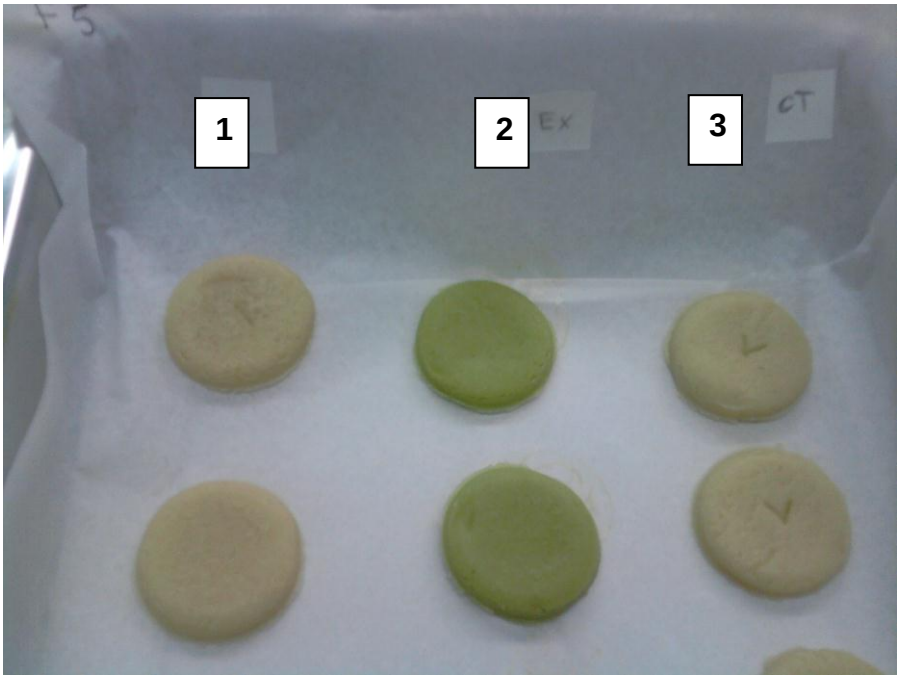


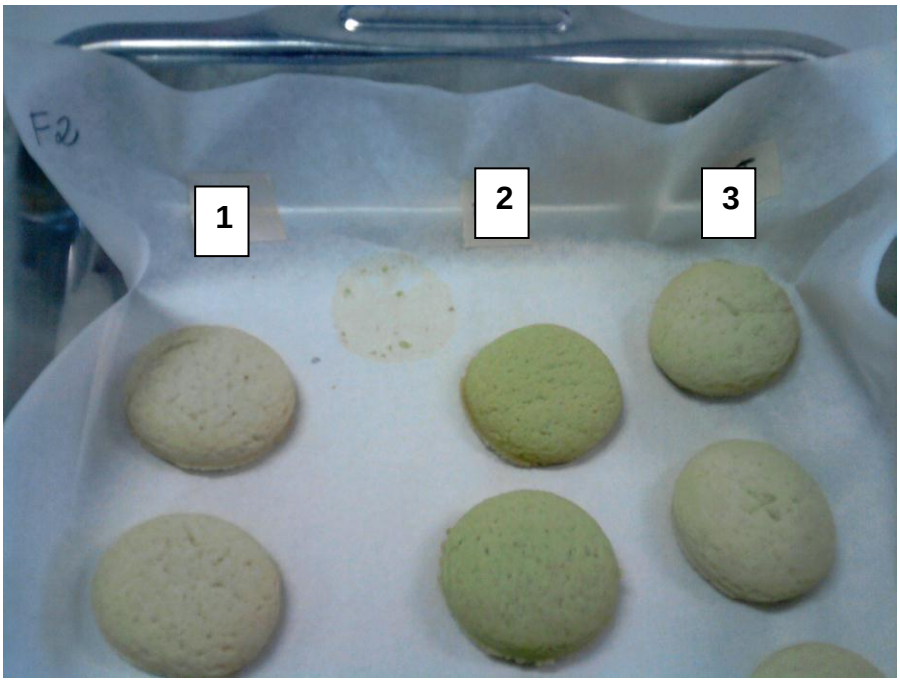
1- Tratamento sem aquecimento
2- Tratamento com aquecimento
3- Tratamento com aquecimento e adição de BHT
4- Tratamento com aquecimento e adição de extrato de erva-mate

ANEXO 2- SISTEMAS MODELO DE BISCOITO

1- Tratamento com aquecimento
2- Tratamento com aquecimento e adição de extrato de erva-mate
3- Tratamento com aquecimento e adição de BHT

SISTEMAS MODELO DE BISCOITO





1- Tratamento com aquecimento
2- Tratamento com aquecimento e adição de extrato de erva-mate
3- Tratamento com aquecimento e adição de BHT

ANEXO 3 - CURRÍCULOS LATTES

Erica de Lemos Ferreira Monaro

Possui graduação em Nutrição pela Universidade de São Paulo (2009). Atualmente mestranda do programa Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública, atuando na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos.
(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 15/03/2012

Endereço para acessar este CV:

http://lattes.cnpq.br/0646511907591868

Certificado pelo autor em 15/03/12

Dados pessoais

Nome	Erica de Lemos Ferreira Monaro
Nome em citações bibliográficas	FERREIRA, E. L.;Ferreira, E. L.;Ferreira, E.L.;MONARO,E.L.F.
Sexo	Feminino
Endereço profissional	Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição, FSP - USP. Avenida Doutor Arnaldo, 715 Cerqueira César 01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617748

Formação acadêmica/Titulação

2010
Mestrado em andamento em Nutrição em Saúde Pública .
Faculdade de Saúde Pública.
Título: INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE PRODUTOS DA REAÇÃO DE MAILLARD POR EXTRATO DE ERVA MATE (Ilex paraguariensis) EM SISTEMA MODELO ALIMENTO, *Orientador:* Deborah Helena Markowicz Bastos.

2005 - 2009
Graduação em Nutrição .
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Formação complementar

2010 - 2010
Prática Pedagógica no Ensino Superior. (Carga horária: 90h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2008 - 2008
II Oficina de Escrita Científica. (Carga horária: 32h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Deborah Helena Markowicz Bastos

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2

Graduada em Engenharia Agronômica 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 17/05/2012
Endereço para acessar este CV:
http://lattes.cnpq.br/2399624390092442

Certificado pelo autor em 17/05/12

Dados pessoais

Nome Deborah Helena Markowicz Bastos

Nome em citações bibliográficas Bastos, D.H.M.; Markowicz Bastos,D.H..;Bastos, D.M.;;Bastos, Deborah H. Markowicz

Sexo Feminino

Endereço profissional 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

2007 Livre-docência.
Faculdade de Saúde Pública -USP.
Título: Erva-mate (Ilex paraguariensis): compostos bioativos e funcionalidade,
Ano de obtenção: 2007.

2008 - 2008 Pós-Doutorado .
Touro University.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo ,FAPESP ,Brasil .
Grande área: Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Ciência de Alimentos.
Grande área: Ciências da Saúde / *Área:* Nutrição / *Subárea:* Alimentos Funcionais / *Especialidade:* Avaliação de atividade biológica de compostos bioativos de alimentos.