Universidade de São Paulo

FCF/FEA/FSP

**Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Nutrição
Humana Aplicada - PRONUT**

**Formação de produtos da reação de Maillard em carne bovina
(*Semimembranosus*) submetida a diferentes técnicas de cocção**

Aurea Juliana Bombo Trevisan

Tese para obtenção do título de Doutor

Orientadora: Profa. Dra. Deborah Helena
Markowicz Bastos

São Paulo
2015

Universidade de São Paulo

FCF/FEA/FSP

**Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Nutrição
Humana Aplicada - PRONUT**

Formação de produtos da reação de Maillard em carne bovina
(*Semimembranosus*) submetida a diferentes técnicas de cocção

Aurea Juliana Bombo Trevisan

Versão original

Tese para obtenção do título de Doutor

Orientadora: Profa. Dra. Deborah Helena
Markowicz Bastos

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Trevisan, Aurea Juliana Bombo
T814f Formação de produtos da reação de Maillard em carne bovina
(*Semimembranosus*) submetida a diferentes técnicas de cocção /
Aurea Juliana Bombo Trevisan. -- São Paulo, 2015.
97p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
USP. Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade da
USP. Faculdade de Saúde Pública da USP. Curso Interunidades
em Nutrição Humana Aplicada.

Orientador : Bastos, Deborah Helena Markowicz

1. Carne bovina : Ciência dos alimentos I. T. II. Bastos, Deborah
Helena Markowicz, orientador.

641.362 CDD

Aurea Juliana Bombo Trevisan

Formação de produtos da reação de Maillard em carne bovina
(*Semimembranosus*) submetida a diferentes técnicas de cocção

Comissão Julgadora
da Tese para obtenção do Título de Doutor

Prof. Dr. Deborah Helena Markowicz Bastos - orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2015.

Agradecimentos

À FAPESP pelo auxílio financeiro, processo 2012/00306-0

À CAPES pela bolsa de doutorado

À Profa. Dra. Deborah Helena Markowicz Bastos, pela oportunidade, por estar sempre receptiva às idéias e discussões e pelas orientações que muito enriqueceram esse trabalho

À Profa. Dra. Daniela Moura de Oliveira Beltrame pela ajuda inestimável com o funcionamento do detector de massas

À Profa. Dra. Geni Rodrigues Sampaio e à MSc. Rosana Manólio Soares pela prontidão em ajudar e sanar dúvidas em todas as etapas deste trabalho

Ao MSc. Daniel Temponi Lebre, do Centro de Espectrometria de Massas aplicada pelo auxílio com a interpretação dos resultados

À Profa. Dra. Adriana Pavesi Ariseto Bragotto, do Instituto de Tecnologia dos Alimentos (ITAL) pelas sugestões sobre a análise de acrilamida

À MSc Erica de Lemos Ferreira Monaro pelo auxílio com o funcionamento do HPLC, com as análises de fluorescência e furosina, e pela agradável companhia na bancada do laboratório

À Daniele de Almeida Lima, aluna de iniciação científica, pela simpatia sem fim e pela ajuda com as análises de compostos fluorescentes e determinação centesimal

Ao Dr. Frédéric J. Tessier, Institut Polytechnique LaSalle Beauvais, pela receptividade e esclarecimento das dúvidas sobre a análise de carboximetilisina

Ao Dr. Francisco J. Morales, Instituto del Frio, pelos apontamentos na análise de compostos fluorescentes

Ao frigorífico Minerva foods pela doação das peças de carne usadas nesse estudo, bem como por disponibilizar as informações de rastreamento dos animais

Ao SENAI Horácio Augusto da Silveira, em especial à professora Cristina Garcia, por disponibilizar o laboratório de análise sensorial.

Aos companheiros do laboratório: Erica Ferreira, Daniele, Lucile, Simone, Camila, Bianca, Cintia, Luciana, Daniela, Thaise, Erica, Mariana, Marcelo, Nara, Jessica, Tássia, Amanda e Gustavo pela amizade, apoio, carinho, por tantos momentos de descontração, cafés, bolos e doces.

Aos secretários do PRONUT – Irineu Ruel de Oliveira, Miriam Wrigg, Edilson Feitosa pela simpatia e gentileza.

Aos funcionários do departamento de Nutrição da FSP/USP pela prontidão em ajudar, sempre!

À Flavio Trevisan, meu marido, pelo apoio incondicional, inclusive nas correções da tese, pelo amor, carinho e por acreditar nos nossos sonhos

À Ildaci Trevisan pelo apoio incondicional, pelas palavras de incentivo, pela presença constante e pela preciosa ajuda.

A todos que ajudaram de alguma forma para que esse trabalho fosse realizado.

RESUMO

TREVISAN, A. J. B. **Formação de produtos da reação de Maillard em carne bovina (*Semimembranosus*) submetida a diferentes técnicas de cocção.** 2015. 97f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O consumo de produtos da reação de Maillard (PRM) formados em alimentos contribui para o aumento dos níveis séricos de produtos finais de glicação avançada, que, por sua vez, estão associados à fisiopatologia e progressão do diabetes, de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. A formação de PRM em alimentos e sistemas modelo-alimento está bem documentada, mas informações sobre os efeitos de diferentes métodos de cocção e uso de receitas são escassas, especialmente para carne vermelha. É importante avaliar se o controle das condições de cocção domésticas pode afetar a formação de PRM em carne, um alimento amplamente consumido. O objetivo deste trabalho foi estudar a formação dos PRM: furosina, carboximetilisina, acrilamida e compostos fluorescentes em carne bovina submetida a técnicas de cocção por calor úmido e calor seco. Hambúrgueres com 50 g de coxão mole (*Semimembranosus*) moído e 1% de sal de cozinha foram grelhados e empanados e fritos até atingir as temperaturas internas: 60^o, 70^o, 80^o, 90^o e 100^oC; cozidos por fervura em água até 60^o, 70^o, e 80^oC; e assados a 180^o, 240^o e 300^oC por 30 min. Os produtos da fase inicial da RM predominaram nas carnes grelhadas e empanadas e fritas em temperatura menor que 90^oC, acima de 90^oC ocorreu a degradação de furosina, associada à formação acentuada de compostos fluorescentes e a etapa intermediária da RM está em curso, predominantemente; a formação do marcador da fase avançada da RM (CML) ocorreu apenas na condição térmica mais severa, a carne assada a 300^oC por 30 minutos. Condições de cocção que resultaram em grande aceitação da cor e baixa formação de PRM de fase avançada foram encontradas para carne bovina e podem ser utilizadas em orientações para pacientes com diabetes em ensaios clínicos futuros.

Palavras-chaves: carne bovina, reação de Maillard, furosina, acrilamida, carboximetilisina, compostos fluorescentes

ABSTRACT

TREVISAN, A. J. B. **Influence of home cooking conditions on Maillard reaction products in beef (*Semimembranosus*)**. 2015. 97f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The ingestion of Maillard reaction products (MRP) from foods seems to be correlated with serum advanced glycation end products (AGEs) levels in humans. AGEs are associated with pathological effects *in vivo*, specifically diabetes complications, cardiovascular and neurodegenerative diseases. Substantial amount of data about MRP content in individual food products and model systems can be found, but there is a lack of information regarding the MRP generation during home cooking, especially for red meat. It is of interest to evaluate whether the control of home cooking conditions can effectively affect MRP content in beef, a food consumed worldwide. The influence of home cooking methods employing dry-heat and boiling on the generation of furosine, carboxymethyllysine, acrylamide and fluorescent compounds in beef was investigated in this study. Fifty grams of raw ground meat (*Semimembranosus*) with 1.0% of NaCl was made into a hamburger shape and grilled or breaded and fried: meat was cooked to an internal temperature of 60^o, 70^o, 80^o, 90^o and 100^oC; boiled: meat was cooked to 60^o, 70^o, and 80^oC. For baking, the oven was set at 180^o, 240^o and 300^oC for 30 minutes. Grilling and frying hamburgers to an internal temperature below 90 °C mainly generated furosine. When the temperature reached 90 °C and 100 °C, furosine content decreased and fluorescent compounds increased exponentially. Baking meat at 300 °C, the most severe heat treatment studied, resulted in the formation of carboxymethyllysine. Home cooking conditions leading to low MRP generation and pleasant colors were obtained and could be used to guide diabetic patients in clinical studies.

Keywords: beef, Maillard reaction, furosine, acrylamide, carboxymethyllysine, fluorescent compounds

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1. Etapas da Reação de Maillard e seus marcadores	8
2.2. Reação de Maillard em alimentos	13
2.3. Reação de Maillard <i>in vivo</i>	19
2.4. Acrilamida	24
3. OBJETIVOS.....	29
3.1. Objetivo geral	29
3.2. Objetivos específicos	29
4. Materiais e métodos.....	30
4.1. Carne bovina e ingredientes para preparo	30
4.2. Métodos.....	30
4.2.1. Pré-preparo da carne.....	30
4.2.2. Preparo da carne.....	31
4.2.3. Composição nutricional	33
4.2.4. Furosina	33
4.2.5. Compostos fluorescentes	34
4.2.6. Indicador inespecífico- fases inicial e final da Reação de Maillard - absorbância	35
4.2.7. Acrilamida.....	35
4.2.8. Carboximetilisina e lisina	35
4.2.9. Análise instrumental de cor	37
4.2.10. Análise sensorial do atributo cor	38
4.2.11. Análise estatística	39
4.2.12. Aspectos éticos.....	39
5. Resultados e discussão.....	40
5.1. Padronização dos tratamentos térmicos da carne bovina	40
5.2. Composição nutricional do hambúrguer em função do tratamento	43
5.3. Furosina	46
5.4. Compostos fluorescentes.....	49
5.5. Indicador inespecífico das fases inicial e final da Reação de Maillard	52
5.6. Acrilamida e Carboximetilisina	55

5.7. Lisina.....	57
5.8. Análise instrumental de cor da carne bovina cozida	60
5.9. Análise sensorial do atributo cor.....	62
6. Conclusões	65
7. Referências	68
APENDICE 1.	81
Padronização do método de análise para carboximetilisina e lisina no detector de massas	81
APENDICE 2.	84
Parâmetros de validação da metodologia de análise para carboximetilisina, lisina e furosina. ..	84
APENDICE 3. Cromatogramas.....	89
ANEXO 1: Ficha utilizada para avaliação sensorial das amostras de carne cozida.	92
ANEXO 2: Aprovação pelo Comitê de Ética FSP/USP.....	93
ANEXO 3. Aprovação da escola SENAI para realização da análise sensorial.....	95
ANEXO 4. Ficha do aluno	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compilação dos teores de furosina em carne cozida por diferentes técnicas cromatográficas	16
Tabela 2. Compilação dos teores de carboximetilisina em carne cozida por diferentes técnicas cromatográficas	18
Tabela 3. Parâmetros controlados para padronização dos tratamentos térmicos em carne bovina	41
Tabela 4. Composição centesimal de carne bovina (coxão mole) assada a diferentes temperaturas	44
Tabela 5. Composição centesimal de carne bovina (coxão mole) grelhada	44
Tabela 6. Composição centesimal de carne bovina (coxão mole) cozida em água	45
Tabela 7. Composição centesimal de carne bovina (coxão mole) empanada e frita	45
Tabela 8. Teor de proteínas em base seca encontrado em carne bovina (coxão mole) submetida a diferentes métodos de cocção	46
Tabela 9. Conteúdo de furosina em carne bovina cozida	47
Tabela 10. Formação de carboximetilisina e acrilamida em carne bovina cozida	56
Tabela 11. Teor de lisina em carne bovina cozida	58
Tabela 12. Alterações da cor instrumental em carne bovina cozida	62
Tabela 13. Percentuais de aceitação e rejeição da cor em carne bovina cozida	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação da base de Schiff	9
Figura 2. Rearranjo de Amadori	9
Figura 3. Formação de furosina	10
Figura 4. Degradação de Strecker	11
Figura 5. Formação de Carboximetilisina	12
Figura 6. Modelo esquemático para as interações entre os AGEs e seu receptor (RAGE)	22
Figura 7. Teor de furosina (mg/ 100 g de proteína) em carne bovina cozida	48
Figura 8. Formação de compostos fluorescentes livres em carne bovina submetida a diferentes meios de cocção	49
Figura 9. Formação de compostos fluorescentes totais (livres e ligados à proteína) em carne bovina submetida a diferentes meios de cocção.	51
Figura 10. Absorbância a 280 nm em carne cozida	54
Figura 11. Absorbância a 420 nm em carne cozida	54
Figura 12. Teor de lisina em carne bovina cozida	59

1. INTRODUÇÃO

O consumo de carne bovina pela população brasileira é bastante elevado, um dos maiores do mundo, e de grande repercussão para a economia brasileira. Porém, esse consumo traz prejuízos ambientais e à saúde. O consumo semanal de carne vermelha de um brasileiro é em média 545 g, considerando-se o somatório dos valores para carne bovina, preparações à base de carne bovina, carne suína e carnes salgadas, segundo dados da Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil (IBGE, 2011). Uma publicação conjunta do *World Cancer Research Fund*, *American Institute for Cancer Research* e INCA (Instituto Nacional de Câncer) recomenda como meta de Saúde Pública o consumo médio de carne vermelha de, no máximo, 300g por semana, valor bem distante da média brasileira (BRASIL, 2007).

Na sociedade moderna, a carne é consumida cozida, preferencialmente, e seu processamento térmico adequado é fundamental para assegurar sua conservação, eliminar microrganismos patogênicos, melhorar propriedades sensoriais e digestibilidade (GATELLIER et al., 2009). Diversas modificações físico-químicas ocorrem durante o processamento térmico de alimentos, muitas são desejáveis e estão relacionadas ao melhor aproveitamento nutricional e ao desenvolvimento de propriedades sensoriais que aumentam a aceitabilidade, como, por exemplo, a desnaturação proteica, gelatinização de amido, caramelização. Porém, algumas reações químicas acarretam a perda de aminoácidos, a síntese de compostos tóxicos (aminas heterocíclicas, acroleína, furanos e acrilamida) e de compostos com impacto negativo no sabor, textura e cor de alimentos, devendo, portanto, serem controladas (SOMOZA, 2005; BRUNTON et al., 2007; ZENG et al., 2009; LIAO et al., 2010; BASTOS e GUGLIUCCI, 2015).

A cascata de reações químicas que se inicia com a ligação entre o grupo amina de aminoácidos e a carbonila de açúcares redutores e produz pigmentos de cor marrom foi estudada e descrita por Louis-Camille Maillard de 1912 a 1917, sendo, portanto, denominada

reação de Maillard (RM) (MAILLARD, 1912; BASTOS e GUGLIUCCI, 2015). Durante a RM a cor, sabor e aroma dos alimentos são modificados, o que aumenta sua aceitabilidade. No final da década de 1960, a partir da observação de níveis aumentados de hemoglobina glicada no sangue de pacientes com diabetes, foi descrito a ocorrência da RM *in vivo*, e, os produtos formados (produtos finais de glicação avançada (AGEs – “Advanced glycation end products”) e produtos finais de lipoxidação avançada (ALEs – “Advanced lipoxidation end products”)) estão associados com o *stress* oxidativo e inflamação, e envolvidos com a fisiopatologia e progressão do diabetes, doenças renais, retinopatia e doenças cardiovasculares (VLASSARA et al., 2002; ZHENG et al., 2002; URIBARRI et al., 2005; RABBANI et al., 2007; BIRLOUEZ-ARAGON et al., 2010; KELLOW e SAVIGE, 2013).

A ingestão de substâncias formadas pela RM nos alimentos está correlacionada com o aumento de níveis séricos de AGEs em humanos (VLASSARA et al., 2002; URIBARRI et al., 2005; POULSEN et al., 2013), e, ensaios clínicos obtiveram benefícios com a restrição de PRM na dieta: tanto em pacientes com diabetes tipo 2 como em indivíduos saudáveis foram observados a diminuição do *stress* oxidativo, a diminuição de marcadores inflamatórios, melhora de marcadores da resistência a insulina e de disfunção vascular, e diminuição dos níveis séricos de AGEs (DELGADO-ANDRADE et al., 2007; URIBARRI et al., 2010; BIRLOUEZ-ARAGON et al., 2010; CHAO et al., 2010; HARCOURT et al., 2011).

Além do aumento dos níveis séricos de AGEs, a formação dos PRM resulta em outros efeitos prejudiciais: diminuição do valor biológico de proteínas e da biodisponibilidade de minerais (FAIRWEATHER et al., 1989; DELGADO-ANDRADE et al., 2004; RUFIAN-HENARES et al., 2007a); na obtenção do corante caramelo com o aquecimento de glicose e amônia é gerado o 4(5)-metil-imidazol, um composto carcinogênico (MOON e SHIBAMOTO, 2011); acrilamida e aminas heterocíclicas são compostos tóxicos formados via RM (LIAO et al., 2010; CHENG et al., 2014); atividade mutagênica já foi verificada em

células tratadas com melanoidinas obtidas a partir do aquecimento de glicose e glicina, de açúcares e caseína (BRANDS et al., 2000; GLOSL et al., 2004; TAYLOR et al., 2004). Não se pode generalizar que PRM formados em alimentos são danosos à saúde humana, porque tais melanoidinas apresentaram efeito genotóxico e citotóxico modesto com dosagens elevadas e após período de incubação prolongado que não correspondem às baixas concentrações encontradas em alimentos (WANG et al., 2011) e principalmente porque melanoidinas possuem atividades biológicas benéficas e propriedades funcionais, atuam como agente antimicrobiano (RUFIAN-HENARES e MORALES, 2007b), prebiótico (BORRELLI e FOGLIANO, 2005), anti-hipertensivo (RUFIAN-HENARES e MORALES, 2007c), quelante de íons metálicos e antioxidante (MORALES et al., 2005)

O efeito benéfico mais estudado das melanoidinas é sua capacidade antioxidante. São frequentes os estudos sobre as propriedades antioxidantes das melanoidinas presentes em diferentes alimentos: café, crosta de pão, cerveja, biscoitos, cacau torrado e vinagre balsâmico (PASTORIZA e RUFIAN-HENARES, 2014; TAGLIAZUCCHI e VERZELLONI, 2014). *In vitro* e *in vivo*, exercem papel importante na prevenção do dano oxidativo e de doenças associadas aos radicais livres (LINDENMEIER et al., 2002; SOMOZA et al., 2003; SOMOZA et al., 2005; PASTORIZA et al., 2015)

Uma justificativa para este cenário paradoxal da relação entre PRM e saúde é a ampla variedade de componentes que participam das reações de Maillard, resultando em uma infinidade de substâncias com estrutura química ainda desconhecida, o que, por sua vez, torna difícil identificar compostos bioativos e suas atividades biológicas específicas (MORALES et al., 2012; TAGLIAZUCCHI e VERZELLONI, 2014).

A formação de PRM depende da composição dos alimentos, da temperatura e do tempo de seu processamento. Embora haja uma ampla gama de dados acerca da quantia de PRM em sistemas modelo-alimento e em alimentos isolados, informações sobre os efeitos de

diferentes métodos de cocção e uso de receitas (matrizes mais complexas) na formação de PRM são escassas. Métodos de cocção com uso de calor seco, como grelhar ou fritar causam uma formação de PRM dez vezes maior que o uso de calor úmido, como cozimento ao vapor ou fervura em água (CHAO et al., 2009; DELGADO-ANDRADE et al., 2010; URIBARRI et al., 2010; HULL et al., 2012; YAMAGUCHI et al., 2012).

Compostos formados durante o progresso da RM são comumente empregados como marcadores para avaliar o desenvolvimento da cascata de reações. Nesse sentido, furosina é um indicador indireto da formação dos produtos de Amadori a partir de lisina e é considerado o melhor marcador do estágio inicial da RM (ROLDAN et al., 2015). Com o progresso da RM, os produtos de Amadori passam por etapas de desidratação e clivagem, formando redutonas sem cor e substâncias fluorescentes (MORALES et al., 1996), por isso a medida de fluorescência é um procedimento eficaz para avaliar a extensão da RM em alimentos (DELGADO-ANDRADE et al., 2006).

Carboximetilisina (CML), o AGE/ALE mais estudado e melhor caracterizado, é um PRM de fase avançada formado tanto em alimentos quanto em sistemas biológicos, e importante marcador do acúmulo de AGE em estudos da área clínica realizados em modelos animais e também em seres humanos (ASSAR et al., 2009; NIQUET-LERIDON e TESSIER, 2011; HULL et al., 2012).

Acrilamida é outro importante PRM, formado a partir de asparagina e açúcares redutores durante o processamento térmico em temperaturas elevadas, acima de 120 °C. O conhecimento do mecanismo de formação da acrilamida é essencial para reduzir seus níveis em alimentos, pois esta substância é um composto mutagênico e potencial carcinógeno (CHENG et al., 2014; HEREDIA et al., 2014; XU et al., 2014). Embora alimentos ricos em carboidrato sejam comumente pesquisados para determinação de acrilamida, alimentos ricos em proteína, como carnes cozidas em temperaturas elevadas, também contém este

contaminante (KAPLAN et al., 2009). A quantidade diária consumida de acrilamida é influenciada não apenas pelo nível desta substância nos alimentos, mas também pela quantidade de alimento que é consumida (XU et al., 2014). Sendo assim, a determinação da concentração de acrilamida em um alimento amplamente consumido como a carne é muito importante para subsidiar ações de monitoramento de exposição e de risco.

Tendo em vista a relação entre ingestão de PRM e saúde, associado ao fato de que o processamento térmico é uma parte importante no preparo de alimentos na vida moderna, é importante determinar se os métodos de cocção domésticos podem influenciar na formação de PRM em carne. Também, para melhor compreensão da relação entre o consumo dos PRM e doenças associadas à glicação, é necessário determinar os níveis de ingestão desses compostos em populações, avaliar o risco, mensurá-lo e estabelecer as coortes mais susceptíveis. Para tais tarefas o primeiro passo consiste na quantificação de PRM em alimentos que fazem parte do hábito de consumo de populações (HULL et al., 2012). O presente estudo investigou a formação de furosina, compostos fluorescentes, CML e acrilamida, e a perda de lisina durante a cocção doméstica de carne bovina. Como diferentes métodos de cocção afetam a cor da carne cozida, instrumental e sensorialmente, também foi avaliado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Etapas da Reação de Maillard (RM) e seus marcadores

Em 1953 Hodge propôs que a RM ocorre em três fases: inicial, intermediária e final, cada uma delas é caracterizada pela formação de determinados produtos (marcadores) que indicam a severidade do tratamento térmico, bem como a perda de valor nutricional, devido à degradação de lisina (HODGE, 1953; BASTOS e GUGLIUCCI, 2015).

Na etapa inicial ocorre a ligação covalente de açúcares redutores como glicose, frutose ou glicose-6-fosfato a extremidade N-terminal de aminoácidos ou grupo amino ϵ de proteínas e ácidos nucleicos, que produz uma base de Schiff, uma glicosilamina reversível e instável, incolor, sem sabor e aroma (figura 1) (HODGE, 1953; BALTES, 1982; OETTERER e SARMENTO, 2006; RIBEIRO e SERAVALLI, 2007; BELITZ et al., 2009; PENG et al., 2011).

O rearranjo para a forma cíclica é imediato, mais estável devido a formação da ligação hemiacetalica entre os carbonos 1 e 5. Ocorre então a entrada e saída de um H^+ , inicialmente formando o catiônico da base de Schiff (capaz de doar prótons) e isomerização resultando em 1-amino-1-desoxicetose N substituída. É a forma ceto (cetoseamina), mais estável, denominada composto de Amadori (figura 2). Se a frutose reage do mesmo modo com uma amina ou um aminoácido, uma aldoseamina chamada composto de Heyns é formada (2-amino-2-desoxialdose) (HODGE, 1953; BALTES, 1982; OETTERER e SARMENTO, 2006; BELITZ et al., 2009).

Figura 1. Formação da base de Schiff. Adaptado de PENG et al., 2011

Figura 2. Rearranjo de Amadori. Adaptado de PENG et al., 2011

Lisina é um dos aminoácidos mais reativos nos estágios iniciais e sua degradação se dá no decorrer da RM; essa perda será de maior importância em alimentos que o contenham como aminoácido limitante. É possível avaliar a degradação de lisina através da determinação do composto furosina (ϵ -N-(furoilmetil)-L-lisina, figura 3), formado durante a hidrólise ácida dos produtos de Amadori (frutosil-lisina, lactulosil-lisina e maltulosil-lisina) pela reação dos grupamentos amino ϵ com glicose, lactose e maltose (DELGADO-ANDRADE et al., 2007; ERBERSDOBLER e SOMOZA, 2007; RUFIAN-HENARES et al., 2007a; JOUQUAND et al., 2015). Os compostos formados na fase inicial não absorvem no espectro visível, e podem

dano térmico em alimentos processados (DELGADO-ANDRADE et al., 2007; BASTOS et al., 2011).

Figura 4. Degradação de Strecker. Adaptado de PENG et al., 2011

Na fase final, os compostos liberados na fase intermediária podem reagir com aminoácidos e polimerizarem-se dando origem às melanoidinas, pigmentos de cor marrom com peso molecular variável e cromóforos com absorbância máxima em 420 nm. Essa etapa também é caracterizada pelo aumento na formação de compostos fluorescentes (BALTES, 1982; WANG et al., 2011).

A carboximetilisina (CML), formada na etapa final da RM (figura 5), é um importante indicador da RM não apenas em alimentos, mas também em sistemas biológicos, assim como da qualidade nutricional de alimentos que sofreram tratamento térmico severo (AHMED et al., 1986; NIQUET-LÉRIDON e TESSIER, 2011; PENG et al., 2011); pode ser formada pela clivagem oxidativa da frutose-lisina, pela reação entre lisina e dicarbonilas (glioal e metilglioal) e pode também ser gerada durante a oxidação do ácido ascórbico (AHMED et al., 2005; DELGADO-ANDRADE et al., 2007; ASSAR et al., 2009; HULL et al., 2012).

Figura 5. Formação de CML. Adaptado de PENG et al., 2011

2.2.Reação de Maillard em alimentos

A RM em alimentos é comum durante o processamento térmico, bem como no armazenamento em temperatura ambiente, sendo a temperatura o principal fator que influencia na velocidade da reação (SOMOZA, 2005; SILVÁN et al., 2006; CHAO et al., 2009). Em produtos de panificação, café, cereais matinais, carne cozida, cacau, a RM é altamente desejável, uma vez que confere o sabor, aroma e cor característicos e determinantes na escolha pelo consumidor. Porém sua formação prejudica a qualidade de alimentos como leite em pó, ovo em pó, leite condensado entre outros (DELGADO-ANDRADE et al., 2007; RIBEIRO e SERAVALLI, 2007; BELITZ et al., 2009).

A taxa de formação e diversidade de produtos liberados na RM depende de fatores como tempo/temperatura de processamento, composição, concentração de reagentes, atividade de água, pH, presença de íons metálicos. É bem estabelecido que a velocidade da RM duplique quando a temperatura aumenta em 10 °C, a faixa de atividade de água ótima é intermediária, de 0,4 a 0,7. Em pH ácido a velocidade da RM é baixa, mas aumenta pH alcalino até um máximo alcançado em pH 10. Cátions metálicos como Cu^{+2} e Fe^{+3} podem catalisar a reação. (O'BRIEN e MORRISSEY, 1989; POULSEN et al., 2013).

O tipo de açúcar redutor interfere na velocidade de reação com os grupamentos amina, as pentoses são mais reativas do que as hexoses. A lisina é cerca de 2 a 3 vezes mais reativa quando comparada aos outros aminoácidos. Na sequência, os aminoácidos básicos e não polares (arginina, fenilalanina, leucina, isoleucina e valina) são os mais reativos, seguidos dos aminoácidos ácidos (ácido glutâmico e ácido aspártico) (SHIBAO e BASTOS, 2011).

Como a RM depende diretamente da temperatura e tempo de processamento o teor de PRM em alimentos está relacionado também ao método e condições da preparação culinária ou industrial, bem como uso de reaquecimento: métodos de cocção por calor seco,

como fritar ou assar promovem uma formação dos PRM dez vezes maior do que a fervura em água (calor úmido) (DELGADO-ANDRADE et al., 2010; CHAO et al., 2009; URIBARRI et al., 2010). A adição de molhos (fermentado de soja (shoyu), agridoce, de tomate e sabor churrasco) que apresentam alto teor de açúcares redutores em sua formulação, no tempero de carnes, também resultou em maior desenvolvimento dos PRM na cocção (CHAO et al., 2009). Tempos de cozimento mais curtos, temperaturas mais baixas de cocção e a adição de ingredientes ácidos como limão e vinagre, por sua vez, reduzem a taxa de formação dos PRM (URIBARRI et al., 2010).

No Brasil os PRM já foram quantificados em cereais matinais tipo flocos e granola e em pó de café. Nos cereais em flocos foram detectados em maior concentração produtos da fase inicial da reação; na granola os de fase inicial e intermediária (furosina e hidroxitilfurfural - HMF), e, o café, por ser submetido a tratamento térmico mais severo apresenta maior concentração de PRM da fase avançada da reação (Carboximetilisina - CML). Devido à ausência de estudos que indiquem um consenso sobre a quantidade máxima a ser consumida para os PRM, não foi possível classificar os produtos como “de alto” ou “baixo” teor (SHIBAO e BASTOS, 2011; BASTOS et al., 2011).

Uma base de dados com o teor de AGEs em 250 alimentos consumidos nos Estados Unidos publicada em 2004 indicou que os alimentos do grupo das gorduras, como azeite de oliva e manteiga, contém os teores mais elevados de CML, com uma média de 100 ± 19 kU/g. Valores elevados foram encontrados também no grupo das carnes, 43 ± 7 kU/g em média (GOLDBERG et al., 2004). Essa base de dados foi expandida em 2010, e o grupo das carnes, baseado em tamanho de porção consumida, contém os níveis mais altos de AGEs (URIBARRI et al., 2010). O método analítico empregado na obtenção destes resultados foi o imunológico (ELISA), mas essa metodologia tem sido bastante questionada, porque os dados são expressos em unidades (kilounidades de CML/ g de alimento) que impedem

comparações e até o momento não foram apresentados seus parâmetros de validação (CHARRISSOU et al., 2007; ASSAR et al., 2009; HULL et al., 2012; TESSIER e BIRLOUEZ-ARAGON, 2012; TAREKE et al., 2013).

Um estudo que aplicou cromatografia acoplada a detecção por massas encontrou em manteiga, leite pasteurizado e carne bovina crua os mais baixos teores de CML (0,5 mg/ Kg), em azeite de oliva, CML não foi detectada, oposto à base de dados obtidos por ELISA. Já os valores mais elevados foram detectados em crosta de pão e leite evaporado, ambos com 4,6 mg CML/Kg (ASSAR et al., 2009). Um efeito de matriz pode ser o responsável pelos níveis elevados de CML em manteiga, azeite e carnes obtidos com o método de ELISA (CHARRISSOU et al., 2007; ASSAR et al., 2009).

Em carnes, ao compilar os dados sobre os teores de furosina e CML (PRM mais frequentes neste grupo de alimentos - tabelas 1 e 2) obtidos com cromatografia, verifica-se que o número de pesquisas ainda é pequeno. Também, muitas vezes o teor desses compostos é expresso em relação ao teor de proteína do alimento, o que impossibilita seu uso para a estimativa do consumo na dieta.

Tabela 1. Compilação dos teores de furosina (FUR) em carne cozida por diferentes técnicas cromatográficas

Alimento/tratamento	FUR (mg/100 g amostra)	FUR (mg/ 100 g proteína)	Método analítico	Referência
Carne bovina / cozido em água com adição de molhos ^a	0,5-0,8	-	RP HPLC ^b	CHAO et al., 2009
Carne bovina / frito com adição de molhos ^a	0,5-0,8	-	RP HPLC ^b	CHAO et al., 2009
Carne bovina / assado com adição de molhos ^a	0,6-0,8	-	RP HPLC ^b	CHAO et al., 2009
Carne bovina assada por 10, 20 ou 30 minutos	-	35-120	RP HPLC ^b	YAMAGUCHI et al., 2012
Carne bovina frita por 10, 20 ou 30 minutos	-	40-100	RP HPLC ^b	YAMAGUCHI et al., 2012
Carne bovina assada por 10, 20 ou 30 minutos com sal e açúcar	-	10-160	RP HPLC ^b	YAMAGUCHI et al., 2012
Carne bovina frita por 10, 20 ou 30 minutos com sal e açúcar	-	80-120	RP HPLC ^b	YAMAGUCHI et al., 2012
Lombos de cordeiro / cozido em sous-vide 60 °C / 12horas	-	36,8	HPLC troca iônica	ROLDAN et al., 2015
Lombo de cordeiro / cozido com açúcares redutores em sous-vide 60 °C / 12horas	-	72,0	HPLC troca iônica	ROLDAN et al., 2015
Lombo de cordeiro / assado a 180 °C	-	29,4	HPLC troca iônica	ROLDAN et al., 2015
Lombo de cordeiro / assado a 180 °C com adição de açúcares redutores	-	122,2	HPLC troca iônica	ROLDAN et al., 2015

O sinal “-” indica não analisado

^a a carne foi temperada com molho de soja, molho agri-doce e molho sabor churrasco, os valores mínimo e máximo de furosina foram compilados

^b RP HPLC – Cromatografia líquida com fase reversa

A formação de furosina é mais acentuada em carnes do que a de CML, seus teores são de 10 a 100 vezes maiores do que os de CML (tabelas 1 e 2). A formação de CML parece ocorrer em níveis baixos, variando de não detectado a 2,0 mg/100 g. Como esperado, o teor de furosina e de CML é bastante influenciado pelo tratamento térmico, quanto maior a exposição ao calor, maior o nível formado desses compostos. Com relação à adição de ingredientes ricos em açúcares, CHAO et al., 2009 observaram um aumento de 10 vezes na formação de furosina com a adição de molhos, de soja, agri-doce e churrasco, em carne bovina cozida e ROLDAN et al., 2015 observaram um aumento de 4 vezes em lombos de cordeiro assados com uma solução realçadora de sabor. YAMAGUCHI et al. (2012) também relataram

maior velocidade de formação para furosina em carne frita e grelhada com adição de cloreto de sódio e sacarose. No entanto o efeito da adição de açúcares no cozimento de carnes na formação de CML não está claro, CHAO et al. (2009) observaram maior formação de CML em carne bovina, de porco e em peixes, mas em lombos de cordeiro assados e cozidos por *sous-vide*, a adição de açúcares redutores não acarretou maiores teores de CML (ROLDAN et al., 2015).

Um ensaio clínico determinou quais itens da dieta mais contribuíram para a exposição a CML. Os dados foram obtidos por métodos cromatográficos e confirmaram os resultados de ASSAR et al., 2009, pois o grupo dos cereais (pão, cereais matinais e biscoitos) totalizou 56% da ingestão de CML. A contribuição relativa dos alimentos lácteos foi de 19%, a das carnes, apesar de menor, foi significativa, 16%, e dos vegetais, 1%. Os resultados da quantificação de CML nos grupos de alimentos usados no ensaio clínico não foram disponibilizados, impedindo comparação com os dados da tabela 2 (BIRLOUEZ-ARAGON et al., 2010; TESSIER e BIRLOUEZ-ARAGON, 2012).

Como há pouca informação sobre o teor de furosina e CML em carnes e os resultados são conflitantes, é fundamental que novos estudos quantifiquem estes compostos, em especial que retratem a diversidade de ingredientes e de técnicas culinárias ao redor do mundo, o que certamente impacta no teor formado de PRM. Também é desconhecido se o uso de cocção com temperaturas menores e maior tempo irá gerar alimentos agradáveis sensorialmente, mas com baixa formação de PRM.

Tabela 2. Compilação dos teores de carboximetilisina (CML) em carne cozida por diferentes técnicas cromatográficas

Alimento/tratamento	CML (mg/100 g amostra)	CML (mg/ 100 g proteína)	Método analítico	Referência
Carne bovina cozida ao vapor	Nd	Nd	GC/MS	CHARRISSOU et al., 2007
Carne bovina grelhada	Nd	Nd	GC/MS	CHARRISSOU et al., 2007
Carne bovina assada	Nd	Nd	GC/MS	CHARRISSOU et al., 2007
Carne bovina cozida em água	0,5	2,7	UPLC/ MS-MS	ASSAR et al., 2009
Carne bovina frita	1,1	6,1	UPLC/ MS-MS	ASSAR et al., 2009
Carne bovina / cozido em água com adição de molhos ^a	0,5-0,9	-	RP HPLC	CHAO et al., 2009
Carne bovina / frito com adição de molhos ^a	0,8-1,4	-	RP HPLC	CHAO et al., 2009
Carne bovina / assado com adição de molhos ^a	0,8-1,2	-	RP HPLC	CHAO et al., 2009
Carne bovina assada no carvão – mal passada	0,15	0,7	UPLC/ MS-MS	HULL et al., 2012
Carne bovina assada no carvão – ao ponto	0,25	1,2	UPLC/ MS-MS	HULL et al., 2012
Carne bovina assada no carvão – bem passada	0,42	1,4	UPLC/ MS-MS	HULL et al., 2012
Carne bovina frita – temperatura interna 71 °C - apenas camada externa	2,0	-	RP HPLC	CHEN e SMITH, 2015
Carne bovina frita – temperatura interna 71 °C – apenas camada interna	0,3	-	RP HPLC	CHEN e SMITH, 2015
Lombo de cordeiro / cozido em sous- vide 60 °C / 12horas	-	4,0	LC / MS- MS	ROLDAN et al., 2015
Lombo de cordeiro / cozido com açúcares redutores em sous-vide 60 °C / 12horas	-	4,1	LC / MS- MS	ROLDAN et al., 2015
Lombo de cordeiro / assado a 180 °C	-	4,1	LC / MS- MS	ROLDAN et al., 2015
Lombo de cordeiro / assado a 180 °C com adição de açúcares redutores	-	4,6	LC / MS- MS	ROLDAN et al., 2015
Bife a <i>burgundy</i> assado forno convencional por 3h10min	0,4	-	LC / MS- MS	JOUQUAND et al., 2015
Bife a <i>burgundy</i> assado em micro- ondas por 84 min	0,5	-	LC / MS- MS	JOUQUAND et al., 2015

Nd – não detectado

O sinal “-” indica não analisado

^a a carne foi temperada com molho de soja, molho agri-doce e molho sabor churrasco, os valores mínimo e máximo de furosina foram compilados

GC/MS – cromatografia gasosa com detector de massas quadrupolar; UPLC/MS-MS – cromatografia líquida de ultra performance com detector de massas triplo-quadrupolo; RP HPLC – cromatografia líquida com fase reversa

2.3. Reação de Maillard *in vivo*

No final da década de 1960, a partir da observação de níveis elevados de hemoglobina glicada em pacientes diabéticos, foi descrito a ocorrência da RM *in vivo*, denominada glicação (RAHBAR, 1968). A rota das reações químicas que ocorrem *in vivo* é semelhante aquela dos alimentos, porém dividida em duas etapas – inicial e avançada. A etapa inicial consiste na ligação entre uma amina livre e um aldeído ou cetona de um açúcar redutor para formar a base de Schiff, uma imina instável. Por meio de mecanismo oxidativo a base de Schiff pode ser convertida a dicarbonilas muito reativas, como 3-deoxiglicosona, glioxal e metilglioxal, ou pode se rearranjar resultando no estável composto de Amadori. Na etapa avançada, o composto de Amadori passa por rearranjos complexos, clivagens e ligações covalentes que levam a formação dos AGEs, capazes de alterar a estrutura e função de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (BROWNLEE, 1995; TESSIER, 2010; VLASSARA e STRIKER, 2011).

Os AGEs se acumulam em tecidos e estão presentes na circulação sistêmica, e por estarem associados com o *stress* oxidativo e inflamação, exercem um papel fundamental na fisiopatologia e progressão de doenças metabólicas e relacionadas ao envelhecimento. Inicialmente foi estabelecido que os AGEs se formavam *in vivo* como resultado das altas concentrações de glicose presentes no diabetes (MITSUHASHI et al., 1993) e, desde então, já foram relacionados com resistência a insulina e diabetes em animais (PEPPA et al., 2003; CAI et al., 2007), e mais recentemente, também em humanos (URIBARRI et al., 2011).

O primeiro AGE isolado e caracterizado a partir de proteínas glicadas *in vivo* foi a Carboximetilisina (AHMED et al., 1986). Essa lisina glicada foi detectada em proteínas teciduais como as do cristalino (DUNN et al., 1989), no colágeno da pele (DUNN et al., 1991) e na urina (WADMAN et al., 1975). Também, foi relatado que seus níveis estão aumentados

no sangue e no colágeno da pele de pacientes com diabetes, comparado com indivíduos saudáveis (DYER et al., 1993; MIURA et al., 2003). Desde sua descoberta há quase 30 anos, CML se tornou o principal biomarcador da RM in vivo. Quando comparado com outros AGEs, CML é estável em ácidos, facilitando sua aplicação como indicador do progresso da RM tanto em sistemas biológicos como em alimentos (AMES, 2008). Os AGEs diferem em complexidade, fluorescência e capacidade de formar cruzamentos entre moléculas. Substâncias fluorescentes de *cross-linking* e cor marrom, como pentosidina (*cross-linking* lisina arginina), produtos de *cross-linking* não fluorescentes como dímero lisina – glioxal (GOLD) e dímero lisina-metilglioxal (MOLD), e pirralina (aduto de *cross-linking*) são AGEs importantes (PENG et al., 2011).

Os efeitos patológicos dos AGEs no organismo ocorrem por quatro mecanismos:

1) **Modificação da estrutura/conformação da proteína, o que altera sua função.**

As modificações causadas por AGEs alteram a atividade de enzimas, por exemplo. A albumina sérica glicada por metilglioxal exibe atividade de esterase muito prejudicada comparada a albumina não modificada (AHMED e THORNALLEY, 2005).

2) **Os AGEs formam ligações cruzadas com proteínas, causando enrijecimento tecidual.** Uma vez formados os AGEs podem tomar parte em *cross-linking* com proteínas que geralmente são estáveis e de meia vida longa, como colágeno e as proteínas do cristalino. O colágeno na matriz extracelular é diretamente exposto a altos níveis de glicose. O colágeno glicado se torna mais resistente à degradação por metaloproteinases o que causa seu acúmulo, e o enrijecimento da matriz extracelular, acarretando consequentemente, disfunção vascular pela diminuição da flexibilidade e permeabilidade das artérias e o comprometimento cardíaco (BADENHORST et al., 2003).

- 3) **A interação entre os AGEs e seu receptor ativa sinais de transdução e induz resposta inflamatória.** A interação AGE-RAGE (receptor de AGE) ativa o fator nuclear- κ B, aumentando a transcrição para citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6), TNF- α , e moléculas de adesão como endotelina -1, VCAM-1 e selectina E (figura 6), e conseqüentemente, promove o stress oxidativo, trombogênese, inflamação vascular e angiogênese, eventos diretamente relacionados a complicações macro e microvasculares do diabetes (HUTTUNEN et al., 1999; HUANG et al., 2001; WAUTIER et al., 2001; HARJA et al., 2008; SEMBA et al., 2010).
- 4) **Aumenta o *stress* oxidativo.** A ligação dos AGEs com seu receptor ativa a NADPH oxidase, induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (NEGRE-SALVAYRE et al., 2009). Altos níveis de LDL modificada por AGEs relatados em pacientes com diabetes estão associados com o *stress* oxidativo, com a oxidação da LDL, com a formação de células espumosas e placas de ateroma (TAMES et al., 1992). O *stress* oxidativo contribui para diminuir a biodisponibilidade do óxido nítrico e para aumentar a formação de nitrato implicada na disfunção endotelial (BASTA et al., 2004). Esses eventos estão presentes na aterosclerose e na progressão de doenças cardiovasculares, que representam a maior causa de mortalidade em pacientes com diabetes (NEGRE-SALVAYRE et al., 2009).

Figura 6. Modelo esquemático para as interações entre os AGEs e seu receptor (RAGE).

Adaptado de SEMBA et al., 2010

As fontes de exposição aos AGES são a exógena, dos PRM encontrados em alimentos e também presentes no tabaco, e a endógena, dos AGES formados por metabolismo anormal da glicose ou como subproduto da peroxidação lipídica. Os PRM são metabolizados e contribuem para aumento dos níveis séricos de AGEs, (DELGADO-ANDRADE et al., 2007; URIBARRI et al., 2010; BIRLOUEZ-ARAGON et al., 2010; CHAO et al., 2010).

Pesquisadores da área clínica defendem que o controle da ingestão de PRM é uma medida eficaz para diminuir as complicações relacionadas ao diabetes e insuficiência renal, pois a restrição de PRM na dieta resultou em inúmeros benefícios, em indivíduos saudáveis e em pacientes com diabetes tipo 2 associada ou não a insuficiência renal foram relatados: diminuição do stress oxidativo, diminuição de marcadores inflamatórios, melhora de marcadores da resistência a insulina e de disfunção vascular, e diminuição dos níveis séricos

de AGEs (KOSCHINSKY et al., 1997; VLASSARA et al., 2002; URIBARRI et al., 2003; CAI et al., 2004; NEGREAN et al., 2007; VLASSARA et al., 2009; BIRLOUEZ-ARAGON et al. 2010; CHAO et al., 2010). Ainda, em pacientes com diabetes foram observados diminuição dos níveis de leptina, aumento de adiponectina e desacetilação do fator nuclear- κ B p65 (URIBARRI et al., 2011).

Uma revisão sistemática analisou os possíveis benefícios de dietas restritas em PRM e indica que no momento não há evidência suficiente para estabelecer a restrição do consumo de PRM como auxiliar no tratamento de pacientes com diabetes ou insuficiência renal. Um total de doze ensaios clínicos (289 indivíduos) foi avaliado, mas cinco deles eram de baixa qualidade metodológica, avaliado pelo *Heyland methodological quality score test*. Outras limitações foram o tamanho pequeno do número de indivíduos, o tempo de duração dos estudos, a falta de padronização para a medida de AGEs e o fato de que sete dos doze estudos incluídos na revisão foram conduzidos pelo mesmo grupo de pesquisa (KELLOW e SAVIGE, 2013). Apesar disso, os autores ainda consideram que o controle da ingestão de PRM é uma estratégia válida para diminuir as complicações relacionadas ao diabetes e insuficiência renal. A execução de novos ensaios clínicos, com número amostral maior e maior tempo de duração é necessária para reforçar a evidência sobre os efeitos das dietas com controle de PRM (KELLOW e SAVIGE, 2013; BASTOS e GUGLIUCCI, 2015).

A quantificação dos PRM em alimentos empregando-se métodos analíticos sensíveis e validados é fundamental para fomentar bases de dados a serem empregadas em estudos que determinem os níveis de ingestão desses compostos em populações, avaliem o risco, e determinem as coortes mais susceptíveis. Tais informações serão auxílio para melhor compreender a relação entre o consumo de PRM e as doenças associadas à glicação (HULL et al., 2012).

2.4. Acrilamida

Acrilamida (2-propenamida, CAS 79-06-01) é um sólido cristalino sem cor e sem cheiro, polar, facilmente polimerizável. A poliacrilamida tem muitas aplicações na indústria, é usada como floculante na clarificação da água potável, como ingrediente em cosméticos, na construção civil como auxiliar na vedação de túneis e barragens, na síntese de corantes e como reagente químico na área de biologia molecular (FAO/WHO/JECFA, 2010; XU et al., 2014; PEDRESCHI et al., 2014).

Em 2002 a agência reguladora de alimentos sueca (The Swedish National Food Administration) em parceria com a Universidade de Estocolmo relatou a formação de altos níveis de acrilamida em pães, café, batatas fritas, entre outros alimentos (ROSEN e HELLENAS, 2002; TAREKE et al., 2002), e desde então, esse composto vem sendo intensivamente pesquisado, pois está associado à formação de tumores em vários órgãos de animais (JOHNSON et al., 1986; FRIEDMAN et al., 1995), a danos no sistema reprodutivo (SAKAMOTO e HASHIMOTO, 1986; FIELD et al., 1990; SHIPP et al., 2006), e à neurotoxicidade em seres humanos, particularmente em trabalhadores das indústrias que utilizam poliacrilamida (HE et al., 1989; PENNISI et al., 2013).

Devido a sua genotoxicidade e carcinogenicidade, a acrilamida foi classificada como um carcinógeno do grupo 2A pela agência internacional de pesquisa em câncer (*International Agency for Research on Cancer –IARC*) (WHO/IARC, 1994), como carcinógeno e mutagênico de categoria 2 pela União europeia (UE) (EC, 2002) e, mais recentemente, foi adicionada pela agência reguladora de substâncias químicas da UE (*European Chemicals Agency – ECHA*) à lista “*Substances of very high concern*”, que reúne compostos passíveis de efeitos indesejáveis para a saúde humana ou para o meio ambiente (ECHA, 2010).

A principal rota para formação de acrilamida em alimentos é via RM, com a presença do aminoácido asparagina como precursor, em temperatura acima de 120 °C. Teores moderados de acrilamida (5-50 µg/Kg) foram detectados em alimentos ricos em proteína como carnes de frango, peixe, porco e boi fritas, alimentos ricos em carboidrato (pães, biscoitos, batata-frita) e café possuem os níveis mais elevados, de 150 a 4000 µg de acrilamida/Kg de alimento e, em alimentos crus ou cozidos em água, acrilamida não foi detectada (TAREKE et al., 2002; EFSA, 2011; PEDRESCHI et al., 2014).

No Brasil os teores de acrilamida foram analisados em 15 categorias de produtos consumidos por adolescentes e os alimentos que mais contribuíram para a exposição a esse contaminante pela dieta foram batata-frita (264-2528 µg/Kg), pão francês (<20 µg/Kg), biscoito água e sal (187-361 µg/Kg) e café (174-202 µg/Kg) (ARISSETO et al., 2009). Ainda não há dados sobre teores de acrilamida em carnes e produtos cárneos no Brasil (GERMANO e GERMANO, 2002; ARISSETO, 2007).

A acrilamida consumida através dos alimentos é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal e distribuída aos tecidos. No fígado é metabolizada a glicidamida, que é mais reativa e tóxica. Tanto a glicidamida quanto a acrilamida podem formar adutos com proteína, DNA e hemoglobina, empregados como biomarcadores para avaliar a exposição a acrilamida de modo preciso (SUMMER et al., 1992; FENNELL et al., 2005; PIGARRILHO et al., 2013).

O monitoramento do risco para acrilamida é um tópico fundamental no campo da biossegurança e engloba identificação e caracterização do perigo, monitoramento da exposição e caracterização do risco (XU et al., 2014), a seguir:

1) A identificação do perigo para acrilamida (processo de identificar efeitos adversos à saúde a fim de planejar, evitar ou atenuar seus impactos) tem sido abordada em pesquisas que determinam sua toxicidade (JOHNSON et al., 1986; FRIEDMAN et al., 1995; BELAND, et al., 2013)

2) A caracterização do perigo descreve a relação entre o nível de exposição (dose) e a frequência/severidade de doença ou outro efeito adverso (resposta). Ainda não foi estabelecida uma quantidade diária de acrilamida recomendada para consumo com segurança, como se trata de um composto genotóxico, é empregado o critério margem de exposição. Margem de exposição é definida como o menor intervalo de confiança (limite inferior do intervalo de confiança 95%) de um ponto na curva dose-resposta que caracteriza efeito adverso, dividido pela dose de exposição. Uma margem de exposição acima de 10.000 é considerada pouco preocupante, mas a margem de exposição para acrilamida de origem alimentar calculada ao redor do mundo está abaixo de 10.000 e, em alguns casos, menor que 200, justificando, portanto, a necessidade de estudos que avaliem a associação entre exposição a acrilamida e incidência de câncer em humanos. (FAO/WHO/JECFA, 2010; EFSA, 2011; PEDRESCHI et al., 2014).

3) Monitoramento da exposição é o processo de estimar ou medir a magnitude, frequência e duração da exposição a acrilamida, alinhado com o número e características da população exposta. A exposição de origem alimentar tem sido monitorada de três modos: uso de questionários de frequência alimentar e tabelas de conversão para obter a ingestão de acrilamida; inquérito sobre o consumo de alimentos-alvo que contenham acrilamida, particularmente batata-frita e a análise de biomarcadores séricos, como adutos de proteína (PEDERSEN et al., 2012; OBON-SANTACANA et al., 2013; RIBOLDI et al., 2014)

4) O último passo, a caracterização do risco, visa unir toda informação adquirida nas etapas anteriores para monitorar o risco real da exposição a acrilamida e reflete a combinação dos monitoramentos de exposição e dose-resposta. DYBING e SANNER, 2003 relataram um risco de câncer na população norueguesa de 6×10^{-4} para uma média de exposição de 0,46 µg de acrilamida/ Kg de peso corporal por dia por 70 anos, o que corresponde a 6 casos de câncer a cada 10.000 indivíduos.

Até o momento a associação entre exposição alimentar a acrilamida e câncer não foi comprovada. Como existem amplas variações nos níveis de acrilamida em alimentos, a estimativa da exposição por meio de questionários de frequência alimentar pode ser um parâmetro incerto. Sendo assim, a medida de biomarcadores (adutos de hemoglobina-acrilamida e de hemoglobina-glicidamida) diretamente no sangue pode fornecer uma estimativa mais precisa (RIBOLDI et al., 2014). Entretanto, é consenso entre inúmeros comitês científicos e agências reguladoras ao redor do mundo que a exposição a acrilamida deve ser limitada a menor dose possível (EC, 2002; ECHA, 2010; EFSA, 2011).

Nesse sentido, a indústria de alimentos tem modificado processos a fim de diminuir a formação de acrilamida em alimentos sem comprometer sua qualidade. Estratégias de mitigação foram desenvolvidas: redução de asparagina e açúcares redutores nos ingredientes, através da seleção de cultivares e engenharia genética (BHASKAR et al., 2010); mudança nos parâmetros da cadeia produtiva de alimentos, com foco na otimização de tempo e temperatura de processamento e ajuste de umidade (GRANDA et al., 2004); adição de aminoácidos (glutamina, alanina, lisina, glicina e cisteína) que competem com o precursor e/ou aumentam a eliminação/degradação de asparagina (KIM et al., 2005); aumento da acidez para pH abaixo de 6, a imersão de batatas em tampões ácidos como fosfato e citrato e adição de antioxidantes também podem ser usados para reduzir a formação de acrilamida em alimentos (PEDRESCHI et al., 2007).

Mundialmente, esforços estão sendo direcionados para a criação de bases de dados com o teor de acrilamida em alimentos que possibilitem uma estimativa fidedigna de sua ingestão diária, e, conseqüentemente, o monitoramento da exposição. Muitos países avaliaram os níveis de acrilamida em seus alimentos e estimaram a ingestão desse composto em suas populações, mas, devido a diferenças em hábitos alimentares e técnicas culinárias empregadas, os dados variam muito. A quantia de acrilamida consumida diariamente pela

alimentação é influenciada não apenas pelo teor de acrilamida nos alimentos, mas também, por quanto esse alimento é consumido. Por essa razão atenção deve ser direcionada a alimentos, que, embora não sejam os mais ricos em acrilamida, sejam amplamente consumidos, como o grupo das carnes, por exemplo (XU et al., 2014; RIBOLDI et al., 2014).

3. OBJETIVOS

3.1.Objetivo geral

Estudar a formação dos produtos da Reação de Maillard: furosina, carboximetilisina e acrilamida em carne bovina submetida a técnicas de cocção por calor úmido e calor seco.

3.2.Objetivos específicos

- Padronizar condições de cocção com uso de calor seco e calor úmido em uma situação doméstica;
- Caracterizar a progressão da reação de Maillard e seus diferentes estágios nas amostras de carne por meio da identificação e quantificação de furosina, carboximetilisina e da análise de compostos fluorescentes;
- Determinar os níveis de formação de acrilamida em carne cozida;
- Avaliar como as técnicas de cocção interferem na cor da carne – instrumental e sensorialmente.

4. Materiais e métodos

4.1. Carne bovina e ingredientes para preparo

Foram obtidas através de doação (Frigorífico Minerva, Barretos, SP) duas peças do corte coxão mole bovino (*Semimembranosus* - 15 kg de carne no total), provenientes de animais machos, criados em sistema de confinamento e abatidos entre 24 e 36 meses de idade. A carne foi transportada ao laboratório em caixas térmicas com gelo sob a temperatura de 5 °C. Frações das peças foram mantidas em embalagem de polietileno (Cryovac, Sealed Air, São Paulo, SP) e congeladas (-18 °C) até o processamento.

Cloreto de sódio, óleo de soja e farinha de trigo foram adquiridos em mercado local e ovo em pó na empresa Cooper Ovos, Mogi das Cruzes, SP.

4.2. Métodos

4.2.1. Pré-preparo da carne

Após remoção manual da gordura externa, a carne foi moída em processador doméstico (Philips Walita, 600 W) em pequenos volumes para que não houvesse aumento de sua temperatura interna e possível risco microbiológico. A carne moída foi então moldada em hambúrgueres com 1 cm de espessura, 7 cm de diâmetro e massa de 50 g. Para retratar cocção doméstica, foi acrescentado 1 % de cloreto de sódio (CAMARGO e BOTELHO, 2008).

4.2.2. Preparo da carne

A carne bovina foi submetida aos seguintes tratamentos: cozimento em água, grelhar, assar e fritar, o detalhamento do processo térmico está descrito no quadro 1.

Foram condições comuns aos tratamentos o uso de um fogão a gás doméstico, uso de panela (ou assadeira) antiaderente e controle da temperatura por meio de termopares tipo J (G Controls sistemas Ltda) inseridos no meio condutor de calor (fundo de panela, água, forno de convecção ou óleo) e no centro geométrico do alimento (exceção das amostras assadas uma vez que não é possível fixar termopar no centro geométrico do alimento acondicionado em sistema fechado como um forno). Os termopares foram conectados a indicadores digitais de temperatura modelo GC 2000 I (G Controls sistemas Ltda). Assim que concluída a cocção cada hambúrguer foi pesado e efetuado o cálculo do rendimento de acordo com USDA, 2012: $\text{rendimento (\%)} = 100 \times (\text{massa da amostra cozida e ainda quente} / \text{massa da amostra crua})$. Uma triplicata de hambúrgueres inteiros foi separada para análises de cor e sensorial. Amostras cozidas foram moídas e conservadas a -18°C por um mês, para as análises de carboximetilisina e composição nutricional. Para as demais análises as amostras foram liofilizadas, acondicionadas em embalagens plásticas (Cryovac, Sealed air, São Paulo, SP) e mantidas a -18°C até análise.

Quadro 1. Condições de processamento térmico para os diferentes tratamentos da carne bovina

Tratamento	Tipo de calor empregado	Pré-preparo	Preparo	Nº de hambúrgueres por vez	Temperaturas finais no centro geométrico	Nº de replicatas	Nº total hambúrgueres
Grelhado	Seco	Adição de 2,5% óleo soja para grelhar	Temperatura da panela: 150 °C. Quando o centro geométrico alcançou 30 °C, o hambúrguer foi trocado de lado de 1 em 1 minuto até alcançar a temperatura final	1	60 °C 70 °C 80 °C 90 °C 100 °C	6	30
Cozido com água	Úmido	Adição de 500 mL de água para cada hambúrguer	Adicionada a carne e iniciada cocção quando a temperatura da água alcançou 95 °C; quando o centro geométrico alcançou 30 °C, o hambúrguer foi trocado de lado de 2 em 2 minutos até alcançar a temperatura final	1	60 °C 70 °C 80 °C	6	18
Assado	Seco	Não houve	Carne assada em forno doméstico a gás, mantido a 180 °C (chama baixa), 240 °C (chama média) e 300 °C (chama alta) por 30 minutos	2	Na	6	36
Empanado e frito	Seco	Cada hambúrguer foi empanado com 5g de ovo em pó reconstituído e 10g de farinha de trigo. Adicionado 400g de óleo de soja para fritura	Adicionada a carne e iniciada cocção quando a temperatura do óleo alcançou 180 °C; quando o centro geométrico dos hambúrgueres alcançou 30 °C, foram trocados de lado de 2 em 2 minutos até alcançar a temperatura final	1	60 °C 70 °C 80 °C 90 °C 100 °C	6	30

Na - não se aplica

4.2.3. Composição nutricional

As análises de composição centesimal seguiram metodologia da AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (2005):

- Umidade: dessecação em estufa a 105 °C até peso constante (método 950.46);
- Cinzas: calcinação em mufla a 550 °C por 12 horas (método 920.153);
- A porcentagem de nitrogênio foi obtida pelo método de Micro-Kjedahl e utilizado o fator de conversão para proteína de 6,25 (método 928.08);
- Lipídeos totais: extração com éter de petróleo em extrator Soxhlet (método 991.36);
- O teor de carboidratos totais foi calculado pela diferença entre 100 e a soma dos demais componentes.

4.2.4. Furosina

A determinação de furosina seguiu metodologia de POMPEI e SPAGNOLELLO, 1997. Uma alíquota de 50 mg de amostra (quantidade com 40mg de proteína) foi hidrolisada com 8 mL de HCl 8 M por 23 horas a 110 °C em tubos rosqueados com atmosfera modificada por adição de gás nitrogênio (2 min) e filtrados em filtro Millex®, com membrana PVDF e poro 0,45 µm. O hidrolisado filtrado (500 µL) foi submetido à extração de fase sólida (SPE), cartucho C18 Sep-Pak Vac 3cc (500 mg) Waters, pré- acondicionado com 5 mL de metanol e 5 mL de água. A amostra foi eluída com 3 mL de HCl 3M.

A determinação foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de fase reversa 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). Foi empregada coluna Shim-Pack VP-ODS-2 (25 cm x 0,5 cm x 5 μ m), ácido acético 0,4% como fase móvel em eluição isocrática com fluxo de 0,8 mL/min, volume de injeção de 20 μ L e forno de coluna a 30 $^{\circ}$ C. A identificação se baseou em comparação com tempo de retenção e espectro de absorção do padrão externo furosina (Polypeptide, SC494) em comprimento de onda de 280 nm. O tempo de retenção foi 4,1 minutos.

4.2.5. Compostos fluorescentes

Para análise das substâncias fluorescentes (livres e totais) foi empregado método proposto por MORALES e VAN BOEKEL, 1997, com pequenas modificações em relação ao tempo para reidratação e homogeneização das amostras.

Na extração dos compostos fluorescentes livres 5 mL de água foi acrescentado a 50 mg da amostra liofilizada, seguido de homogeneização em micro-turrax (Marconi, MA102, São Paulo –SP) e mantido por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, foi efetuada desproteinização com 5 mL de ácido tricloroacético (40 %), e centrifugação (13.000 g, por 10 minutos a 4 $^{\circ}$ C), o sobrenadante recolhido e efetuada a leitura. Para medição dos compostos fluorescentes totais (compostos livres e ligados a proteínas), 50 mg de amostra foram hidrolisadas com 2 mL da solução de enzima pronase E (64 U.mL⁻¹ em tampão borato de sódio, pH 8,2) por 36 horas a 40 $^{\circ}$ C em banho com agitação, centrifugadas (13.000 g, por 10 minutos a temperatura ambiente), o sobrenadante filtrado (0,45 μ m) e efetuada a leitura.

A fluorescência foi medida em comprimentos de onda de 347 nm de excitação e 415 nm de emissão em leitor de fluorescência de placas (Spectramax, M5, Molecular Devices). A linearidade da resposta fluorescente foi verificada com curva de 7 pontos de sulfato de quinino (concentração de 0,25 a 1 μ g/mL em H₂SO₄ 0,1 N) e estabelecido como 100% de intensidade fluorescente (IF) a leitura da concentração de 1 μ g/mL.

4.2.6. Indicador inespecífico das fases inicial e final da RM - absorbância

No mesmo extrato usado para a determinação dos compostos fluorescentes totais, descrito em 4.2.4., foi realizada leitura da absorbância nos comprimentos de onda 280 e 420 nm, tal medida constitui indicador não específico para PRM de fase inicial (280 nm) e final (420 nm) (DELGADO-ANDRADE et al., 2010).

4.2.7. Acrilamida

As amostras de carne cozida: grelhada 100 °C, empanada e frita 100 °C e assada 300 °C foram enviadas ao laboratório Eurofins, que possui certificação para a análise de acrilamida, executada por HPLC/MS-MS.

4.2.8. CML e lisina

4.2.8.1. Extração de CML e lisina das amostras

Foi utilizado protocolo criado por NIQUET-LÉRIDON e TESSIER (2011), no qual a extração consiste em 3 etapas, a seguir:

a) Redução das amostras

Em uma quantidade de amostra sólida em base úmida equivalente a 20 mg de proteína foram adicionados 4 mL de tampão borato de sódio (0,2 M, pH 9,2) seguido de homogeneização em micro-turrax; Foi adicionado 1 mL de borohidreto de sódio (2 M em

NaOH 0,1 N) (concentração final de 0,4 M de borohidreto no meio) e as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 4 horas.

b) Hidrólise proteica

O volume total de 5 mL das amostras reduzidas foi transferida para um tubo de vidro rosqueado Pyrex, e adicionados 5 mL de ácido clorídrico fumegante para ser atingida no tubo de hidrólise a concentração de HCl de 6 M. As amostras foram transferidas para um bloco digestor e mantidas por 20 horas a 110 °C.

c) Extração em fase sólida

Uma alíquota de 100 µL de hidrolisado proteico foi seca em um concentrador a vácuo (Centrivap Labconco) a 99 °C por 1 hora e o resíduo reconstituído em 250 µL de uma solução contendo os padrões internos CML-d4 (2,0 µg/ mL) e Lisina-d4 (40 µg/ mL). O hidrolisado com padrão interno foi submetido à extração por fase sólida em cartucho Oasis HLB (1cc 30 mg) Waters pré-acondicionado com 1 mL de metanol e 1 mL de NFPA (ácido nonafluoropentanóico) 10 mM. A amostra foi eluída com 1 mL de NFPA 10 mM em metanol (50:50 v/v). Uma alíquota de 500 µL do eluato foi evaporada sob vácuo (Centrivap Labconco) a 99 °C por 40 minutos, reconstituída em 200 µL de NFPA 5 mM, filtrada (filtros PVDF 0,22 µm Millipore) e injetada.

4.2.8.2. Separação e identificação de CML e lisina das amostras

A separação de CML e lisina foi realizada em UPLC Agilent modelo 1200 SL, acoplado a um detector de massas quadrupolar com fonte de íons *eletrospray* à pressão atmosférica (API-ESI) operada em modo positivo, modelo Agilent 6150. Foi empregada

coluna de fase reversa Agilent Zorbax SB-C18 (2,1 mm x 50 mm x 1,8 µm) com forno de coluna mantido a 10 °C. As fases móveis foram: eluente A: NFPA aquoso 10 mM; eluente B: acetonitrila, em gradiente de eluição: eluente A (100%) mantido por 3 minutos, seguido de um gradiente linear de 100% de A para 50% de A em 3 minutos. Mantidos 50% A e 50% B por 6 minutos e então em 13 minutos estabelecido B 100% por 4 minutos para realizar limpeza da coluna intra-corrída. Ao final voltou-se para 100% de A para iniciar nova corrida. O fluxo foi de 0,2 mL/min, tempo total de corrida 20 minutos e o volume de injeção 10 µL (ASSAR et al., 2009; NIQUET-LERIDON e TESSIER, 2011).

As condições de operação do detector de massas foram padronizadas (apêndice 1): temperatura da fonte de íons: 350 °C, fragmentação (voltagem do cone): 60 eV (CML e CML-d4) e 50 eV (lisina e lisina d4), voltagem do capilar: 3 kV, fluxo de gás secante (nitrogênio) a 8 L/min e pressão de nebulização (nitrogênio) a 35 psi. Foram monitorados no modo SIM (*selected ion monitoring*) os íons m/z 209 e m/z 82 no sinal 1 (CML d4), m/z 205 e m/z 84 no sinal 2 (CML); m/z 147 e m/84 no sinal 3 (lisina) e m/z 151 e m/z 88 no sinal 4 (lisina d4).

4.2.9. Análise instrumental de cor

A avaliação da cor nos diferentes tratamentos foi avaliada no aparelho Color Quest (Hunter Lab), adotando-se o sistema CIELab, com ângulo de observação de 10° e iluminante padrão D65, que corresponde à luz natural do dia. Foram medidos os valores de L* ou luminosidade (preto 0/branco 110), a* (verde-/vermelho+) e b* (azul-/amarelo+) (CIE COLORIMETRIC COMMITTEE, 1974; MCLAREN, RIGG, 1976). Como a distribuição de cor característica dos hambúrgueres cozidos não é homogênea foram realizadas cinco medidas

em diferentes pontos de cada hambúrguer, totalizando então 15 medidas para cada temperatura.

4.2.10. Análise sensorial do atributo cor

O grau de aceitação da cor das amostras de carne cozidas foi avaliado por meio de teste afetivo laboratorial com uso de uma escala hedônica estruturada de 5 pontos (1- desgostei muito; 3-não gostei, nem desgostei; 5- gostei muito; apêndice 3) e a participação de 60 avaliadores não treinados, consumidores de carne bovina, recrutados em função de interesse e disponibilidade, no Laboratório de Análise Sensorial da escola SENAI “Horácio Augusto da Silveira”.

No recrutamento foi orientado aos avaliadores para não realizarem degustação da carne, pois emitiriam opinião a respeito da cor, através de inspeção visual das amostras. A análise foi conduzida em cabines individuais com luz branca, e três amostras de diferentes temperaturas (aleatorizadas e codificadas), do mesmo tratamento, foram apresentadas aos blocos, seguindo a sequência: grelhados, empanados e fritos, assados e cozimento com água. Os avaliadores foram instruídos a indicar com luz vermelha quando concluído um bloco (ou tratamento) e então era apresentado um novo bloco. Dessa maneira cada avaliador emitiu opinião sobre 12 amostras no total, dos quatro tratamentos (MEILGAARD et al., 1999).

A cor da carne foi considerada aceita quando a maioria dos avaliadores ($\geq 50\%$) assinalou os resultados 4 (“gostei”) ou 5 (“gostei muito”) (PINTO E SILVA e ATZINGEN, 2010).

4.2.11. Análise estatística

A comparação entre os tratamentos foi realizada pela Análise de Variância ANOVA – *one way*, para amostras independentes, seguida de teste de Tukey. A associação entre os marcadores da RM e a formação de cor na carne cozida foi avaliada empregando-se análise de correlação de Pearson. Foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e as análises foram executadas com auxílio do *software* Statistica Statsoft (versão 12.0).

4.2.12. Aspectos éticos

Aos sujeitos de pesquisa foram garantidos participação livre e sigilo, bem como sua desistência a qualquer instante. Essa análise obteve autorização do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública – USP (FSP/USP) e da escola SENAI (anexos 1 e 2).

No que concerne à ética ambiental, os resíduos gerados foram descartados conforme as boas práticas e plano de gestão de resíduos químicos da FSP/USP. Os principais resíduos gerados foram: metanol, acetonitrila, ácidos acético, clorídrico, tricloroacético e nonafluoropentanóico.

5. Resultados e discussão

5.1. Padronização dos tratamentos térmicos da carne bovina

Para padronização dos tratamentos foram monitorados: a temperatura inicial dos hambúrgueres, o tempo necessário para seu centro geométrico alcançar a temperatura final do experimento e o rendimento, ilustrados na tabela 3. A temperatura inicial da carne oscilou entre 6,5⁰C e 10⁰C e observaram-se valores baixos dos Coeficientes de Variação obtidos para o tempo total de cada tratamento e para o rendimento. O controle sistemático dessas variáveis em conjunto com o número pequeno de ingredientes utilizado permitiu minimizar a variabilidade intrínseca a procedimentos de cocção doméstica (DELGADO-ANDRADE et al., 2010).

Rendimentos menores foram observados na carne grelhada, empanada e frita e assada (tabela 3), uma vez que esses métodos resultam em perda de massa devido à desidratação (ALFAIA et al., 2010). No tratamento cozido, os rendimentos de 73-80 % estão relacionados à redução da capacidade de retenção de água, resultado da desnaturação proteica e contração do colágeno. Tradicionalmente as perdas de massa ocasionadas pela cocção de carne em baixas temperaturas, de 50 ⁰C a 58 ⁰C estão relacionadas com a desnaturação da α -actina e miosina enquanto que perdas observadas na faixa 58 ⁰C a 65 ⁰C são atribuídas à contração do colágeno. Em temperaturas mais altas, as perdas são explicadas tanto pela contração do colágeno quanto pela contração de proteínas miofibrilares (OILLIC et al., 2011). O rendimento observado para a carne cozida é semelhante ao publicado em tabelas de composição de alimentos (USDA, 2012). A temperatura mais alta observada no tratamento cozido foi 80 ⁰C. Acima deste ponto a água de cocção evapora significativamente, descaracterizando a cocção úmida. Imagens dos hambúrgueres podem ser visualizadas no quadro 2.

Tabela 3. Parâmetros controlados para padronização dos tratamentos térmicos em carne bovina*

Tratamentos	Temperatura inicial (°C)	CV (%)	Tempo de cocção (min)	CV (%)	Rendimento (%)	CV (%)
<i>Assado</i>						
180 °C	10,0 (0)	0	30	NA	67 (3,7)	5,5
240 °C	9,7 (0,5)	5,1	30	NA	58 (4,2)	7,2
300 °C	10,0 (0)	0	30	NA	44 (2,3)	5,2
<i>Cozido</i>						
60 °C	7,0 (1,0)	14,3	4,4 (0,2)	5,7	80 (2,0)	2,5
70 °C	7,7 (0,6)	7,8	5,8 (0,4)	7,3	79 (1,1)	1,4
80 °C	7,7 (0,6)	7,8	5,0 (0,3)	6,8	73 (3,1)	4,2
<i>Empanado e frito</i>						
60 °C	8,5 (0,7)	8,2	3,1 (0,5)	15,3	90 (3,7)	4,1
70 °C	9,5 (0,7)	7,4	4,3 (0,6)	13,9	83 (1,2)	1,4
80 °C	9,0 (1,4)	15,5	5,4 (0,6)	11,0	77 (0,7)	0,9
90 °C	6,5 (0,7)	10,8	5,6 (0,3)	5,2	79 (4,8)	6,1
100 °C	8,0 (1,4)	17,5	13,0 (1,0)	7,7	64 (1,6)	2,5
<i>Grelhado</i>						
60 °C	9,0 (0)	0	5,3 (0,1)	2,3	86 (2,5)	2,9
70 °C	8,7 (0,5)	5,7	6,6 (0,3)	3,9	85 (6,6)	7,8
80 °C	7,2 (0,5)	6,9	8,3 (0,7)	8,4	81 (3,5)	4,3
90 °C	7,5 (1,0)	13,3	10,2 (0,5)	5,3	75 (1,9)	2,5
100 °C	8,5 (1,0)	11,8	12,5 (0,5)	4,0	67 (2,0)	3,0

* Dados são média (DP). NA – não se aplica ao tratamento. CV = Coeficiente de variação; n=6

Quadro 2. Fotos dos hambúrgueres após diferentes tratamentos térmicos

	60°C	70°C	80°C	90°C	100°C
GRELHADO
EMPANADO E FRITO
COZIDO COM AGUA
		180°C	240°C	300°C	
ASSADO

5.2. Composição nutricional do hambúrguer em função do tratamento

A composição dos alimentos é um dos fatores que interferem na formação de PRM, e como a carne é uma matriz com teor de açúcares muito baixo, possivelmente os teores de lipídeos e de proteínas influenciarão no curso da reação e na quantidade/diversidade de produtos formados (CHEN e SMITH, 2015). Por isso foi determinada a composição nutricional das carnes crua e submetidas aos diferentes tratamentos térmicos, que está ilustrada nas tabelas 4, 5, 6 e 7.

O teor de lipídeos da carne crua utilizada foi 4,4%, menor do que o encontrado na Tabela brasileira de composição de alimentos (TACO). No presente trabalho a gordura aparente foi meticulosamente removida, o que explica a diferença no teor de lipídeos (4,4%) quando comparado com a TACO (8,7%) (TACO, 2011) e permite sua classificação como carne extra - magra (lipídeos abaixo de 5 %, USDA, 2012).

Uma diminuição gradual do teor de umidade ocorreu em paralelo ao aumento da temperatura nas carnes assadas, grelhadas e empanadas e fritas (tabelas 4, 5 e 7), uma vez que são técnicas de cocção com uso de calor seco, que desidratam o alimento (ALFAIA et al., 2010). O comportamento da umidade no cozimento com água (tabela 6) foi diferente e já era esperado, houve apenas um pequeno decréscimo de umidade entre a carne crua e as cozidas, semelhante às observações de BADIANI et al. (2002) em *infraespinatus* (raquete – parte da paleta), e de MODZELEWSKA-KAPITULA et al. (2012) em *semimembranosus* (coxão mole).

As alterações observadas em função dos diferentes tipos de tratamento para carne são bem relatadas na literatura: a maioria dos nutrientes tem sua concentração aumentada como consequência da perda de umidade durante o cozimento (BADIANI et al., 2002; ALFAIA et al., 2010; MODZELEWSKA-KAPITULA et al., 2012; JENSEN et al 2014), com exceção de

carnes com teor elevado de lipídeos (5 a 20%), nas quais o cozimento acarreta a perda desse componente por liquefação (BOGNAR, 1998; GERBER et al., 2009).

Os dados de proteína em base seca (tabela 8) foram usados para expressar os resultados de furosina, carboximetilisina e de lisina em relação à proteína.

Tabela 4. Composição centesimal (g/ 100 g – base úmida) de carne bovina (coxão mole) assada a diferentes temperaturas*

Amostra	Temperatura	Lipídeos	Cinzas	Proteínas	Umidade	Carboidratos
Crua	-	4,4 (0,3)a	1,8 (0,3)a	19,1 (0,0)a	73,6 (0,4)a	1,0
Assada	180°C	3,5 (0,0)a	2,2 (0,3)a	40,2 (7,0)b	52,6 (0,5)b	1,5
Assada	240°C	3,6 (0,7)a	3,5 (0,6)b	43,1 (1,3)b	50,5 (0,0)c	0,0
Assada	300°C	5,5 (0,8)a	4,9 (0,4)c	61,6 (2,2)c	31,4 (1,0)d	0,0

*valores ilustrados são média (DP); Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0,05). ANOVA ONE-WAY seguido de teste de Tukey, n=3

Tabela 5. Composição centesimal (g/ 100 g – base úmida) de carne bovina (coxão mole) grelhada*

Amostra	Temperatura	Lipídeos	Cinzas	Proteínas	Umidade	Carboidratos
Crua	-	4,4 (0,3)a	1,8 (0,3)a	19,1(0,0)a	73,6(0,4)a	1,0
Grelhadas	60°C	2,6 (0,2)a	1,7 (0,3)a	23,0(0,1)b	71,6(0,2)b	1,1
Grelhadas	70°C	2,8 (0,8)a	2,5 (0,1)b	25,3(0,6)bc	70,3(2,1)c	0,0
Grelhadas	80°C	4,3 (0,1)a	2,5 (0,5)b	27,4(0,2)cd	67,0(0,0)d	0,0
Grelhadas	90°C	4,4 (0,8)a	2,6 (0,2)b	28,4(0,2)d	62,7(0,3)e	2,0
Grelhadas	100°C	9,0 (2,6)b	3,9 (0,1)c	32,7(0,5)e	56,3(0,3)f	0,0

*valores ilustrados são média (DP); Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0,05). ANOVA ONE-WAY seguido de teste de Tukey, n=3

Tabela 6. Composição centesimal (g/ 100 g – base úmida) de carne bovina (coxão mole) cozida em água*

Amostra	Temperatura	Lipídeos	Cinzas	Proteínas	Umidade	Carboidratos
Crua	-	4,4 (0,3)a	1,8 (0,3)a	19,1 (0,0)a	73,6 (0,4)a	1,0
Cozida em água	60°C	2,4 (2,6)a	1,5 (0,4)a	22,2 (0,7)ab	71,1 (0,6)b	2,9
Cozida em água	70°C	2,6 (1,2)a	2,1 (0,2)a	22,4 (1,0)ab	71,8 (0,1)b	1,2
Cozida em água	80°C	2,8 (0,1)a	1,6 (0,1)a	25,2 (0,6)b	69,3 (0,0)c	1,0

*valores ilustrados são média (DP); Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$). ANOVA ONE-WAY seguido de teste de Tukey, $n=3$

Tabela 7. Composição centesimal (g/ 100 g – base úmida) de carne bovina (coxão mole) empanada e frita*

Amostra	Temperatura	Lipídeos	Cinzas	Proteínas	Umidade	Carboidrato
Crua empanada	-	2,1 (0,7)a	1,8 (0,2)a	18,4 (0,8)a	66,1 (0,4)a	11,6
Empanada e Frita	60°C	10,8 (0,8)b	1,7 (0,0)a	21,9 (0,9)b	60,3 (0,4)b	5,2
Empanada e Frita	70°C	10,7 (1,5)b	2,0 (0,2)a	22,8 (0,9)b	56,5 (0,7)c	8,0
Empanada e Frita	80°C	9,5 (0,4)b	0,9 (0,6)a	23,1 (0,7)b	54,3 (0,3)d	12,3
Empanada e Frita	90°C	11,1 (1,3)b	1,3 (0,1)a	28,4 (0,5)c	51,1 (0,0)e	8,1
Empanada e Frita	100°C	15,0 (3,0)c	1,2 (0,1)a	31,9 (0,3)d	41,0 (0,6)f	9,8

*valores ilustrados são média (DP); Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$). ANOVA ONE-WAY seguido de teste de Tukey, $n=3$

Tabela 8. Teor de proteínas (g/100 g amostra seca) encontrado em carne bovina (coxão mole) submetida a diferentes métodos de cocção*

Tratamento	Assada	Grelhada	Cozida	Empanada e Frita
Crua	72,5 (0,0)	72,5 (0,0)	72,5 (0,0)	-
Crua empanada	-	-	-	54,2 (2,3)
60°C	-	81,0 (0,5)	76,6 (2,4)	55,2 (2,3)
70°C	-	85,2 (2,0)	79,2 (3,4)	52,4 (2,1)
80°C	-	82,9 (1,0)	82,2 (2,0)	50,4 (1,6)
90°C	-	76,1 (3,2)	-	58,0 (1,0)
100°C	-	74,7 (1,1)	-	54,0 (0,5)
180°C	84,8 (7,0)	-	-	-
240°C	87,2 (2,6)	-	-	-
300°C	89,8 (3,2)	-	-	-

*valores ilustrados são média (DP)

5.3. Furosina

Os parâmetros de validação da análise de furosina estão expostos no apêndice 2 e os cromatogramas no apêndice 3. O teor de furosina (FUR), expresso por 100 g de alimento consumido (base úmida, necessário para estimar a ingestão desse composto) está ilustrado na tabela 9.

Foram detectados 1,2 e 4,3 mg FUR/100 g de alimento consumido na carne crua e na carne crua empanada, respectivamente (tabela 9). A adição de ovo em pó (contendo 100,8 mg FUR/100 g) à carne justifica o valor maior de FUR encontrado na carne crua empanada; na farinha de trigo branca, também adicionada para empanar, FUR não foi detectada.

Tabela 9. Conteúdo de furosina (mg/ 100 g de alimento consumido) em carne bovina cozida*

	Grelhado	Cozido	Empanado e frito	Assado
CRUA	1,2 (0,5)	1,2 (0,5)	4,3 (0,3)	1,2 (0,5)
60 °C	10,7 (1,2)	0,5 (0,0)	6,5 (0,4)	-
70 °C	11,0 (0,8)	0,9 (0,2)	6,8 (0,7)	-
80 °C	15,1 (1,0)	1,0 (0,2)	14,2 (2,1)	-
90 °C	14,1 (2,5)	-	8,5 (1,3)	-
100 °C	10,0 (1,2)	-	11,8 (0,7)	-
180 °C	-	-	-	8,9 (0,5)
240 °C	-	-	-	14,0 (1,3)
300 °C	-	-	-	17,6 (1,8)

* Dados expressos são média (DP), n=6

A concentração de furosina (FUR) é o indicador mais específico e importante do estágio inicial da RM, e frequentemente usado como um marcador para avaliar a severidade do tratamento térmico em alimentos como leite pasteurizado ou esterilizado, cereais, mel, fórmulas lácteas infantis e suplementos consumidos por atletas (ERBERSDOBLER e SOMOZA, 2007).

Os métodos de cocção grelhar, fritar e assar, independentemente da temperatura, resultaram em formação de FUR dez vezes maior que o cozimento em água (figura 7). O valor de furosina aumentou entre as temperaturas de 60 °C e 80 °C e diminuiu em 90 °C e 100 °C nas carnes grelhadas e também nas empanadas e fritas ($p < 0,05$). Esta diminuição nos valores de FUR deve-se a degradação desse composto e indica que novo estágio da RM foi alcançado, com a formação de compostos intermediários (POMPEI e SPAGNOLELLO, 1997; ZILIC et al., 2014). Os níveis mais elevados de FUR foram encontrados a 80 °C: 60,5 mg FUR/ 100 g de proteína para a carne grelhada e 77 mg FUR/ 100 g de proteína para a carne empanada e frita.

A formação de FUR no tratamento assado indica um aumento significativo entre 180 °C e 240 °C, permanecendo constante após 240 °C. O nível mais alto de FUR encontrado na carne assada, de 28,3 mg FUR/ 100 g de proteína, é menor do que os valores encontrados na carne grelhada e empanada e frita, porque em condições de aquecimento mais drásticas, é esperado que os produtos iniciais da RM já tenham sido degradados (DELGADO-ANDRADE et al., 2007). A carne foi assada por 30 minutos enquanto que o tempo máximo de cocção alcançado com os outros métodos de cocção por calor seco foi 13 minutos (fritar), sendo assim, assar foi o tratamento térmico mais severo empregado (180 °C, 240 °C ou 300 °C por 30 minutos), e, os dados obtidos para furosina indicam que produtos de etapas intermediárias e avançadas sejam marcadores mais adequados da RM para esse tratamento. ROLDAN et al. (2015) relataram valores de furosina similares para lombos de cordeiro assados em forno, 29,4 mg de furosina/ 100 g de proteína.

Figura 7. Teor de furosina (mg/ 100 g de proteína) em carne bovina cozida. Dados expressos em base seca, médias com barras de desvio padrão. Letras diferentes no mesmo tratamento diferem estatisticamente ($p < 0,05$). ANOVA-ONE WAY seguido de teste de Tukey, $n=6$

5.4. Compostos fluorescentes

O baixo valor de compostos fluorescentes livres (entre 0,6 e 14,3%) (Figura 8) resultou em insuficiente precisão da análise (valores elevados para desvio-padrão relativo), o que é inadequado para avaliação estatística desses resultados por ANOVA. O baixo teor de açúcares da matriz não favorece a formação de compostos fluorescentes livres, explicando o observado.

Figura 8. Formação de compostos fluorescentes livres em carne bovina submetida a diferentes meios de cocção. Valores ilustrados são: média e barra com desvio-padrão, n=6. Sulfato de quinino 1 µg/mL em H₂SO₄ 0,1 N equivale a 100% de intensidade de fluorescência

O valor de compostos fluorescentes totais (livres e ligados covalentemente à proteína - figura 9), expresso em intensidade de fluorescência, equivaleu a dez vezes o de compostos fluorescentes livres, corroborando observações prévias em sistemas modelo com glicose ou

lactose adicionados de caseína e aquecidos (FERRER et al., 2005; BOSCH et al., 2007) em cereais matinais (DELGADO-ANDRADE et al., 2006) e em alimentos brasileiros como café, cereais matinais, leite em pó e gelatina dietética (BASTOS et al., 2011).

No estágio inicial da RM, compostos não fluorescentes são formados a partir do rearranjo de Amadori, e com o avanço da RM redutonas sem cor e compostos fluorescentes serão formadas a partir da desidratação e clivagem do primeiro. A formação dos compostos fluorescentes monitorados pelos comprimentos de onda 347 nm excitação e 415 nm emissão se inicia na fase intermediária da RM, ou seja, antes da formação de melanoidinas, e progride paralelamente à formação destes pigmentos marrons na fase avançada, por essa razão essas substâncias são também chamadas de compostos intermediários fluorescentes (MORALES e VAN BOEKEL, 1997; MORALES e JIMENEZ-PEREZ, 2001; RUFIÁN-HENARES et al., 2009).

A formação de compostos fluorescentes aumentou exponencialmente em função da temperatura nos tratamentos grelhado e assado ($R^2 = 0,987$ para o grelhado e $R^2 = 0,973$ para o assado), como mostra a figura 9. Para as amostras empanadas e fritas, a IF permaneceu constante entre o momento inicial e a temperatura interna de 70 °C, e, a temperatura de 80 °C resultou em valores de IF 3 vezes maiores. Os resultados obtidos para os compostos fluorescentes estão alinhados com os dados obtidos para furosina e indicam que grelhar e fritar em temperaturas maiores que 80 °C resultam em diminuição dos valores de furosina, acompanhado de aumento nos compostos fluorescentes, ou seja, a etapa intermediária da RM está em curso.

Figura 9. Formação de compostos fluorescentes totais (livres e ligados à proteína) em carne bovina submetida a diferentes meios de cocção. Valores ilustrados são: média e barra com desvio-padrão. Sulfato de quinino 1 µg/mL em H₂SO₄ 0,1 N estipulado como 100% de intensidade de fluorescência. Letras diferentes nas barras diferem estatisticamente ($p < 0,05$) – ANOVA ONE WAY para amostras independentes seguido de teste de Tukey, $n=6$

A formação de compostos fluorescentes foi três vezes menor para a carne cozida em água, comparado aos métodos de cocção por calor seco, porque, além dos reagentes estarem diluídos em água, no cozimento a temperatura interna não ultrapassa 80 °C. É bem estabelecido que métodos de cocção por calor seco como grelhar, fritar, assar promovem uma formação maior de PRM comparado a cocção úmida como cozidos, ensopados ou uso de vapor (CHAO et al., 2009; DELGADO-ANDRADE et al., 2010; URIBARRI et al., 2010; HULL et al., 2012; YAMAGUCHI et al., 2012).

Os compostos fluorescentes são reconhecidos como importantes marcadores da RM desde 1942, quando PEARCE e THISTLE propuseram que a fluorescência gerada em um sistema modelo-alimento (baseado em extrato de ovos desidratados) poderia ser usada como um indicador de qualidade/deterioração durante a estocagem. Desde então, métodos baseados

na medida da absorbância e da fluorescência no espectro visível foram largamente utilizados, pois são técnicas rápidas e de fácil aplicação que permitem monitorar a extensão global da RM tanto em alimentos quanto em sistemas biológicos (MATIACEVICH et al., 2005; DELGADO-ANDRADE et al., 2006). Ainda que as rotas de formação desses compostos não sejam bem compreendidas, e muitos deles não apresentem estrutura química conhecida, os comprimentos de onda de excitação e emissão típicos são importantes propriedades para caracterizar os compostos fluorescentes da RM (excitação 340-370 nm e emissão 420-440 nm) (MATIACEVICH et al., 2005; BOSCH et al., 2007).

Os compostos fluorescentes já foram utilizados como indicadores de modificação das proteínas devido a tratamento térmico severo em leite (MORALES et al., 1996), fórmulas enterais (RUFÍAN-HENARES et al., 2002), cereais (DELGADO-ANDRADE et al., 2006) e dietas tipicamente consumidas por adolescentes (DELGADO-ANDRADE et al., 2007).

Não há informações sobre a formação destes compostos em carnes, os resultados obtidos neste trabalho são pioneiros e indicam a importância dos meios de cocção na formação de produtos da RM e a utilidade da medida de fluorescência como um indicador rápido para avaliar a extensão do dano causado pelo tratamento térmico às proteínas em alimentos.

5.5. Indicador inespecífico das fases inicial e final da RM

Na etapa inicial da RM, açúcares redutores reagem com aminoácidos resultando em compostos sem cor que não absorvem no espectro visível. É possível monitorar esses compostos iniciais de baixo peso molecular com a medida da absorbância a 280 nm. O

progresso da RM envolve a produção de compostos com alto peso molecular, chamados melanoidinas, que possuem cromóforos com pico de absorção em 420 nm (DELGADO-ANDRADE et al., 2010). Então, as medidas de absorbância a 280 nm e a 420 nm receberam as denominações “compostos da fase inicial da RM” e “compostos da fase final da RM”, respectivamente.

As leituras dos compostos da fase inicial foram de 10 a 20 vezes maiores que os da fase final para todos os tratamentos (Figuras 10 e 11), indicando uma predominância de PRM de fase inicial na carne cozida. O uso de diferentes temperaturas para cozinhar a carne em água não alterou a leitura dos compostos, como esperado, pois a formação de PRM neste tipo de cocção é muito baixa.

Houve um aumento ($p < 0,05$) de 0,8 unidades na leitura dos compostos de fase inicial entre o momento zero (60 °C) e o final (100 °C) nas carnes grelhadas e nas empanadas e fritas. Para os compostos da fase final o incremento foi de apenas 0,1 unidades na leitura destes dois tratamentos, o que também aponta formação importante dos compostos de fase inicial. O valor mais alto da absorbância a 420 nm foi medido na carne assada a 300 °C (0,19), resultado justificado pela condição de cocção mais severa. Na carne assada foi observado o maior incremento de absorbância entre a temperatura inicial e final do tratamento (0,2 unidades), indicando a possível presença de compostos da fase final da RM nessas condições.

Figura 10. Absorbância a 280 nm em carne cozida (n=6). Valores ilustrados são media e barras representam desvio-padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

Figura 11. Absorbância a 420 nm em carne cozida (n=6). Valores ilustrados são media e barras representam desvio-padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). b* indica diferença significativa com $p < 0,1$

A leitura dos compostos de fase inicial e final da RM por meio da absorvância realizando-se ou não digestão enzimática prévia nas amostras é considerada um bom indicador não específico da extensão da RM (DELGADO-ANDRADE et al., 2009), e interpretando-se esses resultados em conjunto com a formação de compostos fluorescentes, constata-se que os PRM de fase inicial predominam nas carnes grelhada e empanada/frita até a temperatura interna menor que 90 °C, e entre 90 °C e 100 °C bem como na carne assada entre 180 °C e 240 °C, há formação acentuada de compostos fluorescentes e, portanto, a etapa intermediária da RM está em curso, predominantemente.

5.6. Acrilamida e Carboximetilisina (CML)

Os parâmetros de validação para análise de carboximetilisina estão expostos no apêndice 2 e os cromatogramas no apêndice 3. As temperaturas mais elevadas empregadas na cocção da carne (grelhar e fritar – 100 °C e assar – 300 °C) resultaram em níveis baixos de acrilamida, de 32 – 61 µg de acrilamida/Kg de alimento (base seca) (tabela 10). Outros trabalhos relatados na literatura encontraram valores baixos deste contaminante em carne cozida, na faixa de 17 a 250 µg/ Kg (EEROLA et al., 2007, TAREKE et al., 2002, KAPLAN et al., 2009). Ao expressar os resultados em base úmida, verifica-se que o teor de acrilamida seria de 14 µg/ Kg de amostra para a carne grelhada e 41 µg/Kg para a amostra assada.

Os valores de acrilamida em carne cozida devem ser contabilizados na estimativa de ingestão diária (RIBOLDI et al., 2014), mas, considerando que o consumo médio de acrilamida na Europa varia de 13 a 47 µg/dia para homens e de 12 a 39 µg/dia para mulheres (XU et al., 2014), o consumo das carnes cozidas analisadas no presente estudo contribuiria muito pouco na ingestão total deste contaminante.

Tabela 10. Formação de carboximetilisina (CML) e acrilamida em carne bovina cozida*

Tratamentos	CML (mg/100 g alimento consumido)	CML (mg/100g base seca)	CML (mg/ Kg proteína base seca)	Acrilamida (µg/Kg alimento consumido)	Acrilamida (µg/Kg base seca)
Grelhado	nd ^a	nd ^a	nd ^a	14 ^c	32
Empanado/frito	nd ^a	nd ^a	nd ^a	<LQ ^b	< LQ ^b
Assado	0,8 (0,1)	1,2 (0,1)	13,4 (1,7)	41 ^c	61

*Valores são média (DP) (para CML) e média (para acrilamida). ^and= não detectado (LD CML = 0,03 mg/100 g). ^bLQ acrilamida = 30 µg/Kg. ^c Calculado considerando-se o teor de umidade da amostra **Grelhado - 100 °C; Empanado e frito - 100 °C; Assado - 300 °C**

O valor de CML na carne assada a 300 °C foi 0,8 mg/100 g de alimento consumido (tabela 10), CML não foi detectada em nenhuma das outras condições estudadas. A ausência de CML pode ser explicada pela quantidade elevada de proteína, baixa de açúcares redutores, baixo teor de lipídeos (abaixo de 5 %, tabelas 4, 5, 6 e 7) e pH ácido, característicos desta matriz e ainda, para grelhar ou fritar a temperatura interna da carne não ultrapassou 100 °C.

A formação de furosina (estágio inicial da RM) é predominante na carne grelhada e frita em temperatura interna menor que 90 °C, enquanto que, a 90 °C e 100 °C, a formação de compostos fluorescentes (indicador de estágio intermediário da RM) se eleva. A etapa final da RM (medida como CML) foi detectada apenas na carne assada a 300 °C por 30 minutos, a condição mais drástica de tratamento térmico estudada.

Apesar de valores elevados de CML terem sido relatados em carne cozida quando se empregou método de análise imunoquímico (ELISA) (GOLDBERG et al., 2004; URIBARRI et al., 2010), dados obtidos a partir de métodos instrumentais sensíveis e validados mostram que em carne cozida as concentrações de CML variam entre não detectado a valores muito baixos, corroborando com os resultados encontrados em coxão mole cozido. CHARRISSOU et al. (2007) que empregaram cromatografia gasosa acoplada a detector de massas, não detectaram CML em carne bovina grelhada, assada ou cozida mesmo com a presença de valores elevados de furosina, de 100 a 200 mg de furosina/100 g de proteína. O valor

1,1 mg de CML/100 g foi encontrado em carne bovina frita com teor inicial de lipídeos elevado (20%) (ASSAR et al., 2009).

O valor de CML em carne cozida analisada por cromatógrafos líquidos acoplados a detector de massas ou a detector arranjo diodos é no máximo 2,2 mg CML/100 g de alimento (ASSAR et al., 2009; CHAO et al., 2009; HULL et al., 2012; JOUQUAND et al., 2015, CHEN e SMITH, 2015). A adição de açúcares redutores no preparo de lombos de cordeiro cozidos também resultou em baixas concentrações de CML (4 mg CML/ 100 g de proteína) (ROLDAN et al., 2015).

Ao se comparar os valores de CML em diferentes grupos de alimento, constata-se que a carne cozida não é a principal fonte de CML, independentemente do método empregado para processamento. Entre os dados disponíveis na literatura até o momento, pós para preparo de bebidas achocolatadas (1,5 a 13,2 mg/100 g) (NIQUET-LERIDON e TESSIER, 2011), *doner kebab* (um prato de origem turca - 42,4 mg/ 100 g), chocolate em barras (4 – 7,0 mg/100 g) (HULL et al., 2012), leite evaporado (4,6 mg/100 g) e crosta de pão (4,6 mg/100 g) (ASSAR et al., 2009) são os alimentos com níveis mais elevados de CML.

Os resultados obtidos nesse estudo indicam que o consumo de carne cozida nas condições testadas não contribui significativamente para a ingestão de AGEs, pois o PRM indicador de fase avançada (CML) foi observado em uma quantidade muito pequena.

5.7. Lisina

Os parâmetros de validação para análise de lisina estão expostos no apêndice 2 e os cromatogramas no apêndice 3. O conteúdo de lisina não sofre alteração em função do tratamento, quando este dado é expresso por grama de lisina/100 gramas de amostra em base seca, indicando que não há perdas nutricionais relativas à qualidade proteica (tabela 11). O

valor de lisina da carne é da ordem de 2 a 4,6 g/100 g de amostra e a formação de furosina e CML (que envolvem a perda de lisina na RM) observada foi, no máximo, de 17 mg/100 g de amostra. A perda de lisina devido ao processamento térmico é importante para alimentos em que esse aminoácido é limitante, como cereais (RUFIAN-HENARES et al., 2009).

Tabela 11. Teor de lisina em carne bovina cozida*

Tratamentos	Lisina (g/ 100 g de alimento consumido)	Lisina (g/ 100 g – base seca)
<i>Assado</i>		
Crua	1,8 (0,2)	6,9 (0,9) a
180 °C	2,9 (0,2)	6,2 (0,5) a
240 °C	2,9 (0,3)	5,9 (0,6) a
300 °C	4,6 (0,7)	6,8 (1,1) a
<i>Cozido</i>		
Crua	1,8 (0,2)	6,9 (0,9) a
60 °C	2,4 (0,1)	8,5 (0,4) a
70 °C	2,4 (0,4)	8,4 (1,4) a
80 °C	2,6 (0,5)	8,7 (1,5) a
<i>Grelhado</i>		
Crua	1,8 (0,2)	6,9 (0,9) a
60 °C	2,1 (0,4)	7,5 (1,4) a
70 °C	2,1 (0,2)	7,1 (0,7) a
80 °C	2,5 (0,3)	7,6 (1,0) a
90 °C	2,6 (0,3)	7,0 (0,9) a
100 °C	2,9 (0,5)	6,6 (1,1) a
<i>Empanado e frito</i>		
Crua	1,5 (0,1)	4,4 (0,2) a
60 °C	2,3 (0,2)	5,9 (0,6) a
70 °C	2,6 (0,5)	6,0 (1,2) a
80 °C	2,5 (0,3)	5,5 (0,6) a
90 °C	3,0 (0,3)	6,1 (0,6) a
100 °C	3,0 (0,3)	5,0 (0,5) a

* Valores são média (DP). Letras diferentes na mesma coluna comparam cada tratamento ($p < 0.05$), one-way ANOVA e teste de Tukey, n=6

Um aparente decréscimo de lisina ocorreu nas amostras assadas, comparativamente à carne crua (figura 12), considerando-se o valor expresso por grama de proteína, conforme preconizado pela FAO para avaliar a qualidade aminoacídica. Esta perda aparente é devido à concentração de proteína (tabela 8 – resultados de composição centesimal), portanto, ao aumento do denominador. O teor de lisina da proteína padrão da FAO é 58 mg de lisina/ g de proteína, inferior ao da carne (FAO, 1985) .

Outros trabalhos com carne bovina apresentaram resultados semelhantes a este estudo (PIRES et al., 2006; JENSEN et al., 2014; JOUQUAND et al., 2015), e aos dados pesquisados em cortes de carne bovina, cruas e cozidas, na tabela do USDA (variam de 84 até 105 mg de lisina/g de proteína, dependentes do teor de lipídeos da carne) (USDA, 2013).

Perdas de lisina não foram detectadas na carne cozida, indicando que é possível preparar carne bovina usando cocção doméstica e preservar sua qualidade nutricional.

Figura 12. Teor de lisina em carne bovina cozida. Dados expressos em mg de lisina/ mg de proteína (base seca), médias com barras de desvio padrão. Letras diferentes no mesmo tratamento diferem estatisticamente ($p < 0,05$). ANOVA-ONE WAY seguido de teste de Tukey, $n=6$

5.8. Análise instrumental de cor da carne bovina cozida

Os valores do parâmetro luminosidade (L^*), que indica o eixo claro - escuro, diminuíram com o aumento da temperatura para os métodos de cocção por calor seco ($p < 0,05$), ou seja, as amostras se tornaram mais escuras quanto maior o tempo e temperatura empregados no tratamento térmico (tabela 12). Também, foi encontrada uma forte correlação inversa entre os compostos fluorescentes e L^* ($r = -0,9213$; $p = 0,026$ para carne grelhada; $r = -0,9171$; $p = 0,028$ para carne empanada e frita e $r = -0,992$; $p = 0,026$ para carne assada) o que corrobora a cor como um indicador não específico da extensão da RM (DELGADO-ANDRADE et al., 2007; ZILIC et al., 2014; CHENG et al., 2014). No tratamento de cocção úmida, não houve mudança deste parâmetro entre as diferentes temperaturas, como esperado. O parâmetro E é influenciado pelo brilho e descreve a proximidade ou distância entre duas amostras no gráfico de cor (HUNTER, HAROLD, 1987) e sua diminuição nos tratamentos de calor seco acompanha a queda de luminosidade devido à formação de pigmentos de cor marrom no decorrer da RM.

Não foram encontrados valores negativos para a^* , o que indicaria cor verde. Com o aumento da temperatura a cor dos hambúrgueres grelhados e assados se tornou mais vermelha (valores mais altos de a^*), de acordo com os resultados de DELGADO-ANDRADE et al. 2010 em pratos típicos da culinária espanhola, nos quais o valor de a^* é claramente deslocado para o componente vermelho, correspondendo ao desenvolvimento da RM. Há uma forte correlação positiva entre a^* e compostos fluorescentes ($r = 0,9272$; $p = 0,023$ para carne grelhada e $r = 1,000$; $p = 0,001$ para carne assada). Nas amostras empanadas e fritas, houve um aumento inicial nos valores de a^* , mas quando a temperatura interna alcançou 90 °C foi observada uma diminuição nessa coordenada. As mudanças na coordenada a^* para a carne cozida, apesar de possuírem significância estatística, são sutis e não tão pronunciadas quanto aquelas observadas na carne grelhada, frita ou assada.

Os valores elevados de b^* na carne empanada e frita até 90 °C indicam cor amarela intensa, desejável para alimentos fritos (HEREDIA et al., 2014). A diminuição da coordenada b^* para carne grelhada / frita a 100 °C e também para a assada a 300 °C mostra menor predominância do componente amarelo e uma proporção maior do componente azul, o que também pode ser visualizado pelos valores diminuídos de Chroma (C) nos tratamentos grelhado e empanado e frito.

Em geral alimentos tratados termicamente se tornam mais vermelhos e mais escuros com o aumento da temperatura e do tempo de aquecimento e, o desenvolvimento de cor é um indicador evidente e muito importante para avaliar a extensão da RM (DELGADO-ANDRADE et al., 2007; RUFIÁN-HENARES et al., 2009; DELGADO-ANDRADE et al., 2010; ZILIC et al., 2014; CHENG et al., 2014). Para batatas fritas, por exemplo, a coordenada a^* é considerada um bom indicador do teor de acrilamida gerado no processamento, com valores entre 0 e -5 considerados uma tonalidade ótima (HEREDIA et al., 2014).

Neste estudo os métodos de cocção causaram mudanças significativas no desenvolvimento da cor em carne, relacionadas com a formação de PRM (compostos fluorescentes), e os resultados obtidos podem explicar a importância dos procedimentos de cocção em alimentos na formação de PRM e reforçam a utilidade dos parâmetros HunterLab como marcadores inespecíficos da extensão da RM.

Tabela 12. Alterações da cor instrumental em carne bovina cozida^a

Tratamentos	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C	100 °C
Grelhado					
<i>L*</i>	53.1 (1.7)b	49.4 (1.6)c	47.8(1.8)a	47.1(1.7)a	44.3 (0.9)d
<i>a*</i>	2.6 (0.8)a	3.8 (0.7)b	5.2 (0.8)c	6.4 (0.8)d	6.5 (0.3)e
<i>b*</i>	10.8 (1.4)a	13.0 (1.2)c	12.2 (0.8)c	12.0 (0.9)c	9.7(0.9)b
<i>E^b</i>	54.2 (2.3)a	51.2 (2.1)b	49.6 (2.1)c	49.0 (2.1)c	45.8 (1.3)d
<i>C^c</i>	11.1 (1.6)a	13.5 (1.4)b	13.3 (1.1)b	13.6 (1.2)b	11.7 (0.9)a
Empanado e frito					
<i>L*</i>	64.3 (2.5)a	56.9 (2.8)b	47.3 (2.5)c	52.8 (3.1)d	41.8 (2.1)e
<i>a*</i>	3.1 (1.0)a	7.8 (1.4)b	11.9 (1.7)c	10.6 (1.0)d	8.8 (1.3)e
<i>b*</i>	20.2 (2.2)a	20.6 (2.8)a	18.3 (3.8)a	20.6 (3.2)a	9.4 (2.2)b
<i>E^b</i>	67.5 (3.5)a	61.0 (4.2)ac	52.1 (4.9)bc	57.7 (4.6)c	43.7 (3.3)d
<i>C^c</i>	20.4 (2.4)a	22.0 (3.1)ab	21.8 (4.2)ab	23.2 (3.4)b	12.9 (2.6)c
Cozido					
<i>L*</i>	52.7 (0.7)a	52.4 (1.3)a	52.7 (1.1)a		
<i>a*</i>	2.0 (0.2)a	2.6 (0.4)b	2.1 (0.2)a		
<i>b*</i>	9.3 (0.3)a	11.4 (0.6)b	9.8 (0.6)a		
<i>E^b</i>	53.6 (0.8)a	53.7 (1.5)a	53.6 (1.3)a		
<i>C^c</i>	9.5 (0.4)a	11.7 (0.7)b	10.0 (0.6)a		
		180°C	240°C	300°C	
Assado					
<i>L*</i>		48.8 (1.2)a	47.5 (1.8)b	42.4 (2)c	
<i>a*</i>		4.3 (0.6)a	4.8 (0.5)b	7.4 (1.0)c	
<i>b*</i>		9.0 (1.8)a	9.4 (1.2)a	6.9 (2.1)b	
<i>E^b</i>		49.8 (2.2)a	48.7 (2.2)a	43.6 (3.1)b	
<i>C^c</i>		10.0 (1.9)a	10.6 (1.3)a	10.1 (2.3)a	

^a Valores representados são média (DP). Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (p<0,05) – ANOVA ONE WAY para amostras independentes seguido de teste de Tukey. n=15

^b $E = (L^{*2} + a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$

^c $C = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$

5.9. Análise sensorial do atributo cor

Para a carne cozida em água, a cor de todos os tratamentos foi rejeitada porque a maioria dos avaliadores (55% para cozida em água 60 °C, 65 % para 70 °C e 67 % para 80 °C) assinalou as notas 1 ou 2 (tabela 13). Cozinhar a carne em água resultou na menor formação de PRM, consequentemente, carne com pouca cor foi obtida, e por essa razão, um

condimento ou molho apropriado que melhore sua cor poderia ser escolhido para aumentar a aceitabilidade da carne quando o objetivo for minimizar o consumo de PRM.

Tabela 13. Percentuais de aceitação e rejeição da cor em carne bovina cozida.

Tratamentos	% de rejeição	% de aceitação
<i>Assado</i>		
180 °C	67	15
240 °C	43	35
300 °C	60	25
<i>Cozido em água</i>		
60 °C	55	20
70 °C	65	5
80 °C	67	10
<i>Grelhado</i>		
60 °C	75	10
80 °C	30	56
100 °C	8	68
<i>Empanado e frito</i>		
60 °C	58	18
80 °C	12	80
100 °C	43	27

Considerando-se os métodos de cocção com uso de calor seco, as amostras grelhada 60 °C, empanada e frita 60 °C (mal-passadas) e assadas 180 °C e 300 °C também foram rejeitadas. A cor das amostras empanada e frita 100 °C e assada a 240 °C não foi nem aceita, nem rejeitada. Ao se empregar as temperaturas mais baixas na cocção por calor seco, a carne não foi cozida o suficiente para modificar sua cor, o que resultou em rejeição. Por outro lado, a cocção em temperaturas elevadas e por tempo prolongado acarretou a formação de cores mais escuras na superfície da carne (verificado instrumentalmente com a menor luminosidade), que também foram rejeitadas.

Temperaturas intermediárias para grelhar e fritar (80 °C), bem como a temperatura mais alta usada no tratamento grelhado (100 °C) resultou em alta aceitabilidade, sendo que a cor da carne empanada e frita 80 °C apresentou o maior percentual de aceitação, 80% das notas assinaladas foram 4 ou 5. Essas duas amostras de carne cozida correspondem ao estágio “muito bem passado” (CHEN e SMITH, 2015), e a elevada aceitação da cor difere da pesquisa de ALFAIA et al., 2010, na qual consumidores de carne preferiram carne cozida ao ponto (temperatura interna entre 63 °C e 70 °C) e bem passada (temperatura interna entre 71 °C e 76 °C).

O tratamento térmico de alimentos em geral, e carne em particular, é importante para a produção de compostos responsáveis por atributos sensoriais e para garantir a segurança (controle microbiológico). Segundo legislações de boas práticas, a cocção dos alimentos deve permitir que se atinja 74 °C no CG de alimentos (BRASIL, 2013). Portanto, as carnes grelhadas com temperatura interna de 80 °C e 100 °C e empanadas e fritas com temperatura interna de 80 °C, são seguras do ponto de vista microbiológico, com cor agradável, e nessas condições, ocorre formação de compostos de fase inicial e intermediária da RM. Este estudo permitiu identificar as condições de tratamento térmico que resultam em boa aceitação e baixa geração de PRM, podendo, então, serem utilizadas para orientar pessoas com diabetes ou doenças renais. Na prática clínica não seriam recomendados a pacientes que utilizassem termopares para registrar as temperaturas de seus alimentos, mas, as informações obtidas sobre tipos e tempos de preparo, bem como registros fotográficos com as cores dos alimentos podem ser empregadas na elaboração de materiais educativos de fácil compreensão e aplicação.

6. Conclusões

- O controle sistemático das temperaturas no centro geométrico das carnes cruas e cozidas, do tempo de cocção e do rendimento, em conjunto com o número pequeno de ingredientes utilizado resultou em baixos coeficientes de variação e minimizou a variabilidade intrínseca a procedimentos de cocção doméstica, indicando que o processamento térmico da carne foi padronizado adequadamente;

- Indicadores inespecíficos apontaram que os PRM de fase inicial são os principais marcadores do curso da RM na carne cozida, as leituras da absorbância a 280 nm (compostos da fase inicial) foram de 10 a 20 vezes maiores que as leituras da absorbância a 420 nm (compostos da fase final) para todos os tratamentos, e que possivelmente a fase final da RM está em curso na carne assada.

- Indicadores específicos da RM e compostos fluorescentes apontaram que os produtos da fase inicial da RM predominam nas carnes grelhadas e empanadas e frita em temperatura menor que 90 °C, acima dessa temperatura ocorre a degradação de furosina, associada à formação acentuada de compostos fluorescentes e a etapa intermediária da RM está em curso, predominantemente; a formação do marcador da fase avançada da RM (CML) ocorreu apenas na condição térmica mais severa, a carne assada a 300 °C por 30 minutos;

- A formação de compostos fluorescentes é exponencial para as carnes grelhadas e assadas com o aumento da temperatura empregada;

- O método de cocção com uso de calor úmido (fervura) resultou em formação de PRM dez vezes menor que os métodos de cocção por calor seco que não acarretou mudanças nos parâmetros de cor instrumental bem como nas leituras das absorbâncias indicativas de PRM de fases inicial e final;

- Dado que os teores de acrilamida formados na carne bovina cozida são muito baixos, este alimento, nas condições testadas, não representa uma fonte importante deste contaminante tampouco constitui um risco à saúde;

- Perdas de lisina não foram detectadas na carne cozida, indicando que é possível preparar carne bovina usando cocção doméstica e preservar sua qualidade nutricional;

- Os métodos de cocção causaram mudanças significativas no desenvolvimento da cor instrumental nas carnes grelhadas e assadas, diminuição de luminosidade e aumento dos valores de a^* , correlacionadas com a formação de compostos fluorescentes, que reforçam a utilidade dos parâmetros HunterLab como marcadores inespecíficos da extensão da RM.;

- A cor da carne cozida em água e das carnes grelhadas e fritas em temperatura equivalente ao estágio mal-passado foi rejeitada; a cor dessas amostras foi aceita para o estágio muito bem passado; a cocção em temperaturas elevadas e por tempo prolongado acarretou a formação de cores mais escuras na superfície das carnes assadas, que também foram rejeitadas;

- Condições de cocção que resultaram em grande aceitação da cor e baixa formação de PRM de fase avançada foram encontradas para carne bovina e podem ser utilizadas em orientações para pacientes com diabetes em ensaios clínicos futuros.

7. Referências

- AHMED, M.U.; THORPE, S.R.; BAYNES, J.W. Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 11, p. 4889-4994, 1986
- AHMED, N.; THORNALLEY, P.J. Peptide mapping of human serum albumin modified minimally by methylglyoxal in vitro and in vivo. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1043, p. 260-266, 2005
- AHMED, N.; MIRSHEKAR-SYAHKAL, B.; KENNISH, L.; KARACHALIAS, N.; BABAEI-JADIDI, R.; THORNALLEY, P.J. Assay of advanced glycation endproducts in selected beverages and food by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.49, p. 691-699, 2005.
- ALFAIA, C.M.M.; ALVES, S.P.; LOPES, A.F.; FERNANDES, M.J.E.; COSTA, A.S.H.; FONTES, C.M.G.A.; CASTRO, M.L.F.; BESSA, R.J.B.; PRATES, J.A.M. Effect of cooking methods on fatty acids, conjugated isomers of linoleic acid and nutritional quality of beef intramuscular fat. **Meat Science**, v. 84, p. 769-777, 2010
- AMES, J.M. Determination of N^ε – (Carboxymethyl)lysine in foods and related systems. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1126, p. 20-24, 2008.
- ARISSETO, A.P. Acrilamida em alimentos: ocorrência, métodos analíticos e estimativas de ingestão, 2007, 156p. [Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas].
- ARISSETO, A.P.; TOLEDO, M.C.F.; GOVAERT, Y.; LOCO, J.V.; FRASELLE, S.; DEGROODT, J.M.; CAROBA, D.C.R. Contribution of selected foods to acrylamide intake by a population of Brazilian adolescents. **LWT- Food Science and Technology**, v.42, p.207-211, 2009.
- ASSAR, S.H.; MOLONEY, C.; LIMA, M.; MAGEE, R.; AMES, J.M. Determination of N^ε – (carboxymethyl)lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. **AminoAcids**, v.36, p.317-326, 2009.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS AOAC requirements for single laboratory validation of chemical methods. 33 p., 2002
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. AOAC. **Official Methods of Analysis**. 18th ed. Gaithersburg, MD, 2005.
- BADENHORST, D.; MASEKO, M.; TSOTETSI, O.J.; NAIDOO, A.; BROOKSBANK, R.; NORTON, G.R.; WOODIWISS, A.J. Cross-linking influences the impact of quantitative changes in myocardial collagen on cardiac stiffness and remodeling in hypertension in rats. **Cardiovascular Research**, v. 57, p. 632-641, 2003
- BADIANI, A.; STIPA, S.; BITOSSI, F.; GATTA, P.P.; VIGNOLA, G.; CHIZZOLINI, R. Lipid composition, retention and oxidation in fresh and completely trimmed muscles as affected by common culinary practices. **Meat Science**, v. 60, p. 169-186, 2002
- BALTES, W. Chemical changes in food by the Maillard Reaction. **Food Chemistry**, v.9, p.59-73, 1982.

BASTA, G.; SCHMIDT, A.M.; CATERINA, R.D. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. **Cardiovascular research**, v. 63, p. 582-592, 2004

BASTOS, D.H.M.; GUGLIUCCI, A. Contemporary and controversial aspects of the Maillard reaction products. **Current opinion in Food Science**, v.1, p.13-20, 2015.

BASTOS, D.H.M.; SHIBAO, J.; FERREIRA, E.L.; BOMBO, A.J. Produtos da Reação de Maillard em Alimentos Industrializados. **Nutrire**, v. 36 n.3, p.63-78, 2011.

BELAND, F.; MELLICK, P.; OLSON, G.; MENDOZA, M.; MARQUES, M.; DOERGE, D. Carcinogenicity of acrylamide in B6C3F(1) mice and F344/N rats from a 2-year drinking water exposure. **Food and Chemical Toxicology**, v.51, p.149-159, 2013.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Carbohydrates**. In: BELITZ, H.D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. Food Chemistry, 4th edition. Springer-Verlag, Berlin, p.270-289, 2009.

BHASKAR, P.B.; WU, L.; BUSSE, J.S.; WHITTY, B.R.; HAMERNIK, A.J.; JANSKY, S.H.; BUELL, C.R.; BETHKE, P.C.; JIANG, J. Suppression of the vascular invertase gene prevents cold-induced sweetening in potato. **Plant Physiology**, v. 154, p. 939-948, 2010.

BIRLOUEZ-ARAGON, I.; SAAVEDRA, G.; TESSIER, F.J.; GALINIER, A.; AIT-AMEUR, L.; LACOSTE, F.; NIAMBA, C.N.; ALT, N.; SOMOZA, V.; LECERF, J.M. A diet based on high-heat-treated foods promotes risk factors for diabetes mellitus and cardiovascular diseases. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.91, p.1220-1226, 2010.

BOGNAR, A. Comparative study of frying to other cooking techniques influence on the nutritive value. **Grasas y Aceites**, v. 49, n. 3-4, p. 250-260, 1998

BORRELLI, R.C.; FOGLIANO, V. Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, p. 673-678, 2005.

BOSCH, L.; ALEGRIA, A.; FARRÉ, R.; CLEMENTE, G. Fluorescence and color as markers for the Maillard reaction in milk-based infant foods during storage. **Food Chemistry**, v.105, p.1135-1143, 2007

BRANDS, C.M.J.; ALINK, G.M.; VAN BOEKEL, M.A.J.S., JONGEN, W.M.F. Mutagenicity of heated sugar-casein systems: effect of the Maillard reaction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.2271-2275, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Resumo. Alimentos, nutrição, atividade física e prevenção de câncer: uma perspectiva global. Rio de Janeiro, 12p., 2007.

BRASIL. GOVERNO DO ESTADO DE SAO PAULO. SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. CENTRO DE VIGILANCIA SANITÁRIA. Portaria CVS 5, de 9/4/2013. Aprova o regulamento técnico sobre boas práticas para estabelecimentos comerciais de alimentos e para serviços de alimentação. DOE de 19/04/2013, Seção I, p.32-35

BROWNLEE, M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. **Annual Review of Medicine**, v. 46, p. 223-234, 1995

BRUNTON, N.P.; GORMLEY, R.; BUTLER, F.; CUMMINS, E.; DANAHER, M.M.; O'KEEFFE, M. A survey of acrylamide precursors in Irish ware potatoes and acrylamide levels in French fries. **LWT- Food Science and Technology**, v.40, p.1601-1609, 2007.

CAI, W.; HE, J.C.; ZHU, L.; PEPPA, M.; LU, C.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. High levels of dietary advanced glycation end products transform low-density lipoprotein into a potent redox-sensitive-mitogen-activated protein kinase stimulant in diabetic patients. **Circulation**, v. 110, p. 285-291, 2004

CAI, W.; HE, J.C.; ZHU, L.; CHEN, X.; WALLENSTEIN, S.; STRIKER, G.; VLASSARA, H. Reduced oxidant stress and extended lifespan in mice exposed to a low glycotoxin diet: association with increased AGER1 expression. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n.6, p. 1893-1902, 2007

CAMARGO, E.B.; BOTELHO, R.A. **Técnica dietética: seleção e preparo de alimentos. Manual de Laboratório**. 1ª edição, Editora Atheneu, São Paulo, 2008.

CHAO, P.; HUANG, C.; HSU, C.; YIN, M.; GUO, Y. Association of dietary AGEs with circulating AGEs, glycates LDL, IL-1 α and MCP-1 levels in type 2 diabetic patients. **European Journal of Nutrition**, v.49, p.429-434, 2010.

CHAO, P.; HSU, C.; YIN, M. Analysis of glycative products in sauces and sauce-treated foods. **Food Chemistry**, v.113, p.262-266, 2009.

CHARRISSOU, A.; AIT-AMEUR, L.; BIRLOUEZ-ARAGON, I. Evaluation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the quantification of carboxymethyllysine in food samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1140, p.189-194, 2007

CHEN, G.; SMITH, J.S. Determination of advanced glycation endproducts in cooked meat products. **Food Chemistry**, v. 168, p. 190-195, 2015

CHENG, L.; JIN, C.; ZHANG, Y. Investigations of variations in the acrylamide and N^c-(Carboxymethyl) Lysine contents in cookies during baking. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 5, p. 1030-1038, 2014

CIE COLORIMETRIC COMMITTEE. Technical notes: working program on colour differences. **Journal of the Optical Society of America**, v.64, p.896-897, 1974.

DAGLIA, M.; PAPETTI, A.; ACETI, C.; SORDELLI, B.; SPINI, V.; GAZZANI, G. Isolation and determination of α -dicarbonyl compounds by RP-HPLC-DAD in green and roasted coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.8877-8882, 2007.

DELGADO-ANDRADE, C.; SEIQUER, I.; NAVARRO, M.P. Bioavailability of iron from a heat treated glucose-lysine model system: assays in rats and in Caco-2 cells. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p.1507-1513, 2004.

DELGADO-ANDRADE, C.; RUFÍAN-HENARES, J.; MORALES, F.J. Study on fluorescence of Maillard reaction compounds in breakfast cereals. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.50, p.799-804, 2006.

DELGADO-ANDRADE, C.; SEIQUER, I.; NAVARRO, M.P.; MORALES, F.J. Maillard reaction indicators in diets usually consumed by adolescent population. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.51, p. 341-351, 2007.

DELGADO-ANDRADE, C.; RUFIAN-HENARES, J.A.; MORALES, F.J. **Colour and fluorescence measurement as unspecific markers for the Maillard reaction**. In: Delgado-Andrade, C. & Rufian-Henares, J.A. Assessing the generation and bioactivity of neo-formed compounds in thermally treated foods. 1ª ed., Editorial Atrio, Granada, Espanha, 2009

DELGADO-ANDRADE, C.; SEIQUER, I.; HARO, A.; CASTELLANO, R.; NAVARRO, M.P. Development of the Maillard Reaction in foods cooked by different techniques. Intake of Maillard-derived compounds. **Food Chemistry**, v.122, p.145-153, 2010.

DUNN, J.A.; PATRICK, J.S.; THORPE, S.R.; LYONS, T.J.; BAYNES, J.W. Age-dependent accumulation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine in lens proteins. **Biochemistry**, v. 28, p. 4889-4894, 1989.

DUNN, J.A.; MCCANCE, D.R.; THORPE, S.R.; LYONS, T.J.; BAYNES, J.W. Age-dependent accumulation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine and N epsilon-(carboxymethyl)hydroxylysine in human skin collagen. **Biochemistry**, v. 30, p. 1205-1210, 1991.

DYBING, E.; SANNER, T. Risk assessment of acrylamide in foods. **Toxicological Sciences**, v. 75, p. 7-15, 2003

DYER, D.G.; DUNN, S.R.; THORPE, K.E.; BAILIE, T.J.; LYONS, D.R.; MCCANCE, D.R.; BAYNES, J.W. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 6, p. 2463-2469, 1993

EC. **Opinion of the scientific committee on food on new findings regarding the presence of acrylamide in food.** European Commission, Belgium, 2002.

ECHA. EUROPEAN CHEMICALS AGENCY. **Acrylamide included in the REACH candidate list of substances of very high concern for authorization.** Disponível em: <http://echa.europa.eu/documents/10162/13585/pr1005acrylamide20100330en.pdf>. Acesso em abril/2015.

EEROLA, S.; HOLLEBEKKERS, K.; HALLIKAINEN, A.; PELTONEN, K. Acrylamide levels in Finnish foodstuffs analysed with liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, p. 239-347, 2007

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific report of EFSA: results in acrylamide levels in food from monitoring years 2007-2009 and exposure assessment. **EFSA Journal**. v.9, n.4, p.2133-2181, 2011

ERBERSDOBLER, H.F.; SOMOZA, V. Forty years of furosine – Forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.51, p.423-430, 2007

FAIRWEATHER-TAIT, S.J.; PORTWOOD, D.E.; SYMSS, L.L.; EAGLE, S.J.; MINSKI, M.J. Iron and zinc absorption in human subjects from a mixed meal of extruded and nonextruded wheat bran and flour. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 49, p. 151-155, 1989

FENNELL, T.R.; SUMMER, S.C.J.; SNYDER, R.W., BURGESS, J.; SPICER, R.; BRIDSON, W.E.; FRIEDMAN, M.A. Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. **Toxicological Sciences**, v.85, p.447-459, 2005

FERRER, E.; ALEGRIA, A.; FARRÉ, R.; CLEMENTE, G.; CALVO, C. Fluorescence, browning index, and color in infant formulas during storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p. 4911-4917, 2005

FIELD, E.A.; PRICE, C.J.; SLEET, R.B.; MARR, M.C.; SCHWETZ, B.A.; MORISSEY, R.E. Developmental toxicity evaluation of acrylamide in rats and mice. **Fundamental and Applied Toxicology**, v.14, p.502-512, 1990.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Informe de una reunion consultiva conjunta FAO/WHO/ONU de expertos. **Necessidades de energia y de proteínas**, Ginebra, 220p., 1985

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. WORLD HEALTH ORGANIZATION. JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. **Summary and conclusions, Seventy-second meeting**. Rome, 16-25 February, 2010.

FRIEDMAN, M.A.; DULAK, L.H.; STEDHAM, M.A. A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide. **Toxicological Sciences**, v.27, p.95-105, 1995.

GATELLIER, P.; SANTE-LHOUTELLIER, S.; PORTANGUEN, S.; KONDOYAN, A. Use of meat fluorescence emission as a marker of oxidation promoted by cooking. **Meat Science**, v.83, p.651-656, 2009

GERBER, N.; SCHEEDER, M.R.L.; WENK, C. The influence of cooking and fat trimming on the actual nutrient intake from meat. **Meat Science**, v. 81, p. 148-154, 2009

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Acrilamida: nova ameaça à segurança alimentar? **Higiene Alimentar**, v.16, n.101, p.37-41, 2002

GLOSL, S.; WAGNER, K.H.; DRAXLER, A.; KANIAK, M.; LICHTENECKER, S.; SONNLEITNER, A.; SOMOZA, V.; ERBERSDOBLER, H.; ELMADFA, I. Genotoxicity and mutagenicity of melanoidins isolated from a roasted glucose-glycine model in human lymphocyte cultures, intestinal Caco-2 cells and in the *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA102 applying the AMES test. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p. 1487-1495, 2004

GOLDBERG, T.; CAI, W.; PEPPA, M.; DARDAINE, V.; BALIGA, B.S.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. **Journal of the American dietetic Association**, v. 104, n.8, p. 1287-1291, 2004

GRANDA, C.; MOREIRA, R.G.; TICHY, S.E. Reduction of acrylamide formation in potato chips by low-temperature vacuum frying. **Journal of Food Science**, v. 69, p. 405-411, 2004.

HARCOURT, B.E.; SOURRIS, K.C.; COUGHAN, M.T.; WALKER, K.Z.; DOUGHERTY, S.L.; ANDRIKOPOULOS, S.; MORLEY, A.L.; THALLAS-BONKE, V.; CHAND, V.; PENFOLD, S.A.; DE COURTEN, M.P.; THOMAS, M.C.; KINGWELL, B.A.; BIERHAUS, A.; COOPER, M.E.; DE COURTEN, B.; FORBES, J.M. Targeted reduction of advanced glycation improves renal function in obesity. **Kidney International**, v. 80, p. 190-198, 2011

HARJA, E.; BU, D.X.; HUDSON, B.I.; CHANG, J.S.; SHEN, X.; HALLAM, K.; KALEA, A.Z.; LU, Y.; ROSARIO, R.H.; ORUGANTI, S.; NIKOLLA, Z.; BELOV, D.; LALLA, E.; RAMASAMY, R.; YAN, S.F.; SCHMIDT, A.M. Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE ^{-/-} mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, p. 183-194, 2008

HE, F.; ZHANG, S.; WANG, H.; LI, G.; ZHANG, Z.; LI, F.; DONG, X.M.; HU, F. Neurological and electroneuromyographic assessment of the adverse effects of acrylamide on occupationally exposed workers. **Scandinavian Journal of Work, Environment and Health**, v.15, n.2, p. 125-129, 1989

HEREDIA, A.; CASTELLÓ, M.L.; ARGUELLES, A.; ANDRES, A. Evolution of mechanical and optical properties of French fries obtained by hot air-frying. **LWT – Food Science and Technology**, v. 57, p. 755-760, 2014

HODGE, J.E. Dehydrated foods – chemistry of Browning reactions in model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 1, p. 928-943, 1953

HOFMANN, T.; MUNCH, P.; SCHIEBERLE, P. Quantitative model studies on the formation of aroma-active aldehydes and acids by Strecker-type reactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 434-440, 2000.

HUANG, J.S.; GUH, J.Y.; CHEN, H.C.; HUNG, W.C.; LAI, Y.H.; CHUANG, L.Y. Role of receptor for advanced glycation end-product (RAGE) and the JAK/STAT signaling pathway in AGE-induced collagen production in NRK-49F cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 81, p. 102-113, 2001

HULL, G.L.J.; WOODSIDE, J.V.; AMES, J.M.; CUSKELLY, G.J. $N\epsilon$ –(carboxymethyl)lysine content of foods commonly consumed in a western style diet. **Food Chemistry**, v. 131, p. 170-174, 2012

HUNTER, R.S.; HAROLD, R.W. **The measurement of appearance**. 2^a ed., John Wiley and Sons, Inc. New York, NY USA, 1987

HUTTUNEN, H.J.; FAGES, C.; RAUVALA, H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signalling pathways. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 19919-19924, 1999

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008 Revisão 3. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro, 20p, 2010

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil**. Rio de Janeiro, IBGE, 150p., 2011

JENSEN, I.J.; DORT, J.; EILERTSEN, K.E. Proximate composition, antihypertensive and antioxidative properties of the semimembranosus muscle from pork and beef after cooking and in vitro digestion. **Meat Science**, v. 96, p. 916-921, 2014

JOHNSON, K.A.; GORZINSKI, S.J.; BODNER, K.M.; CAMPBELL, R.A.; WOLF, C.H.; FRIEDMAN, M.A.; MAST, R.W. Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 85, p. 154-168, 1986.

JOUQUAND, C.; TESSIER, F.J.; BERNARD, J.; MARIER, D.; WOODWARD, K.; JACOLOT, P.; GADONNA-WIDEHEM, P.; LAGUERRE, J.C. Optimization of microwave cooking of beef burgundy in terms of nutritional and organoleptic properties. **LWT – Food Science and Technology**, v. 60, p. 271-276, 2015

KAPLAN, O.; KAYA, G.; OZCAN, C.; INCE, M.; YAMAN, M. Acrylamide concentrations in grilled foodstuffs of Turkish kitchen by performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 93, p. 173-179, 2009

KELLOW, N.J.; SAVIGE, G.S. Dietary advanced glycation end-product restriction for the attenuation of insulin resistance, oxidative stress and endothelial dysfunction: a systematic review. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, p. 239-248, 2013

KIM, C.T.; HWANG, E.S.; LEE, H.J. Reducing acrylamide in fried snack products by adding amino acids. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 354-358, 2005

KOSCHINSKY, T.; HE, C.J.; MITSUHASHI, T.; BUCALA, R.; LIU, C.; BUENTING, C.; HEITMANN, K.; VLASSARA, H. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 6474-6479, 1997

LIAO, G.Z.; WANG, G.Y.; XU, X.L.; ZHOU, G.H. Effect of cooking methods on the formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and duck breast. **Meat Science**, v.85, p.149-154, 2010

LINDENMEIER, M.; FAIST, V.; HOFMANN, T. Structural and functional characterization of pronyl-lysine, a novel protein modification in bread crust melanoidins showing in vitro antioxidative and phase I/II enzyme modulating activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 6997-7006, 2002

MAILLARD, L.C. Action des acides amines sur les sucres; formation des melanoidines par voie methodique. **Comptes Rendus de l'Académie des sciences**, v. 154, p.66-68, 1912

MATIACEVICH, S. B.; SANTAGAPITA, P. R.; BUERA, M. P. Fluorescence from the Maillard Reaction and its potential applications in food science. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n6, p. 483-495, 2005.

MCLAREN, K.; RIGG, B. The SDC recommended colour difference formula change to CIELab. **Journal of the Society of Dyers Colourists**, v.92, p. 337-338, 1976.

MEILGAARD, M.; CARR, B.T.; CIVILLE, G.V. **Sensory Evaluation Techniques**, 3 ed. Florida, CRC Press, 1999.

MIURA, J.; YAMAGISHI, S.; UCHIGATA, Y.; TAKEUCHI, M.; YAMAMOTO, H.; MAKITA, Z.; IWAMOTO, Y. J. Serum levels of non-carboxymethyllysine advanced glycation endproducts are correlated to severity of microvascular complications in patients with type 1 diabetes. **Journal of diabetes and its complications**, v. 17, p. 16-21, 2003

MITSUHASHI, T.; NAKAYAMA, H.; ITOH, T.; KUWAJIMA, S.; AOKI, S.; ATSUMI, T.; KOIKE, T. Immunochemical detection of advanced glycation end products in renal cortex from STZ induced diabetic rat. **Diabetes**, v. 42, p. 826-833, 1993

MODZELEWSKA-KAPITULA, M.; DABROWSKA, E.; JANKOWSKA, B.; KWIATKOWSKA, A.; CIERACH, M. The effect of muscle, cooking method and final internal temperature on quality parameters of beef roast. **Meat Science**, v. 91, p. 195-202, 2012

MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Formation of carcinogenic 4(5)-methylimidazole in Maillard reaction systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.615-618, 2011.

MORALES, F.J.; ROMERO, C.; JIMÉNEZ-PÉREZ, S. Fluorescence associated with Maillard reaction in milk and milk-resembling systems. **Food Chemistry**, v.57, n3, p.423-428, 1996

MORALES, F.J., VAN BOEKEL, M.A.J.S. A study on advanced Maillard reaction in heated casein sugar solutions: fluorescence accumulation. **International Dairy Journal**, v.7, p.675-683, 1997

MORALES, F.J.; JIMENEZ-PEREZ, S. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. **Food Chemistry**, v.72, p.119-125, 2001

MORALES, F.J.; FERNANDEZ-FRAGUAS, C.; JIMENEZ-PEREZ, S. Iron-binding ability of melanoidins from food and model systems. **Food Chemistry**, v. 90, p. 821-827, 2005

MORALES, F.J.; SOMOZA, V.; FOGLIANO, V. Physiological relevance of dietary melanoidins. **Amino Acids**, v.42, p.1097-1109, 2012

NEGREAN, M.; STIRBAN, A. STRATMANN, B.; GAWLOWSKI, T.; HORSTMANN, T.; GÖTTING, C. et al. Effects of low-and high-advanced glycation endproduct meals on macro-and microvascular endothelial function and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.85, p. 1236-1243, 2007

NEGRE-SALVAYRE, A.; SALVAYRE, R.; AUGÉ, N.; PAMPLONA, R.; PORTERO-OTIN, M. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 12, p. 3071-3109, 2009

NIQUET-LERIDON, C., TESSIER, F.J. Quantification of N ϵ -carboxymethyl-lysine in selected chocolate-flavoured drink mixes using high-performance liquid chromatography-linear ion trap tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 126, p. 655-663, 2011

OBON-SANTACANA, M.; SLIMANI, N.; LUJAN-BARROSO, L.; TRAVIER, N.; HALLMANS, G.; FREISLING, H.; FERRARI, P.; BOUTRON-ROUULT, M.C.; RACINE, A.; CLAVEL, F.; SAIEVA, C.; PALA, V.; TUMINO, R.; MATTIELLO, A.; VINEIS, P.; ARQUELLES, M.; ARDANAZ, E.; AMIANO, P.; NAVARRO, C.; SANCHEZ, M.J.; MOLINA MONTES, E.; KEY, T.; KHAW, K.T.; WAREHAM, N.; PEETERS, P.H.; TRICHOPOULOU, A.; BAMIA, C.; TRICHOPOULOS, D.; BOEING, H.; KAAKS, R.; KATZKE, V.; YE, W.; SUND, M.; ERICSON, U.; WIRFALT, E.; OVERVAD, K.; TJØNNELAND, A.; OLSEN, A.; SKEIE, G.; ASLI, L.A.; WEIDERPASS, E.; RIBOLI, E.; BUENO-DE-MESQUITA, H.B.; DUELL, E.J. Dietary intake of acrylamide and pancreatic cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC) cohort. **Annals of Oncology**, v.24, n.10, p. 2645-2651, 2013.

O'BRIEN, J.; MORRISSEY, P.A. Nutritional and toxicological aspects of Maillard Browning reaction in foods. **Critical Reviews of Food Science and Nutrition**, v.28, p.211-248, 1989.

OETTERER, M.; SARMENTO, S.B.S. **Propriedade dos açúcares**. In: OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ed. Manole, Barueri, p.135-195, 2006.

OILLIC, S.; LEMOINE, E.; GROS, J.B.; KONDOJOYAN, A. Kinetic analysis of cooking losses from beef and other animal muscles heated in water bath – effect of sample dimensions and prior freezing and ageing. **Meat Science**, v. 88, p. 338-346, 2011

PASTORIZA, S.; RUFIAN-HENARES, J.A. Contribution of melanoidins to the antioxidant capacity of the Spanish diet. **Food Chemistry**, v.164, p. 438-445, 2014

PASTORIZA, S.; RUFIAN-HENARES, J.A.; DELGADO-ANDRADE, C. Effects of long-term consumption of standard diets including glucose-lysine model glycated compounds on the antioxidant status of adult rats. **Food Chemistry**, v.183, p.283-290, 2015

PEDERSEN, M.; VON STEDINGK, H.; BOTSIVALI, M.; AGRAMUNT, S.; ALEXANDER, J.; BRUNBORG, G.; CHATZI, L.; FLEMING, S.; FTHENOU, E.; GRANUM, B.; GUTZKOW, K.B.; HARDIE, L.J.; KNUDSEN, L.E.; KYRTOPOULOS, S.A.; MENDEZ, M.A.; MERLO, D.F.; NIELSEN, J.K.; RYDBERG, P.; SEGERBACK, D.; SUNYER, J.; WRIGHT, J.; TORNQVIST, M.; KLEINJANS, J.C.; KOGEVINAS, M. Birth weight, head circumference and prenatal exposure to

acrylamide from maternal diet: the European prospective mother-child study (NewGeneris). **Environmental Health Perspectives**, v.120, n.12, p. 1739-1745, 2012.

PEDRESCHI, F.; KAACK, K.; GRANBY, K.; TRONCOSO, E. Acrylamide reduction under different pre-treatments in French fries. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p. 1287-1294, 2007.

PEDRESCHI, F.; MARIOTTI, M.S.; GRANBY, K. Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 9-20, 2014

PENG, X.; MA, J.; CHEN, F.; WANG, M. Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products. **Food & Function**, v. 2, p. 289-301, 2011.

PENNISI, M.; MALAGUARNERA, G.; PUGLISI, V.; VINCIGUERRA, L.; VACANTE, M.; MALAGUARNERA, M. Neurotoxicity of acrylamide in exposed worker. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.10, p. 3843-3854, 2013.

PEPPA, M. HE, C.; HATTORI, M.; MCEVOY, R.; ZHENG, F.; VLASSARA, H. Fetal or neonatal low-glycotoxin environment prevents autoimmune diabetes in NOD mice. **Diabetes**, v. 52, n. 6, p. 1441-1448, 2003

PIGARRILHO, M.; OLIVEIRA, N.G.; MARTINS, C.; GOMES, B.C.; FERNANDES, A.S.; MARTINS, V.; LABILLOY, A.; LIMA, J.P.; RUEFF, J.; GASPAR, J.F. Induction of sister chromatid Exchange by acrylamide and glycidamide in human lymphocytes: role of polymorphisms in detoxification and DNA-repair genes in the genotoxicity of glycidamide. **Mutation Research**, v.752, p.1-7, 2013.

PINTO E SILVA, M.E.M.; ATZINGEN, M.C. Sensory analysis of hydrolysed meat preparations. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 2, p. 349-353, 2010

PIRES, C.V.; OLIVEIRA, M.G.A.; ROSA, J.C.; COSTA, N.M.B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p. 179-187, 2006

POMPEI, C.; SPAGNOLELLO, A. Furosine as an Index of heat treatment intensity in meat products: its application to cooked ham. **Meat Science**, v.46, n. 2, p.139-146, 1997.

POULSEN, M.W.; HEDEGAARD, R.V.; ANDERSEN, J.M.; COURTEN, B.; BUGEL, S.; NIELSEN, J.; SKIBSTED, L.H.; DRAGSTED, L.O. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. **Food and Chemical Toxicology**, v.60, p. 10-37, 2013.

RABBANI, N.; HEIDLAND, A.; SEBEKOVA, K.; SEBEKOVA, K.J. Accumulation of free adduct glycation, oxidation, and nitration products follows acute loss of renal function. **Kidney International**, v.72, p.1113-1121, 2007.

RAHBAR, S. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. **Clinical Chimica Acta**, v. 22, n. 2, p.296-298, 1968

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. **Carboidratos**. In: RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. Química de Alimentos, Ed. Blucher, São Paulo, 2ª ed.; p. 33-84, 2007.

RIBOLDI, B.P.; VINHAS, A.M.; MOREIRA, J.D. Risks of dietary acrylamide exposure: a systematic review. **Food Chemistry**, v. 157, p.310-322, 2014

ROLDAN, M.; LOEBNER, J.; DEGEN, J.; HENLE, T.; ANTEQUERA, T.; RUIZ-CARRASCAL, J. Advanced glycation end products, physico-chemical and sensory characteristics of cooked lamb loins affected by cooking method and addition of flavour precursors. **Food Chemistry**, v. 168, p. 487-495, 2015

ROSEN, J.; HELLENAS, K.E. Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analyst**, v. 127, p. 880-882, 2002.

RUFIAN-HENARES, J.A.; GUERRA-HERNANDEZ, E.; GARCIA-VILLANOVA, B. Maillard reaction in enteral formula processing: Furosine, loss of o-phthalaldehyde reactivity and fluorescence, **Food Research International**, v.35, p.527-533, 2002

RUFÍÁN-HENARES, J.A.; DELGADO-ANDRADE, C.; JIMÉNEZ-PÉREZ, S.; MORALES, F.J. Assessing nutritional quality of milk-based sport supplements as determined by furosine. **Food Chemistry**, v.101, p. 573-578, 2007a

RUFÍÁN-HENARES, J.A.; MORALES, F.J. Functional properties of melanoidins: In vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. **Food Research International**, v. 40, p.995-1002, 2007b

RUFÍÁN-HENARES, J.A.; MORALES, F.J. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of coffee melanoidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1480-1485, 2007c

RUFÍÁN-HENARES, J.A.; DELGADO-ANDRADE, C.; MORALES, F.J. Assessing the Maillard reaction development during the toasting process of common flours employed by the cereal products industry. **Food Chemistry**, v.114, p.93-99, 2009.

SAKAMOTO, J.; HASHIMOTO, K. Reproductive toxicity of acrylamide and related compounds in mice: effects on fertility and sperm morphology. **Archives of Toxicology**, v.59, p. 201-205

SEMBA, R.D.; NICKLETT, E.J.; FERRUCCI, L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? **Journal of Gerontology: medical sciences**, v. 65A, n.9, p. 963-975, 2010.

SHIBAO, J.; BASTOS, D. H. M. Produtos da Reação de Maillard em Alimentos: implicações para a saúde. **Revista de Nutrição**, v.24, n.6, p. 895-904, 2011

SHIPP, A.; LAWRENCE, G.; GENTRY, R.; MCDONALD, T.; BARTOW, H.; BOUNDS, J.; MACDONALD, N.; CLEWEL, H.I.; ALLEN, B.; VAN LANDINGHAM, C. Acrylamide: review of toxicity data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects. **Critical Reviews in Toxicology**, v.36, n. 6-7, p.481-608, 2006

SILVÁN, J.M.; LAGEMAAT, J.; OLANO, A.; DEL CASTILLO, M.D. Analysis and biological properties of amino acid derivatives formed by Maillard reaction in foods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, n.5, p.1543-1551, 2006.

SOARES, L.V. **Como avaliar, calcular e expressar resultados analíticos**. In: SOARES, L.V. Curso básico de instrumentação para analistas de alimentos e fármacos. Ed Manole, Barueri, 1ª edição, p.24-42, 2006

SOMOZA, V.; LINDENMEIER, M.; WENZEL, E.; FRANK, O.; ERBERSDOBLER, H.F.; HOFMANN, T. Activity-guided identification of a chemopreventive compound in coffee beverage using *in vitro* and *in vivo* techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.6861-6869, 2003

SOMOZA, V.; WENZEL, E.; LINDENMEIER, M.; GROTHE, D.; ERBERSDOBLER, H.; HOFMANN, T. Influence of feeding malt, bread crust, and a pronylated protein on the activity of chemopreventive enzymes and antioxidative defense parameters in vivo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.8176-8182, 2005

SOMOZA, V. Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: an update. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.49, p. 663-672, 2005.

SUMMER, S.; MACNEELA, J.; FENNELL, T. Characterization and quantification of urinary metabolites of (1,23-¹³C) acrylamide in rats and mice using ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Chemical Research in Toxicology**, v.5, p.81-100, 1992.

TACO - Tabela de Composição de Alimentos, Núcleo de Estudos e Pesquisa em Alimentação da Universidade Estadual de Campinas, Nepa/Unicamp. Ed 4º, 2011

TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E. Relationship between the chemical composition and the biological activities of food melanoidins. **Food Science and Biotechnology**, v.23, n.2, p.561-568, 2014

TAMES, F.J.; MACKNESS, M.I.; ARROL, S.; LAING, I.; DURRINGTON, P.N. Non-enzymatic glycation of apolipoprotein B in the sera of diabetic and non-diabetic subjects. **Atherosclerosis**, v.93, p.237-244, 1992

TAREKE, E.; RYDBERG, P.; KARLSSON, P.; ERIKSSON, S.; TORNQVIST, M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 50, p. 4998-5006, 2002.

TAREKE, E.; FORSLUND, A.; LINDH, C.H.; FAHLGREN, C.; OSTMAN, E. Isotope dilution ESI-LC-MS/MS for quantification of free and total Nε-(1-Carboxymethyl)-L-Lysine and free Nε-(1-Carboxyethyl)-L-Lysine: comparison of total Nε-(1-Carboxymethyl)-L-Lysine levels measured with new method to ELISA assay in gruel samples. **Food Chemistry**, v.14, p. 4253-4259, 2013.

TAYLOR, J.L.S.; DEMYTTENAERE, J.C.R.; TEHRANI, K.A.; OLAVE, A.; REGNIERS, L.; VERSCHAEVE, L.; MAES, A.; ELGORASHI, E.E.; STADEN, J.V.; KIMPE, N.D. Genotoxicity of melanoidin fractions derived from a standard glucose/glycine model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.318-323, 2004.

TESSIER, F.J. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. **Pathologie Biologie**, v. 58, p. 214-219, 2010.

TESSIER, F.J.; BIRLOUEZ-ARAGON, I. Health effects of dietary Maillard reaction products: the results of ICARE and other studies. **Aminoacids**, v. 42, p. 1119-1131, 2012.

URIBARRI, J.; PEPPA, M.; CAI, W.; GOLDBERG, T.; LU, M. HE, C.; VLASSARA, H. Restriction of dietary glycotoxins reduces excessive advanced glycation end products in renal failure patients. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, p. 728-731, 2003

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. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1043, p. 461-466, 2005

URIBARRI, J.; WOODRUFF, S.; GOODMAN, S.; CAI, W.; CHEN, X.; PYZIK, R. et al. Advanced Glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. **Journal of the American Dietetic Association**, v.110, p.911-916, 2010.

URIBARRI, J.; CAI, W.; RAMDAS, M.; GOODMAN, S.; PYZIK, R.; CHEN, X.; ZHU, L.; STRIKER, G.E.; VLASSARA, H. Restriction of advanced glycation end products improves insulin resistance in human type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 34, p. 1610-1616, 2011.

USDA (United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville Human Nutrition Research Center, Nutrient Data Laboratory). **USDA Table of Cooking Yields for Meat and Poultry, 2012**. Disponível em: http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/retn/USDA_CookingYields_MeatPoultry.pdf . Acesso em 07/2014.

USDA -UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE. **USDA National Nutrient Database for standard reference, release 26**. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8964>, Acesso em 03/2014

VLASSARA, H.; CAI, W.; CRANDALL, J.; GOLDBERG, T.; OBERSTEIN, R.; DARDAINE, V.; PEPPA, M.; RAYFIELD, E.J. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n.24, p. 15596-15601, 2002

VLASSARA, H.; CAI, W.; GOODMAN, S.; PYZIK, R.; YONG, A.; CHEN, X.; ZHU, L.; NEADE, T.; BEERI, M.; SILVERMAN, J.M.; FERRUCCI, L.; TANSMAN, L.; STRIKER, G.E.; URIBARRI, J. Protection against loss of innate defenses in adulthood by low advanced glycation end products (AGE) intake: role of the anti-inflammatory AGE receptor-1. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 11, p. 4483-4491, 2009

VLASSARA, H.; STRIKER, G.E. AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, p. 526-539, 2011

XU, Y.; CUI, B.; RAN, R.; LIU, Y.; CHEN, H.; KAI, G.; SHI, J. Risk assessment, formation and mitigation of dietary acrylamide: current status and future prospects. **Food and Chemical Toxicology**, v.69, p.1-12, 2014

YAMAGUCHI, K.; NOMI, Y.; HOMMA, T.; KASAI, M.; OTSUKA, Y. Determination of furosine and fluorescence as markers of the Maillard reaction for the evaluation of meat products during actual cooking conditions. **Food Science and Technology Research**, v.18 , n.1, p.67-76, 2012.

WADMAN, S.K.; DE BREE, P.K.; VAN SPRANG, F.J.; KAMERLING, J.P.; KAVERKAMP, J.; VLIEGENTHART, J.F.G. N-(Carboxymethyl)lysine, a constituent of human urine. **Clinical Chimica Acta**, v.59, p.313-320, 1975.

WANG, H.Y.; QIAN, H.; YAO, W.R. Melanoidins produced by the Maillard reaction: structure and biological activity. **Food Chemistry**, v.128, p. 573-584, 2011.

WHO/ IARC – **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, v. 60, 1994. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol60/mono60.pdf> Acesso em abril 2015.

WAUTIER, M.P.; CHAPPEY, O.; CORDA, S.; STERN, D.M.; SCHMIDT, A.M.; WAUTIER, J.L. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 280, p. E685-694, 2001

ZENG, X.; CHENG, K.W.; JIANG, Y.; LIN, Z.X.; SHI, J.J.; OU, S.Y.; CHEN, F.; WANG, M. Inhibition of acrylamide formation by vitamins in model reactions and fried potato strips. **Food Chemistry**, v.116, p.34-39, 2009.

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/ Metabolism Research and Reviews**, v.18, p. 224-237, 2002.

ZILIC, S.; MOGOL, B.A.; AKILLIOGLU, G.; SERPEN, A.; DELIC, N.; GOKMEN, V. Effects of extrusion, infrared and microwave processing on Maillard reaction products and phenolic compounds in soybean. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 45-51, 2014

APENDICE 1.

Padronização do método de análise para CML e lisina no detector de massas (MS)

Primeiramente, a fim de determinar as melhores condições de operação do equipamento para os analitos, realizaram-se injeções diretas no detector de massas dos padrões internos (CML-d4 e Lysine- d4, Alsachim, Strasbourg, França) e externos (CML, Polypeptide e L-Lysine dihydrochloride, Sigma) com fase móvel (50% ácido nonafluoropentanóico (NFPa) aquoso 10 mM / 50% acetonitrila) (Assar et al., 2009). A voltagem do focalizador, o fluxo de gás secante, a pressão de nebulização foram testadas e as condições que resultaram em maior intensidade de sinal do íon molecular (visando a menor fragmentação possível, para quantificação posterior) dos padrões foram escolhidas. A figura A1 -1 ilustra os cromatogramas obtidos com a injeção direta do padrão lisina - d4, variando-se a voltagem do fragmentador (cone) de 10 a 45 V, com intervalos de 5 em 5 V.

Figura A1 - 1. Cromatogramas (m/z 151) obtidos com injeção direta de padrão puro de lisina – d4, variando-se voltagem do fragmentador. Injeções realizadas a cada 3 minutos

Injeções diretas (sem passar pela coluna) dos padrões no modo SCAN confirmaram as massas das moléculas protonadas (íons moleculares) e dos íons fragmentos (figuras A1-2, A1-3, A1-4 e A1-5), que estão de acordo com outras pesquisas que quantificaram CML e lisina por LC – MS/MS (ASSAR et al., 2009; NIQUET-LERIDON e TESSIER, 2011; TAREKE et al., 2013). Observa-se nessas figuras que a otimização dos parâmetros do

detector de massas foi bem sucedida, pois a maior abundância relativa (de 100) corresponde aos íons moleculares. A voltagem empregada no focalizador causou uma fragmentação mínima, visto que a abundância relativa dos íons fragmentos é de 20. As relações massa/carga (m/z) m/z 148 (lisina), m/z 150 (lisina – d4), m/z 206 (CML) e m/z 208 e 210 (CML-d4) são isótopos de ocorrência natural de cada composto.

Figura A1 - 2 - Espectro de massas do padrão puro – Lisina (íon molecular – m/z 147; íons fragmento: m/z 84 e 130)

Figura A1 - 3 - Espectro de massas do padrão puro - Lisina –d4 (íon molecular – m/z 151; íons fragmento: m/z 88 e 134)

Figura A1 - 4 – Espectro de massas do padrão puro – CML (íon molecular – m/z 205; íons fragmento: m/z 130 e 84)

Figura A1 - 5 – Espectro de massas do padrão puro – CML d4 (íon molecular – m/z 209; íon fragmento: m/z 82)

APENDICE 2.

Parâmetros de validação da metodologia de análise para CML, lisina e furosina.

1. Metodologia

Os parâmetros de validação linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e precisão seguiram metodologia proposta pelo INMETRO, 2010

1.1. Linearidade

Para avaliar a linearidade da resposta foram elaboradas em triplicata curvas de calibração de 5 pontos. Para a quantificação de furosina, foram traçados gráficos da concentração *versus* resposta do padrão externo. Para a quantificação de CML e lisina foram traçados gráficos da concentração dos compostos de interesse *versus* a razão entre a área do padrão interno e a área do analito.

1.2. Limite de detecção

Para determinação do limite de detecção (LD) a curva-padrão foi diluída até encontrar a concentração do analito que produziu uma relação sinal:ruído de 3:1.

1.3. Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) foi obtido multiplicando-se o LD por dez.

1.4. Exatidão

Foram executados testes de recuperação por adição de padrão externo.

1.5. Precisão

A repetitividade foi avaliada por meio de nove determinações ao longo da faixa de trabalho, em três concentrações (triplicatas por nível de concentração). Para determinar a precisão intermediária, o teste de repetitividade foi executado alterando-se o período de tempo, e os resultados foram comparados através de teste t de Student.

2. Resultados

2.1. Linearidade

Pode-se observar que as áreas obtidas são diretamente proporcionais à concentração dos analitos, dentro dos intervalos especificados na tabela A2-1, com coeficientes de determinação (r^2) maiores que 0,99.

Tabela A2-1. Faixas de trabalho e coeficiente de determinação para CML, lisina e furosina.

Analito	Faixa de trabalho (µg/mL)	r^2
CML	0,07 - 1,12	0,999
Lisina	3,1 – 50,0	0,995
Furosina	0,5 - 3,0	0,994
Furosina	2,0 – 10,0	0,997
Furosina	5,0 – 20,0	0,991

2.2. Limites de detecção e de quantificação

Os valores para LD e LQ da tabela A2-2 são de 2 a 10 vezes maiores que os valores encontrados nos métodos usados como referência para a análise de CML (ASSAR et al., 2009; NIQUET-LERIDON e TESSIER, 2011; HULL et al., 2012). Dependendo da faixa de

concentração do analito, pode não ser necessária a determinação dos LD e LQ, a lisina em carnes está presente em quantidade maior que 1%, é um componente de maior teor, por isso não foi estabelecido seu LD e LQ (INMETRO, 2010).

Tabela A2-2. Limites de detecção e quantificação para CML, lisina e furosina.

Analito	LD (mg/100 g)	LQ (mg/100 g)
CML	0,03	0,20
Lisina	Nd*	Nd*
Furosina	0,12	1,64

*Nd – não determinado. LD e LQ não foram determinados para lisina porque esse componente está presente em quantidades maiores que 1% em carne.

2.3.Recuperação

Os percentuais de recuperação para CML, lisina e furosina estão na tabela A2-3. Os testes de recuperação foram executados por meio de adição de padrão externo, em 2 níveis de adição, no início da extração, antes da etapa de redução, com triplicatas para cada nível. Não é possível comparar os resultados obtidos na A2-3 com outros trabalhos, pois ASSAR et al., 2009 e HULL et al., 2012 não realizaram testes de recuperação e NIQUET-LERIDON e TESSIER, 2011 realizaram a contaminação com os padrões após a etapa de redução das amostras, antes da hidrólise ácida, e com isso, obtiveram menor variação dos resultados. Em geral os percentuais de recuperação encontrados estão dentro dos valores aceitáveis para a faixa de concentração de 1 ppm, 75 a 120% (AOAC, 2002).

Tabela A2-3. Percentuais de recuperação para CML, lisina e furosina

	Nível de adição	Recuperação(%)*
Furosina	0,2 µg/mL	89,0 (1,5)
Furosina	1,6 µg/mL	100,5 (4,4)
Lisina	1,0 µg/mL	84,0 (11,8)
Lisina	2,0 µg/mL	113 (20,6)
CML	0,2 µg/mL	84 (7,2)
CML	0,5 µg/mL	134 (8,0)

2.4.Repetitividade e precisão intermediária

A avaliação da precisão para a análise de furosina está ilustrada na A2-4. Considerando-se os tratamentos grelhado, empanado e frito e assado, os desvios-padrão relativos (DPR) oscilaram entre 5 e 13% e estão de acordo com as normas da AOAC, que indicam para essa faixa de trabalho (em torno de 0,2 -0,4 ppm) um DPR aceitável de 16% (SOARES, 2006). A diminuição da precisão para o tratamento cozido com água se justifica pela menor concentração do analito nessa condição (30 ppb). Não houve diferença entre os resultados obtidos em períodos de tempo diferentes.

Tabela A2-4. Repetitividade e precisão intermediária para análise de furosina*

Concentração (mg/ 100g)	Tratamento	Média (DP) tempo A	DPR A (%) Repetitividade A	Média (DP) tempo B	DPR B (%) Repetitividade B
36	Grelhado	36,6 (4,2) a	11,5	37,2 (5,0) a	13,4
16	Empanado e frito/ assado	15,7 (0,9) a	5,7	16,9 (1,0) a	5,9
3	Cozido com água	3,3 (0,9) a	27,3	3,4 (1,0) a	29,4

*Dados expressos em Média (Desvio Padrão) e desvio padrão relativo (DPR). Médias com letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste t de Student, $n=3$.

Tabela A2-5. Repetitividade e precisão intermediária para as análises de CML e lisina*

Concentração em base seca	Analito	Média (DP) tempo A	DPR A (%) Repetitividade A	Média (DP) tempo B	DPR B (%) Repetitividade B
7 g/100 g	Lisina	7,38 (1,0) a	13,8	7,92 (1,0) a	13,1
1,2 mg/100 g	CML	1,18 (0,21) a	17,9	1,21 (0,01) a	0,8

*Dados expressos em Média (Desvio Padrão) e desvio padrão relativo (DPR). Médias com letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste t de Student, $n=6$.

Os valores de DPR encontrados para lisina (tabela A2-5) estão acima do desejável (até 5%) para essa faixa de concentração em razão do grande número de etapas necessárias para extração do analito e consequente manuseio excessivo da amostra.

Pela avaliação da precisão intermediária verifica-se que não há diferença entre períodos de tempo, e também pode ser observado adiante, nos dados obtidos com a quantificação, que essa variação é uma característica da análise. Em métodos que empregaram o mesmo protocolo de extração e detectores triplo quadrupolares, os valores de DPR foram de 10% em média (os autores (ASSAR et al., 2009) não discriminaram os valores de DPR para lisina e para CML) e em bebidas achocolatadas, estes parâmetros variaram de 6 a 16% para CML e de 3,5 a 11% para lisina (NIQUET-LERIDON & TESSIER, 2011).

APENDICE 3 – Cromatogramas

TIC^a m/z 147 – padrão de lisina 6,0 µg/mL

^a TIC – total ion chromatogram

^b outros picos mostrados são interferências isobáricas desconhecidas

Cromatograma amostra empanada e frita (EF)

Cromatograma - padrão de furosina 10 µg/mL

ANEXO 1: Ficha utilizada para avaliação sensorial das amostras de carne cozida.

Nome: _____ Idade: _____ Data ____/____/____

Por favor, avalie as amostras de carne grelhada, utilizando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou não gostou da cor da carne.

Amostra nº 737	Amostra nº 354	Amostra nº 963
☐ desgostei muito	☐ desgostei muito	☐ desgostei muito
☐ desgostei	☐ desgostei	☐ desgostei
☐ não gostei nem desgostei	☐ não gostei nem desgostei	☐ não gostei nem desgostei
☐ gostei	☐ gostei	☐ gostei
☐ gostei muito	☐ gostei muito	☐ gostei muito

Por favor, avalie as amostras de carne empanada e frita, utilizando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou não gostou da cor da carne.

Amostra nº 296	Amostra nº 558	Amostra nº 303
☐ desgostei muito	☐ desgostei muito	☐ desgostei muito
☐ desgostei	☐ desgostei	☐ desgostei
☐ não gostei nem desgostei	☐ não gostei nem desgostei	☐ não gostei nem desgostei
☐ gostei	☐ gostei	☐ gostei
☐ gostei muito	☐ gostei muito	☐ gostei muito

Por favor, avalie as amostras de carne assada, utilizando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou não gostou da cor da carne.

Amostra nº 885	Amostra nº 923	Amostra nº 851
☐ desgostei muito	☐ desgostei muito	☐ desgostei muito
☐ desgostei	☐ desgostei	☐ desgostei
☐ não gostei nem desgostei	☐ não gostei nem desgostei	☐ não gostei nem desgostei
☐ gostei	☐ gostei	☐ gostei
☐ gostei muito	☐ gostei muito	☐ gostei muito

Por favor, avalie as amostras de carne cozida com água, utilizando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou não gostou da cor da carne.

Amostra nº 471	Amostra nº 768	Amostra nº 143
☐ desgostei muito	☐ desgostei muito	☐ desgostei muito
☐ desgostei	☐ desgostei	☐ desgostei
☐ não gostei nem desgostei	☐ não gostei nem desgostei	☐ não gostei nem desgostei
☐ gostei	☐ gostei	☐ gostei
☐ gostei muito	☐ gostei muito	☐ gostei muito

ANEXO 2: Aprovação pelo Comitê de Ética FSP/USP

FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Formação de produtos da reação de Maillard e acrilamida em carne bovina submetida a diferentes formas de cocção

Pesquisador: Deborah Helena Markowicz Bastos

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 09179512.8.0000.5421

Instituição Proponente: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - FSP/USP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 127.314

Data da Relatoria: 22/10/2012

Apresentação do Projeto:

ndn

Objetivo da Pesquisa:

ndn

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

ndn

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

ndn

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

ndn

Recomendações:

ndn

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não envolve seres humanos. Pela aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.346-904

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3061-7778

Fax: (11)3061-7742

E-mail: cesp@fsp.usp.br

FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SÃO PAULO, 22 de Outubro de 2012

Assinador por:
Claudio Leone
(Coordenador)

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715
Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-904
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)3061-7779 Fax: (11)3061-7742 E-mail: cosp@fqp.usp.br

ANEXO 3. Aprovação da escola SENAI para realização da análise sensorial

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO/FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
Av. Dr. Arnaldo, 715 - Cerqueira Cesar
CEP: 01246-904 São Paulo/SP

São Paulo, 2 de agosto de 2012

Ilma. Sra.
Profa. Sílvia Helena Carabolante
Diretora da Escola SENAI Horácio Augusto da Silveira

Prezada Senhora

O projeto de pesquisa intitulado "Formação de produtos da reação de Maillard (PRM) e acrilamida em carne bovina submetida a diferentes técnicas de cocção", realizado pela aluna de doutorado Aurea Juliana Bombo Trevisan sob minha orientação, tem por objetivo identificar condições domésticas que resultem na formação dos PRM e requer uma etapa de avaliação sensorial da carne processada termicamente.

O laboratório de análise sensorial da Faculdade de Saúde Pública encontra-se indisponível para uso pois está sofrendo uma reforma geral. Sendo assim venho solicitar sua autorização para desenvolver a etapa de avaliação sensorial desta pesquisa nas instalações da Escola SENAI Horácio Augusto da Silveira. O desenvolvimento desta pesquisa não gerará ônus para a instituição.

As datas previstas para realização das análises são 8/10/12 e 9/10/12, no período das 8:00h às 22:00h e pode ser modificado de acordo com a disponibilidade de uso das instalações.

Agradeço, desde já, sua atenção e possível colaboração e coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se façam necessários.

Atenciosamente,

Profª Dra Deborah Helena Markowicz Bastos
Professora Associada do Departamento de Nutrição

*Se não tiverem
nã poderão usar
nossas
instalações.
@cinco*

*De acordo,
desde que
a Prof Deborah e
sua aluna se
responsabilizem em
trazer pessoas para
a Casa Aberta de
a 1ª Semana de
Tecnologia de Alimentos
8/12
Sílvia Helena Carabolante
RG: 01950.877-9*

ANEXO 4. Ficha do aluno

03/08/2015

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Interunidades em Nutrição Humana Aplicada
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

89131 - 5050221/1 - Aurea Juliana Bombo Trevisan

Email:	bombo@usp.br
Data de Nascimento:	24/04/1980
Cédula de Identidade:	RG - 32,574,133-5 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Nutricionista - Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - São Paulo - Brasil - 2003
Mestrado:	Mestre em Saúde Pública - Área: Nutrição - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2006

Curso:	Doutorado
Programa:	Nutrição Humana Aplicada (1)
Data de Matrícula:	03/05/2011
Início da Contagem de Prazo:	03/05/2011
Data Limite para o Depósito:	30/10/2015
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Deborah Helena Markowicz Bastos - 03/05/2011 até o presente. Email: dmbastos@usp.br

Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 03/05/2011
Licença(s) Maternidade:	180 dias Período de 27/02/2015 até 25/08/2015

Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 01/08/2013
--	------------------------

Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 03/05/2011 Licença Maternidade em 27/02/2015
----------------------------------	---

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).
Última ocorrência: Licença Maternidade em 27/02/2015

Impresso em: 03/08/2015 13:46:58

03/08/2015

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Interunidades em Nutrição Humana Aplicada
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

89131 - 5050221/1 - Aurea Juliana Bombo Trevisan

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
EAE5876-4/4	Economia da Alimentação e Nutrição (Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade - Universidade de São Paulo)	01/08/2011	28/11/2011	120	8	82	A	N	Concluída
HNT5759-1/2	Nutrigenômica no Contexto das Doenças Crônicas não Transmissíveis (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	04/10/2011	08/11/2011	60	4	93	A	N	Concluída
HNT5762-1/1	Revisão Sistemática e Meta-Análise (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	07/11/2011	14/11/2011	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5706-2/1	Planejamento Experimental para Otimização de Produtos e Processos em Alimentos (Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo)	29/02/2012	12/06/2012	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5702-4/2	Compostos Bioativos em Alimentos e sua Relação com a Saúde (Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo)	06/03/2012	09/04/2012	30	2	100	A	N	Concluída
TNM5801-2/2	Princípios e Aplicações da Espectrometria de Massas (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo)	06/06/2012	28/08/2012	120	8	90	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	20	20	28
Estágios:			
Total:	20	20	28

Créditos Atribuídos à Tese: 147

Observações:

1) Unidades de Ensino responsáveis pelo programa: Faculdade de Saúde Pública - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade..

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Licença Maternidade em 27/02/2015

Impresso em: 03/08/2015 13:46:58