

Paula Cristina Amaro Chambel Gomes

Doseamento Simultâneo de Aldeídos Furânicos (5-HMF e Furfural), Ácido 5-O-Cafeoilquínico e Cafeína em Café Verde e Torrado.

Ensaio de Termodegradação do 5-HMF.

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 1997

Faculdade de Farmácia
Universidade do Porto

Doseamento simultâneo de aldeídos furânicos (5-HMF e furfural), ácido 5-O-cafeoilquínico e cafeína em café verde e torrado

Ensaio de termodegradação do 5-HMF

FACULDADE DE FARMÁCIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 30/05/25
Req. 2957
Col. 176-615(04)

FFM
GOM
2957

Paula Cristina Amaro Chambel Gomes
Porto, 1997

Trabalho de dissertação apresentado na Faculdade de Farmácia da U.P. para a obtenção do **grau de Mestre em controlo de Qualidade na área científica Água e Alimentos** (Resolução nº8/SC/SG/93, D.R.º126, II Série 31/05/93)

1997

**Trabalho realizado no Laboratório de Bromatologia da
Faculdade de Farmácia da
Universidade do Porto**

e integrado no Projecto de Investigação PBIC/C/TPR/2565/95 intitulado "Tecnologias de Produção Industrial de Alimentos: controlo da torrefacção do café"

Sob a orientação:

Prof. Auxiliar Doutora Maria Beatriz Oliveira

Co-orientação:

- **Professora Catedrática Doutora Margarida Alice Ferreira**
- **Doutora Paula Branquinho Andrade**

Os resultados obtidos neste trabalho foram objecto, em todo ou em parte, das seguintes publicações e comunicações científicas:

Publicações:

- Chambel, P., Oliveira, M. B., Andrade, P. B., Seabra, R. M. and Ferreira, M. A. (1997). Development of an HPLC/diode array detector method for simultaneous determination of 5-HMF, furfural, 5-*O*-caffeoylquinic acid and caffeine in coffee. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 20 (18), 2949-2957.

- Chambel, P., Oliveira, M. B., Andrade, P. B., Fernandes, J. O., Seabra, R. M. and Ferreira, M. A., Identification of Bis (2-formylfuran-5-yl) dimethylether by thermal decomposition of 5-hydroxymethyl-2-furfuraldehyde (em publicação).

- Beatriz Oliveira, M., Paula Andrade, Susana Cabral, Paula Chambel, Raquel Leitão, Rosa Seabra e Margarida Ferreira, Café: Possíveis indicadores químicos da torrefacção (aldeídos furânicos, ácidos clorogénicos, cafeína e ácidos gordos *trans* insaturados, *Rev. Port. Farm.* (aceite para publicação).

- Chambel, P., Oliveira, M. B., Casal, S. e Ferreira, M., Hidroximetilfurfural (5-HMF) em alimentos e bebidas: aspectos químicos, tecnológicos, toxicológicos e analíticos (em publicação).

Comunicações:

- Oliveira, B. M. P. P., Cabral, S. I. P., Gomes, P. C. A. C. e Ferreira, M. A. (1995). Efeito da torrefacção na composição dos ácidos gordos (isómeros *trans*) de cafés de diversas proveniências. *IX Encontro Galego Português de Química*, Lugo, Espanha, 22-24 Nov.

- Gomes, P. C., Andrade, P. B., Oliveira, M. B., Fernandes, J. O. e Ferreira, M. (1996). Estudo da termodegradação do 5-HMF. *XV Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química*, Porto, 22-25 Maio.

- Chambel, P., Beatriz, O., Andrade, P., Seabra, R. e Ferreira, M. (1996). Desenvolvimento de uma metodologia de HPLC/UV para a avaliação simultânea de aldeídos furânicos, ácido clorogénico e cafeína em café. *X Encontro Galego de Química*, Porto, 27-29 Nov.

Aos meus Pais
e ao Luís

Agradecimentos

À Senhora Professora Doutora Maria Beatriz Oliveira pela orientação científica desta dissertação, pelo acolhimento e disponibilidade das condições indispensáveis ao desenvolvimento do trabalho experimental, pelos valiosos ensinamentos e sugestões para a ultimização do presente texto e pela sua amizade.

À co-orientadora deste trabalho, Professora Doutora Margarida Alice Ferreira, por todo o suporte e imprescindível apoio prestados a este trabalho, pela sua capacidade de investigação e de resolução dos problemas surgidos, pela sua energia contagiante e ainda pela sugestão do tema de dissertação do Mestrado na área de especialização Água e Alimentos que se apresenta.

À co-orientadora Doutora Paula Branquinho Andrade pela ajuda no trabalho prático e por toda a colaboração e disponibilidade prestadas e ainda pela sua amizade.

Ao Doutor José Fernandes pela sua colaboração a nível da Espectrometria de Massa.

Aos elementos do Laboratório de Bromatologia pela integração e apoio que me proporcionaram.

À Senhora Professora Doutora Rosa Maria Seabra pela ajuda no isolamento do composto.

Ao Professor Doutor José Luís Costa Lima por me facilitar a entrada na Faculdade ao fim de semana.

À Engenheira Elisa pela sua amizade.

Aos colegas e amigos, que de uma forma ou de outra têm aqui expressa a sua ajuda.

Ao meu irmão pela composição gráfica da presente dissertação.

Aos meus pais, a quem devo tudo, o meu eterno agradecimento.

A todos, o meu sentido e profundo obrigado.

Resumo

Este trabalho descreve uma técnica de HPLC de fase reversa livre de interferências para a quantificação simultânea de 5-HMF, furfural, ácido 5-*O*-cafeoilquínico e cafeína em amostras de café verde e torrado. A preparação das amostras foi simples, envolvendo apenas a sua extracção com água fervente seguida de filtração. A separação cromatográfica foi conseguida mediante o emprego de uma coluna de fase reversa Spherisorb ODS2 (5 μ m; 25 x 0,46 cm). Recorreu-se a um gradiente de água + ácido acético 0,2% (A) e metanol (B). O eluato foi monitorizado por um detector de díodos, tendo os cromatogramas sido registados a 280 nm. As determinações foram feitas nas gamas lineares de 0,25-10 μ g/ml; 0,1-10 μ g/ml; 2,5-100 μ g/ml e 0,25-200 μ g/ml, respectivamente para o 5-HMF, furfural, ácido 5-*O*-cafeoilquínico e cafeína.

Por outro lado, procedeu-se à degradação térmica do 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (5-HMF) na gama de temperaturas de 100-220 °C em estufa em períodos de exposição de 15 minutos. A análise cromatográfica das misturas reaccionais foi conseguida mediante o emprego de HPLC acoplado a um detector de díodos e de uma coluna de fase reversa Spherisorb ODS2, tendo os cromatogramas sido registados a 280 nm. Para as condições de ensaio, para além do pico de 5-HMF residual (t_R 8,1 min), observaram-se quatro picos principais correspondentes a t_R 14,5; 20,9; 23,0 e 23,1 min. O composto 2 (t_R 14,5 min) foi isolado por HPLC semi-preparativa e identificado por UV, 1 H-RMN e GC-MS como o bis [2-formilfurano-5-il] dimetiléter, um éter simétrico do 5-HMF (M^+ 234; $C_{12}H_{10}O_5$).

Summary

This paper describes an interference-free reversed-phase HPLC procedure for simultaneous quantification of 5-HMF, furfural, 5-*O*-caffeoylquinic acid and caffeine in green and roasted coffee samples. The sample preparation was simple, only involving a boiled water extraction followed by filtration. The chromatographic separation was achieved using a reversed-phase column Spherisorb ODS2 (5 μm ; 25,0 x 0,46 cm). Gradient elution was carried out using water + acetic acid (0,2%) (A) and methanol (B). The effluent was monitored by a diode-array detector and chromatograms were recorded at 280 nm. The determinations were performed in the linear ranges 0,25-10 $\mu\text{g/ml}$; 0,1-10 $\mu\text{g/ml}$; 2,5-100 $\mu\text{g/ml}$ and 0,25-200 $\mu\text{g/ml}$ for 5-HMF, furfural, 5-*O*-caffeoylquinic acid and caffeine, respectively.

The thermal degradation of 5-hydroxymethyl-2-furfuraldehyde (5-HMF) was performed over a temperature range of 100-220 $^{\circ}\text{C}$ in a stove during exposure periods of 15 min. The chromatographic analysis of the reaction mixtures was achieved by HPLC/diode array detector using a reversed-phase column Spherisorb ODS2 and the chromatograms were recorded at 280 nm. Under the assayed conditions, besides the peak of residual 5-HMF (RT 8,1 min), four major peaks corresponding to RT 14,5; 20,9; 23,0 and 23,1 min were observed. Compound 2 (RT 14,5 min) was isolated by semipreparative HPLC and identified as a bis [2-formylfuran-5-yl] dimethylether, a symmetric ether of 5-HMF (M^+ 234; $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_5$), by UV ^1H -RMN and GC-MS spectral analysis.

Abreviaturas

Ác. - Ácido

ACF - "Aberrant Crypt Foci" (Zonas Proliferativas Aberrantes nas Criptas do Cólon)

aq. - aquosa

c/- com

CE - "Capillary Electrophoresis" (Electroforese Capilar)

CFQA - "Caffeoyl-5-feruloylquinic acid" (Ác. cafeoil-5-feruloilquínico)

CoCQA - "*p*-Coumaroylquinic acids" (Ác. *p*-coumaroilquínicos)

CQA - "Caffeoylquinic acid" (Ác. cafeoilquínico)

CV - Coeficiente de variação

CZE - "Capillary Zone Electrophoresis" (Electroforese Capilar de Zona)

δ - desvio químico

d - duplete

diCQA - "Dicaffeoylquinic acids" (Ác. dicafeoilquínicos)

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

Esq. - Esquema

FIA - "Flow Injection Analysis" (Análise por Injeção de Fluxo)

FID - "Flame Ionization Detector" (Detector de Ionização de Chama)

Fig. - Figura

FQA - "Feruloylquinic acids" (Ác. feruloilquínicos)

FTIR - "Fourier Transform Infra-Red Analysis" (Análise no Infra-Vermelho por Transformadas de Fourier)

GC - "Gas Chromatography" (Cromatografia em Fase Gasosa)

GFC - "Gel Filtration Chromatography" (Cromatografia por Filtração em Gel)

5-HMF - "5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde" (hidroximetilfurfural)

HPLC - "High-Performance Liquid Chromatography" (Cromatografia Líquida de Alta Resolução)

HPGFC - "High-Performance Gel-Filtration Chromatography" (Cromatografia por Filtração em Gel de Alta Resolução)

HPTLC - "High-Performance Thin Layer Chromatography" (Cromatografia em Camada Fina de Alta Resolução)

HRGC - "High Resolution Gas Chromatography" (Cromatografia Gasosa de Alta Resolução)

¹H-RMN - Ressonância Magnética Nuclear Protónica

Hz - Hertz

IEC - "Ion-Exclusion Chromatography" (Cromatografia de Exclusão Iônica)
IV - Infra-Vermelho
i.v. - endovenoso
J - constante de acoplamento
kg - quilo
l - litro
M⁺ - íão molecular
MEEC - "Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography" (Cromatografia Micelar Electrocinética Capilar)
mg - miligramas
min - minutos
mm - milímetros
nm - nanómetros
ox - oxidação
p.o. - via oral
pré-col. - pré-coluna
R² - coeficiente de correlação linear
red - redução
ref. - referência
RP-HPLC - "Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography" (Cromatografia de Alta Eficiência de Fase Reversa)
RT - "Retention Time" (Tempo de retenção)
s - singleto
s/ - sem
s.c. - subcutânea
SFE - "Supercritical-Fluid Extraction" (Extracção em Fluido Supercrítico)
sol. - solução
temp. - temperatura
TBA - "Thiobarbituric Acid" (Ácido Tiobarbitúrico)
THF - Tetrahidrofurano
TMS - Tetrametilsilano
t_R - tempo de retenção
UV - Ultravioleta
µm - micrómetro

Índice	pág. xi
Objectivos do trabalho	xiv
I - Parte Teórica	
1. Introdução	2
2. 5-HMF e Furfural	
2.1. Propriedades físicas e químicas	4
2.2. Mecanismos de Formação	7
2.3. Degradação e produtos de transformação	10
2.4. Actividade biológica	
2.4.1. Toxicocinética do 5-HMF	12
2.4.2. Mutagenicidade e Carcinogenicidade do 5-HMF	13
2.4.3. Toxicidade e Carcinogenicidade do furfural	14
2.5. Metodologias de doseamento	18
3. Ácido clorogénico	
3.1. Propriedades físicas e químicas	24
3.2. Actividade Biológica	26
3.3. Metodologias de doseamento	28
4. Cafeína	
4.1. Propriedades físicas e químicas	31
4.2. Actividade Biológica	33
4.3. Metodologias de doseamento	35
5. Café	
5.1. Café verde	
5.1.1. Breve introdução histórica	41
5.1.2. Origem botânica	42
5.1.3. Aspectos gerais sobre a composição química do café verde	43
5.2. Café torrado	

5.2.1. Efeito da torrefacção sobre os constituintes do café	44
5.2.2. Composição química	
5.2.2.1. Carbohidratos	45
5.2.2.2. Compostos azotados	45
5.2.2.3. Ácidos clorogénicos	45
5.2.2.4. Ácidos	46
5.2.2.5. Lípidos	46
5.2.2.6. Compostos voláteis	46
5.2.3. Actividade biológica do café	47
5.2.4. Metodologias de análise	50

II - Parte Experimental

2.1. Optimização de uma metodologia para o doseamento simultâneo de aldeídos furânicos (5-HMF e furfural), ácido 5-O-cafeoilquínico e cafeína em café verde e torrado

2.1.1. Introdução	57
2.1.2. Material e métodos	
2.1.2.1. Amostras	
2.1.2.1.1. Preparação das amostras	57
2.1.2.1.1.1. Processo de torrefacção	57
2.1.2.1.1.2. Processo extractivo	58
2.1.2.2. Reagentes e padrões	58
2.1.2.3. Metodologia	
2.1.2.3.1. Aparelhagem	58
2.1.2.3.2. Condições cromatográficas	58
2.1.2.3.3. Identificação	59
2.1.3. Doseamento	59
2.1.4. Validação do método	
2.1.4.1. Limite de detecção	62
2.1.4.2. Linearidade	62
2.1.4.3. Reprodutibilidade	62
2.1.4.4. Recuperação	62

2.2. Estudo da termodegradação do 5-HMF

2.2.1. Material e métodos

2.2.1.1. Aparelhagem	63
2.2.1.2. Reagentes e padrões	63
2.2.1.3. Protocolo	63
2.2.1.4. Condições cromatográficas	64
2.2.1.5. Isolamento do composto bis[2-formilfurano-5-il] dimetiléter	64
2.2.1.6. Identificação do composto bis[2-formilfurano-5-il] dimetiléter	64

III - Resultados e Discussão**3.1. Validação da metodologia otimizada para o doseamento simultâneo de aldeídos furânicos (5-HMF e furfural), ácido 5-O-cafeoilquínico e cafeína em café verde e torrado**

3.1.1. Limite de detecção	66
3.1.2. Linearidade	66
3.1.3. Reprodutibilidade	67
3.1.4. Recuperação	68
3.1.5. Cromatogramas	70

3.2. Isolamento e identificação do composto bis [2-formilfurano-5-il] dimetiléter

3.2.1. Cromatografia em camada fina	71
3.2.2. HPLC	71
3.2.3. Absorção no UV	75
3.2.4. ¹ H-RMN	76
3.2.5. GC/MS	77
3.2.6. Identificação do composto isolado	79

IV - Conclusões 82**V - Bibliografia** 83

Objectivos

Os objectivos deste trabalho foram os seguintes:

1. Desenvolvimento de uma metodologia multiparamétrica abrangente dos constituintes do café que se têm a vindo a revelar individualmente úteis na avaliação da qualidade e da autenticidade do mesmo (cafeína, ácidos clorogénicos, furfural e 5-hidroximetilfurfuraldeído), por forma a permitir de um modo simples e rápido a avaliação da qualidade do processo de torrefacção e da origem botânica e geográfica da matéria prima.
2. Realização de ensaios de termodegradação do 5-HMF segundo um protocolo de temperaturas programadas e tempo constante, no sentido de conhecer o comportamento deste aldeído frente ao calor.
3. Isolar e identificar algum (uns) produto(s) da decomposição do 5-HMF numa tentativa de seleccionar o parâmetro químico mais estável e resistente ao calor (temperaturas praticadas no processo de torrefacção) que possa vir a ser utilizado como melhor marcador químico da intensidade da torra.

I - Parte Teórica

1. Introdução

Os cafés verde e torrado são matrizes do mesmo alimento (sementes das espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* var. *robusta*), embora com uma composição química e propriedades aromáticas e de textura muito variadas. Enquanto que o café verde apresenta cor esverdeada acinzentada e estrutura córnea, sendo praticamente inodoro, o café torrado tem aroma característico intenso, cor castanha mais ou menos intensa e textura friável, o que permite a sua fácil moedura.

A torrefacção do café é uma operação fundamental, visto que é neste processo que o café verde adquire as características aromáticas, sápidas e a desejável friabilidade indispensáveis à obtenção do café bebida. Durante o processo e devido à intervenção do calor ocorrem múltiplas reacções químicas, mal conhecidas, de decomposição de compostos endógenos do café verde, com formação de novos compostos resultantes de reacções, entre outras, de decomposição e ciclização. A complexidade das reacções verificadas depende do tipo de torra empregue, sobretudo em termos da relação temperatura/tempo, podendo-se atingir temperaturas da ordem dos 220°C.

O 5-HMF e o furfural são aldeídos furânicos que resultam da desidratação e ciclização de certos hidratos de carbono, respectivamente das hexoses e pentoses (Wong, 1989). Estes compostos são utilizados na avaliação da qualidade dos produtos alimentares glucídicos, nomeadamente para averiguar o seu envelhecimento (Lee e Nagy, 1988) e o grau de aquecimento (Morales *et al.*, 1994) a que foram submetidos. O 5-HMF tem sido reconhecido como o produto principal da decomposição da frutose, da glucose e de outros açúcares em meio ácido (Antal e Mok, 1990). Este aldeído furânico tem sido empregue no controlo de qualidade (Lee e Nagy, 1988), sendo o seu teor frequentemente utilizado como indicador do tempo de armazenagem e/ou do grau de aquecimento.

No entanto, mediante certas condições de aquecimento (ex: esterilização ou torra), as concentrações de 5-HMF encontradas nos alimentos poderão não corresponder, quer aos valores reais do aquecimento, quer aos teores iniciais em 5-HMF. Para se esclarecerem tais factos, procedeu-se ao estudo da degradação térmica do 5-HMF numa gama de temperaturas entre os 100° e os 220°C. Este intervalo de temperaturas corresponde às temperaturas utilizadas na torrefacção do café, durante cerca de 15 min, e foi utilizada com o intuito de tentar esclarecer os mecanismos de degradação deste aldeído furânico. Pretendeu-se, igualmente, com este ensaio encontrar e tipificar um marcador químico de aquecimento se possível mais estável que o 5-HMF.

O ácido clorogénico (éster do ácido quínico com o ácido cafeíco) está presente no grão de café verde. Se a torra fôr efectuada em condições drásticas (temperaturas da ordem dos 220°C), este composto decompõe-se. Como tal, o seu teor num café poderá funcionar como marcador químico da intensidade de torrefacção efectuada.

A cafeína é a principal purina do café, sendo especialmente abundante na variedade Robusta, sublimando a temperaturas inferiores a 178°C. Durante a torra, esta temperatura é largamente ultrapassada. Assim, seria de esperar que ocorressem perdas significativas deste composto, o que na realidade parece não acontecer. A inclusão da determinação deste parâmetro no trabalho que se apresenta pretendeu confirmar o que já está descrito (Parliment e Stahl, 1995) e simultaneamente funcionar como um marcador da origem botânica da amostra, do processo de torrefacção e da qualidade do café.

A monitorização simultânea de aldeídos furânicos (5-HMF e furfural), do ácido clorogénico e da cafeína no café, entre outros, poderá ser particularmente útil, nomeadamente, como garantia da autenticidade das variedades de café, para a caracterização da sua origem geográfica, para garantir a qualidade do café torrado e indirectamente como controlo de qualidade do próprio processo de torra. Na literatura existem várias metodologias para a quantificação individual destes quatro compostos (Dauberte *et al.*, 1990; Trugo e Macrae, 1984), embora estejam descritas técnicas multiparamétricas (Smith, 1981; Daglia *et al.*, 1994). No entanto, as técnicas mais recentes não envolvem os quatro compostos estudados. Com o intuito de preencher esta lacuna, atingir os objectivos propostos e contribuir para o controlo de qualidade do café, nomeadamente desde a origem geográfica até ao consumidor final, desenvolveu-se a metodologia simples, rápida e económica aqui apresentada, tendo a sua validação sido executada em amostras de café verde e torrado.

2. 5-HMF e Furfural

2.1. Propriedades físicas e químicas

O hidroximetilfurfural ou hidroximetilfurfuraldeído, também designado por 5-(hidroximetil)-2-furaldeído (5-HMF) ou 5-(hidroxi)-2-furanocarboxaldeído é um aldeído furânico com uma massa molecular de 126,1. A este composto corresponde a estrutura química representada na Fig. 1.

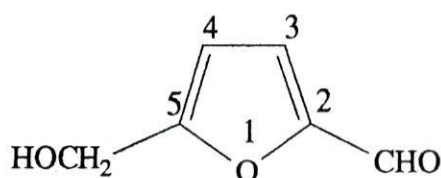


Fig. 1 - Estrutura química do 5-HMF

O 5-HMF à temperatura ambiente apresenta-se sob a forma de um líquido viscoso. Tem cor amarela e odor a flores de camomila. Os seus pontos de fusão e de ebulição são, respectivamente, 31,5 °C e 110 °C. A densidade deste composto é 1,2062.

O hidroximetilfurfural é muito solúvel em água, metanol, etanol, acetona, acetato de etilo e dimetilformamida. É solúvel em éter, benzeno e clorofórmio, menos solúvel em tetracloreto de carbono, sendo a sua solubilidade em éter de petróleo muito baixa (The Merck Index).

O 5-HMF é fotossensível, razão pela qual deve ser conservado ao abrigo da luz.

O hidroximetilfurfuraldeído absorve na região do Ultravioleta. O espectro deste composto em metanol (Fig. 2) apresenta duas bandas de absorção: uma muito ténue, com um máximo de absorção situado a 225 nm, e outra mais intensa, com um máximo de absorção localizado a 282 nm.

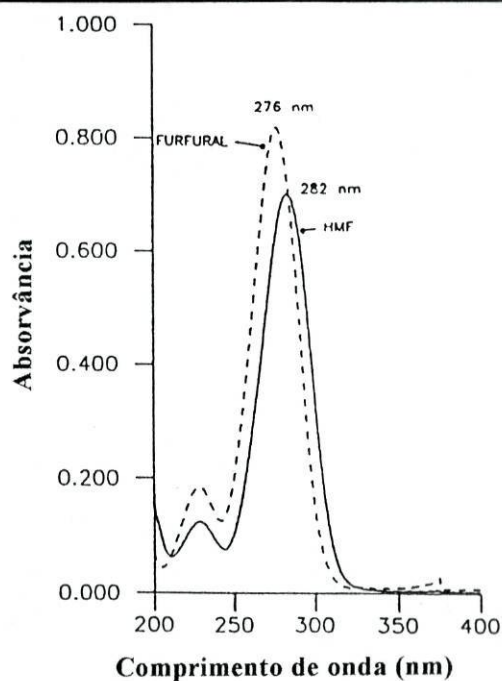


Fig. 2 - Espectro de absorção do 5-HMF e do furfural no UV

O furfural, também frequentemente denominado 2-furancarboxaldeído ou 2-furaldeído, é um aldeído furânico com uma massa molecular de 96,08 e cuja estrutura química se apresenta na Fig. 3.

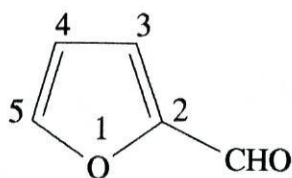


Fig 3 - Estrutura química do furfural

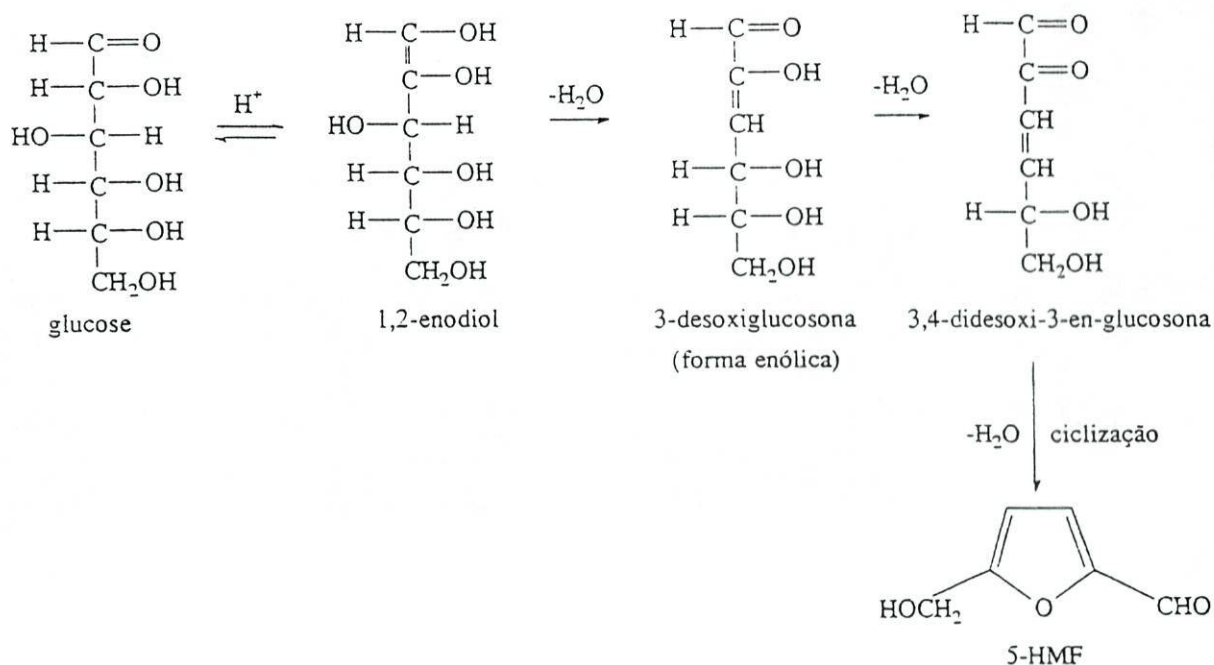
À temperatura ambiente, o furfural apresenta-se sob a forma de um líquido oleoso incolor, com um odor peculiar semelhante ao do benzaldeído. O furfural passa para amarelo ou castanho

mediante exposição ao ar e à luz, devendo ser conservado em recipiente escuro bem rolhado (The Merck Index).

O espectro de absorção em metanol deste composto no Ultravioleta é sobreponível ao do 5-HMF, apresentando duas bandas de absorção: uma, muito ténue, com um máximo de absorção situado a 225 nm, e outra mais intensa, com um máximo de absorção localizado a 276 nm (Fig. 2).

2.2. Mecanismos de Formação

O 5-HMF forma-se a partir das hexoses, por desidratação e ciclização, tal como se ilustra no Esquema 1 para a glucose.

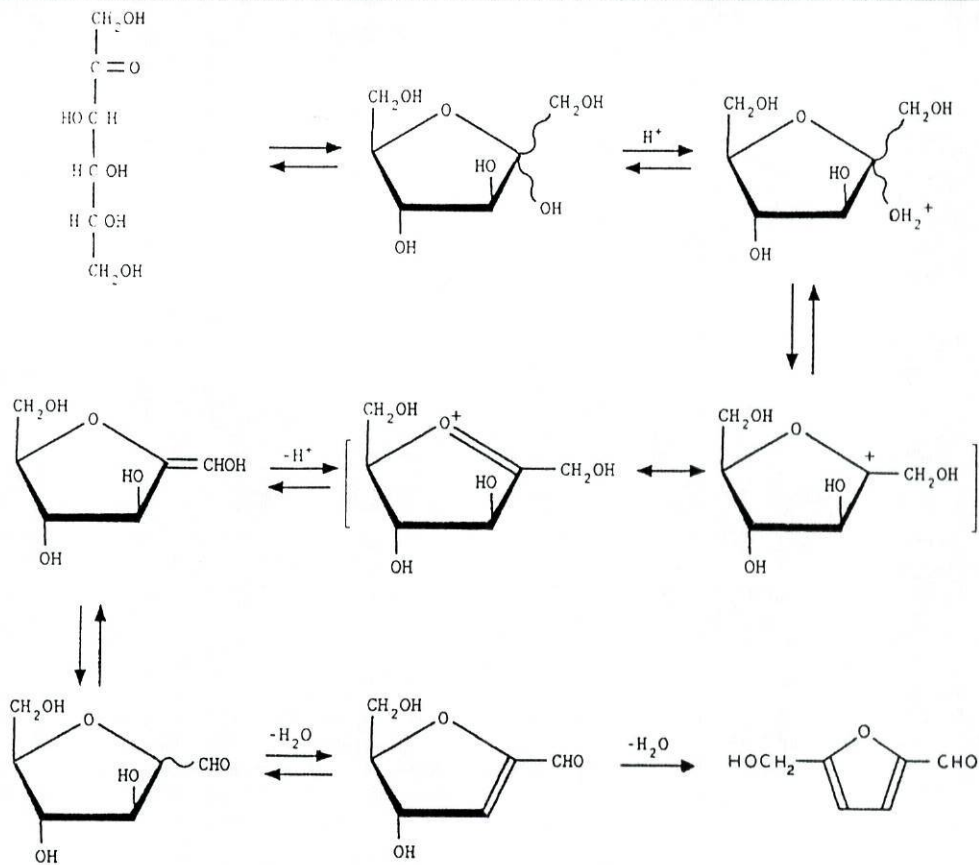


Esquema 1 - Formação do 5-HMF por desidratação da glucose (adaptado de Wong, 1989)

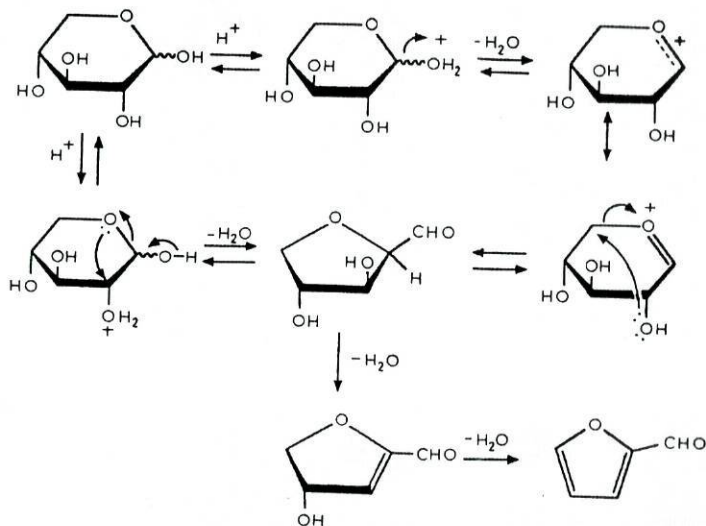
O furfural forma-se nos alimentos por um mecanismo semelhante ao anterior, mas a partir das pentoses, nomeadamente da xilose.

Por sua vez, Antal e Mok, 1990, defendem a formação do 5-HMF a partir da frutose via formação de um catião frutofuranosilo, tal como se mostra no Esquema 2.

No que se refere ao furfural, o mecanismo alternativo para a sua formação nos alimentos a partir da xilose encontra-se expresso no Esquema 3.

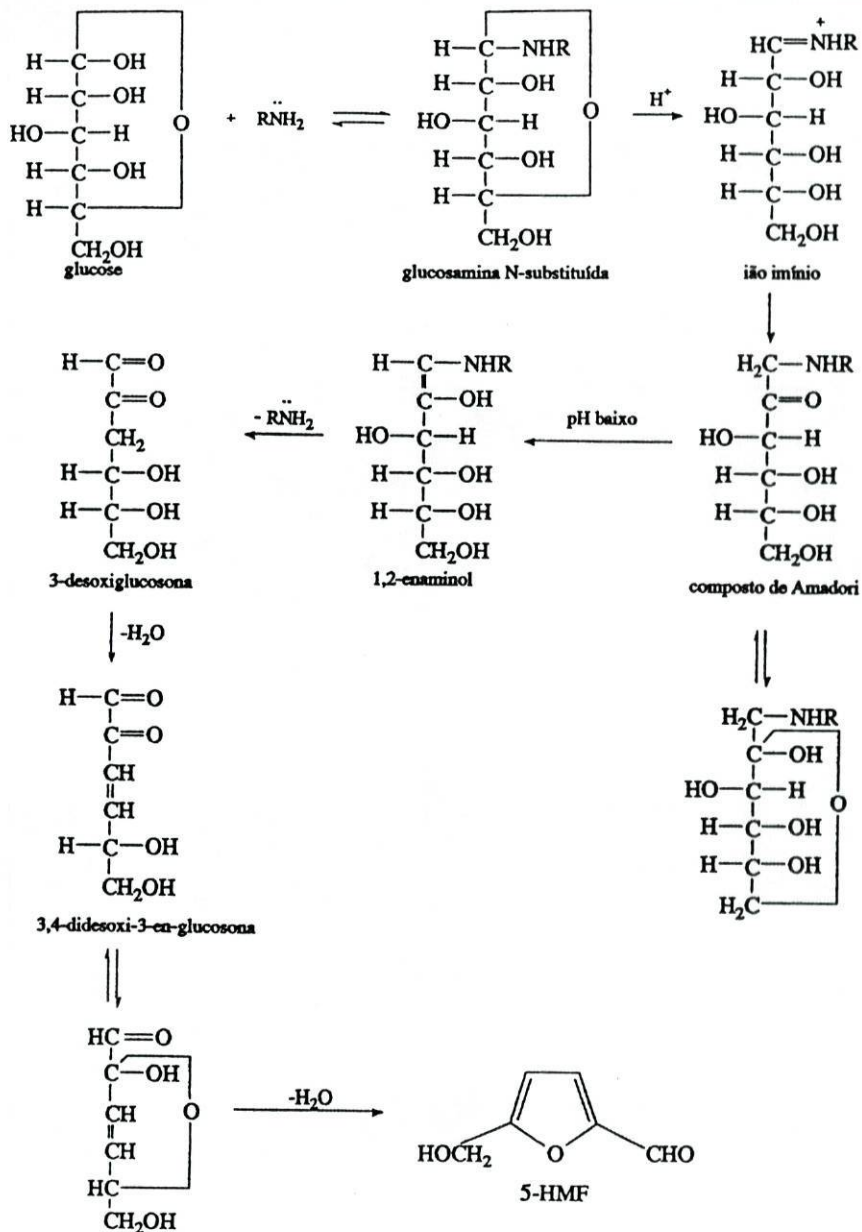


Esquema 2 - Mecanismo de formação do 5-HMF via catião frutofuranosilo (Antal e Mok, 1990)



Esquema 3 - Mecanismo de formação do furfural a partir da xilose (Antal *et al.*, 1991)

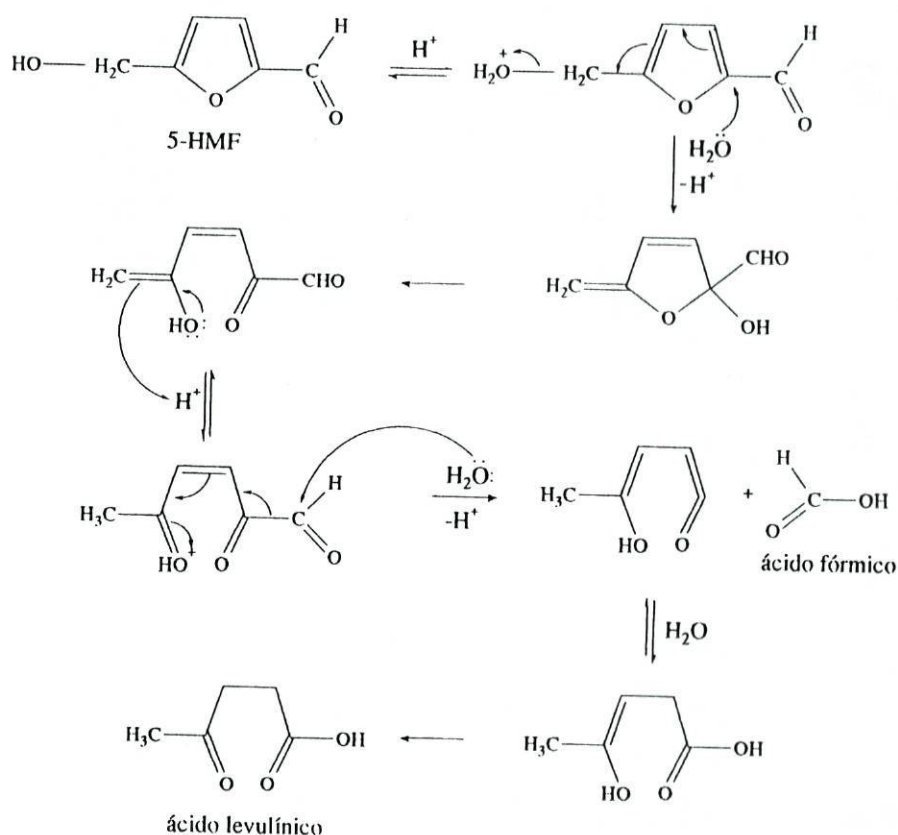
Para a formação do 5-HMF nos alimentos pode também contribuir a reacção de Maillard (Wong, 1989). Esta ocorre entre o grupo carbonilo de uma hexose e uma função amina. No Esquema 4 demonstra-se a formação deste aldeído furânico mediante a reacção da glucose com uma função amina.



Esquema 4 - Formação do 5-HMF a partir da glucose via reacção de Maillard (Wong, 1989)

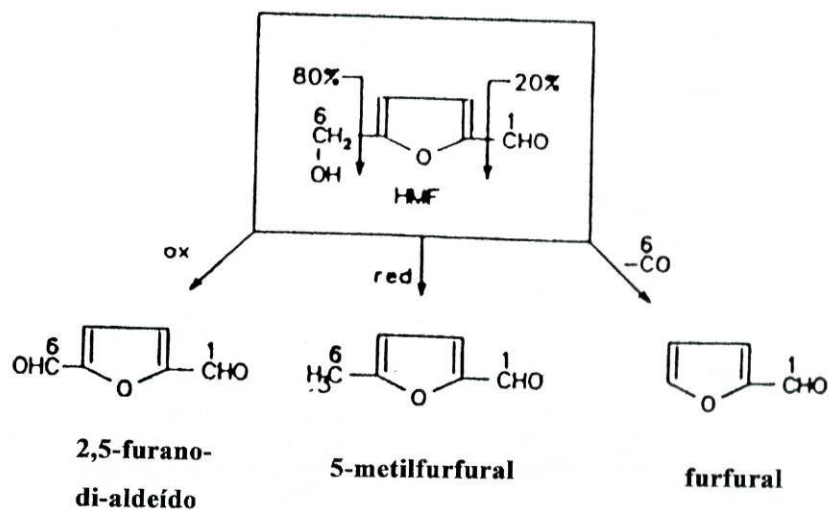
2.3 Degradação e produtos de transformação

O 5-HMF pode sofrer degradação térmica, em meio aquoso fortemente ácido, originando ácidos fórmico e levulínico (Esq. 5).



Esquema 5 - Mecanismo de degradação do 5-HMF (Dam *et al.*, 1986)

Para temperaturas da ordem dos 300 °C poderá ocorrer decomposição térmica do 5-HMF, tal como se ilustra no Esquema 6. Este processo poderá originar 2,5-furano-di-aldeído, 5-metilfurfural e furfural (Krohn, 1994).



Esquema 6 - Decomposição térmica do 5-HMF (Schrödter, 1992 citado por Krohn, 1994)

2.4. Atividade biológica

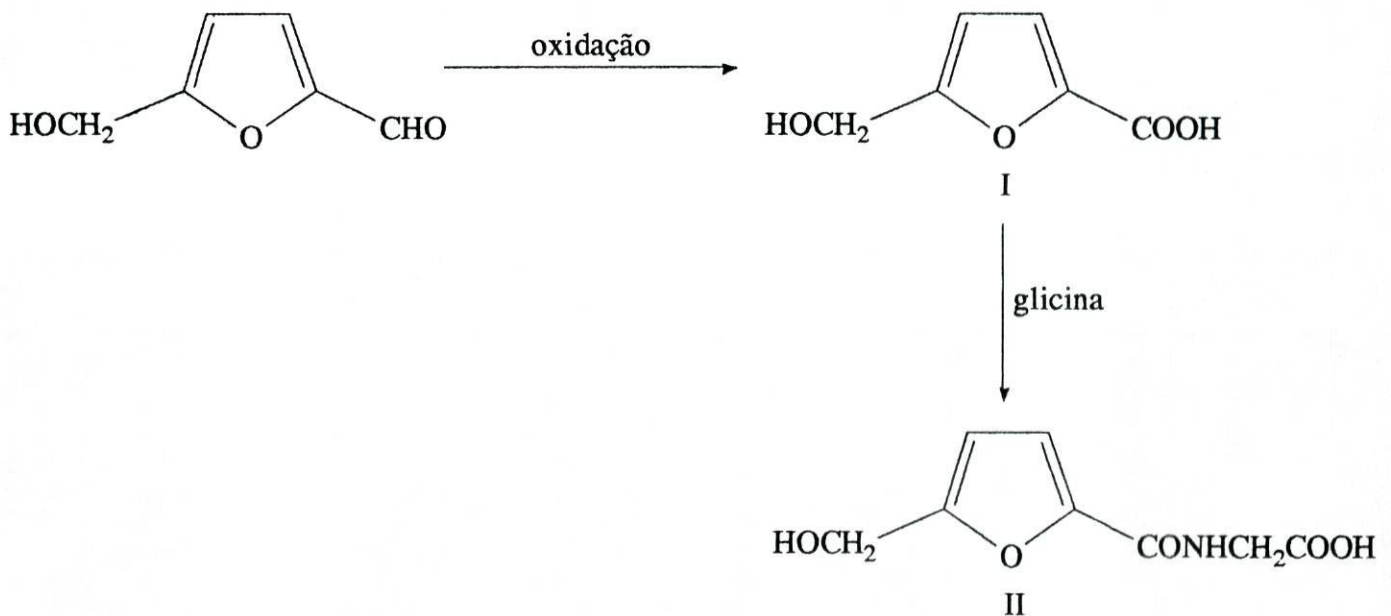
2.4.1. Toxicocinética do 5-HMF

A avaliação da cinética de absorção/eliminação do 5-HMF foi realizada em ratos por administração endovenosa e *per os* do material marcado radioativamente com ^{14}C . Germond *et al.* (1987) constataram que:

- na auto-radiografia dos animais, após a administração oral, o 5-HMF e/ou metabolitos se localizaram preferencialmente no rim e na bexiga e em pequena quantidade no fígado;

- pela via endovenosa verificou-se uma maior acumulação de material radioativo no cérebro;

- tal como se mostra no Esquema 7, a metabolização deste aldeído furânico conduziu à conversão completa do 5-HMF em dois metabolitos: ácido 5-hidroxi-metil-furóico (I) e N-(hidroximetil-2-furoil)glicina (II). O metabolito II, resultante da conjugação do 5-HMF com a glicina, diminuiu com o aumento da dose administrada;



Esquema 7 - Metabolização do 5-HMF no rato (Germond *et al.*, 1987)

- a eliminação de 5-HMF marcado administrado aos ratos ocorreu após 24 horas. A taxa de recuperação do 5-HMF ou dos seus metabolitos foi, em regra, de 85 a 100%. No entanto, na bibliografia estão descritos casos em que ocorreu uma retenção de 50%.

2.4.2. Mutagenicidade e Carcinogenicidade do 5-HMF

Estudos de mutagenicidade de misturas aquosas de glucose e ácidos aminados aquecidas a 100 °C foram positivos, permitindo formular a hipótese desse facto se dever à formação de 5-HMF. Estes autores procederam ao isolamento do 5-HMF e estudaram a sua mutagenicidade através do teste de Ames na *Salmonella typhimurium* TA 100, tendo obtido resultados positivos (Omura *et al.*, 1983 citado por Namiki, 1988).

Em 1993, Zhang *et al.*, verificaram que a dieta de ratos suplementada com sacarose aquecida promovia o desenvolvimento de zonas proliferativas aberrantes nas criptas do cólon (ACF). Para confirmar os resultados, os autores injectaram em 45 ratos fêmea F₃₄₄ o carcinógeno do cólon azoximetano (AOM). Uma semana depois, os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos que ingeriram a mesma dieta base, mas suplementada com diferentes compostos. Assim, na dieta do primeiro grupo foi introduzida sacarose não tratada, na do segundo sacarose aquecida, na do terceiro sacarose isenta de 5-HMF e na do último 1% de 5-HMF. Nos animais do segundo e quarto grupos verificou-se o desenvolvimento acentuado dos ACF comparativamente com os animais controlo que não receberam 5-HMF no suplemento alimentar.

Para avaliar os possíveis efeitos iniciadores do cancro do cólon pelo 5-HMF, os autores recorreram a 172 ratos fêmea F₃₄₄. Os animais foram divididos em 3 grupos, tendo recebido, por sonda gástrica, respectivamente, doses de água, de 5-HMF (2 x 300 mg/kg) ou de AOM (2 x 5 mg/kg). Após 30 dias os animais foram sacrificados e procedeu-se à contagem das ACF desenvolvidas. Verificaram que o 5-HMF era um indutor de ACF, observando-se uma relação dose-efeito. No entanto, o efeito indutor proliferativo do 5-HMF sobre as criptas do cólon foi inferior ao manifestado pelo AOM.

Destes ensaios Zhang e colaboradores concluíram que o açúcar aquecido nas condições do processamento culinário poderá actuar como iniciador e/ou promotor do cancro do cólon devido à presença do 5-HMF.

Actualmente considera-se que o 5-HMF tem actividade mutagénica e ainda propriedades

citotóxicas, genotóxicas e carcinogénicas. No entanto, os mecanismos da sua toxicidade continuam por esclarecer.

Uma hipótese desse mecanismo foi sugerida por Surth *et al.* (1994) e Surth e Tannenbaum (1994) e consiste na bioactivação do 5-HMF por esterificação do grupo hidroxílico alílico e formação do 5-oxisulfoximetilfurfural (5-SMF). Este composto apresenta mutagenicidade directa sobre os genes da timidina quinase e da hipoxantina guanidina fosforibosiltransferase de linfoblastos humanos. É indutor de mutantes de *Salmonella typhimurium* TM 677 resistentes à 8-azaguanidina. Porém, a mutagenicidade intrínseca deste éster parece ser favorecida pela adição de iões cloreto ao meio e inibida pela adição de ácido ascórbico.

Quando existem cloretos no meio forma-se um metabolito lipofílico clorometilado denominado 5-clorometilfurfural (CMF). Este metabolito mostrou-se também mutagénico e citotóxico, possuindo uma reactividade superior à do 5-SMF. Apresentou, igualmente, uma forte actividade hepatocarcinogénica em ratos jovens $B_6C_3F_1$.

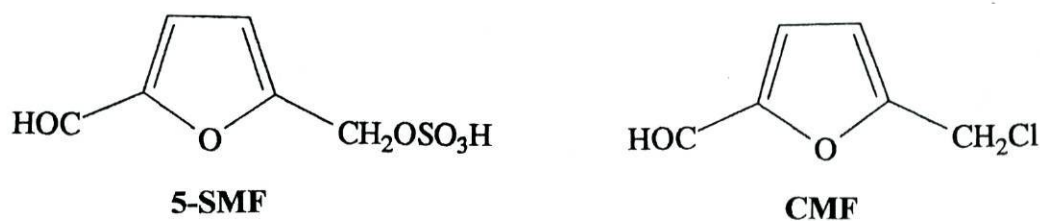


Figura 4 - Estruturas químicas do 5-SMF e do CMF

Foram estudados outros derivados furânicos sem função aldeídica livre (2-oxisulfoximetilfurano e 2-clorometil furano), os quais apresentaram fraca actividade mutagénica. Devido a este comportamento, Surth e Tannenbaum (1994) concluíram que a função aldeídica é determinante na toxicidade do 5-HMF.

2.4.3. Toxicidade e carcinogenicidade do furfural

Estão descritos na bibliografia estudos toxicológicos e carcinogénicos, que administravam furfural (grau de pureza de 99%), veiculado em óleo de milho, a ratos $F_{344/N}$ e ratinhos $B_6C_3F_1$. A administração era feita por sonda gástrica durante 16 dias, 13 semanas e/ou 2 anos.

Os estudos genotóxicos descritos foram efectuados em *Salmonella typhimurium*, células de linfoma de rato, células de ovário de hamster Chinês, em *Drosophila melanogaster* e em células da medula óssea de ratinho.

O protocolo usado e os resultados obtidos foram:

- *Estudos de 16 dias*: os ratos receberam doses compreendidas entre 15 e 240 mg/kg de peso corporal. Os ratinhos receberam doses que variaram entre os 25 e os 400 mg/kg de peso corporal.

Oito dos dez ratos que receberam doses de 240 mg/kg de peso corporal morreram num espaço de 3 dias. O peso médio final dos animais quimicamente expostos era semelhante ao dos animais controlo; não se verificaram lesões histológicas em nenhum dos grupos.

- *Estudos de 13 semanas*: os ratos receberam doses compreendidas entre 11 e 180 mg/kg de peso corporal. Nos ratinhos as doses administradas variaram entre os 75 e os 1200 mg/kg de peso corporal.

A maioria dos ratos que receberam doses de 180 mg/kg de peso corporal morreram. Os pesos médios corporais foram semelhantes aos dos animais controlo.

Os pesos médio e absoluto do rim e do fígado sofreram um aumento nos ratos que receberam 90 mg/kg de peso corporal.

A vacuolização citoplasmática dos hepatócitos mostrou ser elevada nos ratos macho que foram quimicamente expostos ao furfural.

Praticamente todos os ratinhos que receberam doses compreendidas entre os 600 e os 1200 mg/kg de peso corporal morreram ao fim das 3 primeiras semanas.

O peso corporal médio e a relação fígado/peso corporal sofreu um aumento nos ratinhos fêmea que receberam 300 mg/kg de peso corporal.

Nos ratinhos quimicamente expostos houve necrose coagulativa centrilobular e/ou inflamação subcrónica multifocal do fígado, não se verificando tais efeitos nos animais controlo.

Tendo por base estes resultados, as doses seleccionadas para os estudos de 2 anos foram 0, 30 e 60 mg/kg de peso corporal para os ratos e 0, 50, 100 e 175 mg/kg de peso corporal para os ratinhos.

- *Peso corporal e sobrevivência nos estudos de 2 anos*: os pesos corporais médios dos animais quimicamente expostos e dos animais controlo foram semelhantes ao longo do estudo, quer nos ratos, quer nos ratinhos.

Os ratos macho que sobreviveram ao estudo, os ratos fêmea que receberam a dose mais baixa e os ratinhos não foram afectados pela exposição ao furfural.

A sobrevivência dos ratos fêmea aos quais se administrou a dose mais elevada foi reduzida em virtude das mortes associadas à via de administração utilizada; a administração do furfural foi considerada como um factor que contribuiu para as mortes devidas à administração por sonda gástrica.

- *Efeitos neoplásicos e não-neoplásicos nos estudos de 2 anos*: houve necrose centrilobular do fígado com maior incidência nos ratos macho quimicamente expostos. Dois dos ratos macho aos quais se administrou uma dose elevada tinham displasia do ducto biliar com fibrose e outros dois sofriam de colangiocarcinomas; nenhuma destas lesões foram encontradas nos outros grupos expostos a dosagens diferentes.

Os ratinhos quimicamente expostos apresentaram fígado com pigmentação multifocal e inflamação crónica da subserosa. As incidências de adenomas e carcinomas hepatocelulares nos ratinhos macho e adenomas hepatocelulares nos ratinhos fêmea mostrou ser significativamente elevadas no grupo a que foi administrada a dose mais elevada em comparação com os animais controlo.

Três dos ratos macho quimicamente expostos apresentaram adenomas ou carcinomas renais corticais, verificando-se um adenoma cortical renal num rato fêmea submetido a uma dose baixa de furfural.

Os ratinhos fêmea expostos ao furfural apresentaram hiperplasia do estômago, havendo papilomas das células escamosas nos ratinhos fêmea aos quais se administraram doses elevadas.

- *Toxicidade genética*: não se encontrou actividade mutagénica quando se empregaram testes de mutação genética a quatro estirpes de *Salmonella* (TA 98, TA 100, TA 1535 e TA 1537), com ou sem activação metabólica.

A exposição ao furfural induziu resistência à trifluorotimidina em células de linfoma de rato L5178Y na ausência da fracção S9.

Verificaram-se trocas entre cromátides irmãs e aberrações cromossómicas nas células de ovário de hamster Chinês, quer na presença, quer na ausência da fracção S9.

Houve um aumento de mutações recessivas letais associadas ao sexo, mas não se verificaram translocações recíprocas nas células germinais da *D. melanogaster*.

O furfural não induziu trocas entre cromátides irmãs ou aberrações cromossômicas nas células da medula óssea de ratinhos $B_6C_3F_1$.

Conclusões:

Nestes estudos o furfural pareceu mostrar:

- alguma actividade carcinogénica nos ratos macho $F_{344/N}$ em virtude da ocorrência de colangiocarcinomas em dois animais e displasia dos ductos biliares com fibrose noutros dois animais;

- não possuir actividade carcinogénica nos ratos fêmea $F_{344/N}$ que receberam doses de 0, 30 ou 60 mg de furfural /kg de peso corporal;

- ser capaz de induzir actividade carcinogénica nos ratinhos macho $B_6C_3F_1$, atendendo à incidência de adenomas e carcinomas hepatocelulares.

Os adenomas e/ou os carcinomas corticais renais nos ratinhos macho, assim como os papilomas das células escamosas do estômago nos ratinhos fêmea poderão estar relacionados com a exposição ao furfural (Internet TR-382-furfural).

2.5. Metodologias de doseamento

Vários métodos têm sido propostos para dosear o 5-HMF e o furfural nos alimentos. A Tabela 1 resume algumas das metodologias empregues nos últimos anos.

Tabela 1 - Metodologias analíticas propostas para o doseamento do 5-HMF e do furfural nos alimentos

Composto	Método	Referência	Aplicação
5-HMF	<i>Colorimétrico</i>	Meydav e Berk, 1978	sumo de laranja
	- reacção do TBA - detecção visível 443 nm		
5-HMF	<i>Espectrofotométrico</i>	White, 1979	mel
	- reacção do bissulfito - detecção UV 284 e 336 nm		
5-HMF e Furfural	<i>GC</i>	Shimizu e Watanabe, 1979	vinho
	- coluna de vidro AW-DMCS - gás de arrastamento: azoto - detector FID		
5-HMF e Furfural	<i>RP-HPLC</i>	Jeuring e Koppers, 1980	bebidas alcoólicas e mel
	- Lichrosorb RP-18; 10 µm - MeOH / água isocrático - detecção UV 285 nm		
5-HMF	<i>RP-HPLC</i>	Allen e Chin, 1980	pasta de tomate
	- Lichrosorb C ₈ ; 10 µm - 100% isocrático - detecção UV 284 nm		
5-HMF	<i>RP-HPLC</i>	Alfonso <i>et al.</i> , 1980	corante caramelo, bebidas alcoólicas destiladas e aromas de bebidas alcoólicas c/ corante caramelo
	- ODS C ₁₈ ; 10 µm - gradiente MeOH / água - detecção UV 277 nm		
5-HMF e Cafeína	<i>HPLC</i>	Smith, 1981	café e extractos de chicória
	- Hypersil ODS - isopropanol 5% / diclorometano isocrático - detecção UV 280 nm		
Furfural	<i>FIA</i>	Alonso <i>et al.</i> , 1982	bebidas alcoólicas
	- reacção de Stenhouse - detecção visível 517 nm		

Tabela 1 (continuação)

Composto	Método	Referência	Aplicação
5-HMF	<i>RP-HPLC</i>	Williams <i>et al.</i> , 1983	vinho do Porto
	- Spherisorb C ₁₈ ; 10 µm - MeOH / água + NaH ₂ PO ₄ 0,01 M (15:85) isocrático - detecção UV 284 nm		
Furfural	<i>RP-HPLC</i>	Marcy e Rouseff, 1984	sumo de laranja
	- Zorbax ODS - MeOH / água isocrático - detecção UV 280 nm		
5-HMF	<i>RP-HPLC</i>	Cilliers e Niekerk, 1984	sumos e concentrados de sumo de fruta
	- Spherisorb C ₁₈ ; 5 µm - acetonitrilo 2,5% + MeOH 5% + THF (1:1:1) isocrático - RP-18; 5 µm - MeOH / água (5:95) isocrático - detecção UV 284 nm		
5-HMF	<i>RP-HPLC</i>	Cook e Pinkerton, 1985	sumo de tomate
	- Microsorb C ₁₈ ; 5 µm - gradiente MeOH / água - detecção UV 284 nm		
Furfural, Acrilaldeído, Propionaldeído, Isovaleraldeído e Metilbutiraldeído	<i>RP-HPLC</i>	Puputti e Lehtonen, 1986	uísque
	- derivatização a 2,4-dinitrofenilhidrazonas - Nucleosil 5 C ₁₈ ou Spherisorb S5 ODS-2 - gradiente acetonitrilo / água - detecção «diode array» 352-436 nm		
5-HMF	<i>RP-HPLC</i>	Lee <i>et al.</i> , 1986	sumo de citrinos
	- pré-col C ₁₈ - Radial PaK C ₁₈ ; 10 µm - acetonitrilo / água (15:85) isocrático - detecção UV 280 nm		
5-HMF	<i>RP-HPLC</i>	Mijares <i>et al.</i> , 1986	sumo de laranja
	- Spherisorb 5 C ₈ ; 5 µm - acetonitrilo / água +ác. fosfórico 0,2% (5:95) isocrático - detecção UV 285 nm		

Tabela 1 (continuação)

Composto	Método	Referência	Aplicação
5-HMF e Substâncias fenólicas	<i>RP-HPLC</i>	Pompei <i>et al.</i> , 1986	mosto de uva concentrado e rectificado
	- pré-col. Corasil μ Bondapak - Phenyl μ Bondapak - água / MeOH / ác. acético (80:18:2) isocrático - detecção UV 280 nm		
5-HMF e Furfural	<i>Espectrofotométrico</i>	Gómez <i>et al.</i> , 1987	vinho do Jerez
	- derivatização a tiosemicarbazonas - detecção UV 316 nm furfural - detecção UV 321 nm 5-HMF		
5-HMF	<i>RP-HPLC</i>	Boekel e Rehman, 1987	leite
	- pré-col. Chrompak - CP-Spher C ₁₈ ; 3 μ m - MeOH / ác. acético pH = 3,6 (10:90) isocrático - detecção UV 280nm		
5-HMF e Furfural	<i>Espectrofotométrico</i>	Montilla-Gomez <i>et al.</i> , 1988	vinho de Málaga
	- derivatização a tiosemicarbazonas - detecção UV 316 nm furfural - detecção UV 322 nm 5-HMF		
5-HMF, Ác. clorogénico e cafeico	<i>RP-HPLC</i>	Rizzolo <i>et al.</i> , 1989	sumo de frutas
	- LiChrosorb RP8; 5 μ m - KH ₂ PO ₄ 0,033 M / MeOH / ác. acético (76:20:4) isocrático - detecção UV 313 nm		
Furfural	<i>GC</i>	Hernandez <i>et al.</i> , 1990	vinho
	- Carbowax 1500 - gás de arrastamento: azoto - detecção FID		
5-HMF	<i>RP-HPLC</i>	Dauberte <i>et al.</i> , 1990	bebidas à base de sumo de fruta, cafés torrefacto e cafés sem açúcar
	- C ₁₈ Waters; 5 μ m - MeOH / água (10:90) isocrático - detecção UV 280 nm		
Glucose, Frutose e Sacarose	<i>RP-HPLC</i>	Dauberte <i>et al.</i> , 1990	bebidas à base de sumo de fruta, cafés torrefacto e cafés sem açúcar
	- NH ₂ Merck; 10 μ m - acetonitrilo / água (85:15) isocrático - detecção índice de refração		

Tabela 1 (continuação)

Composto	Método	Referência	Aplicação
5-HMF	<i>RP-HPLC</i>	Porreta e Sandei, 1991	pasta e sumo de tomate
	- Radialpak C ₁₈ ; 10 µm - MeOH / água (10:90) isocrático - detecção UV 285 nm		
5-HMF e Furfural	<i>RP-HPLC</i>	Gomis <i>et al.</i> , 1991	sumo e concentrado de maçã
	- Spherisorb ODS-2; 3 µm - acetoneitrilo / água (8:92) isocrático - detecção UV 280 nm		
5-HMF e Furfural	<i>Espectrofotometria derivativa</i>	Mansilla <i>et al.</i> , 1992	sumos de laranja e de uva
	- reacção de Winckler - detecção visível		
5-HMF e Furfural	<i>Espectrofotometria derivativa</i>	Lopez <i>et al.</i> , 1992	sumo de laranja
	- reacção do TBA - detecção visível		
Furfural	<i>RP-HPLC</i>	Lo Coco <i>et al.</i> , 1992	bebidas alcoólicas
	- derivatização a 2,4-dinitrofenilhidrazona - Supelcosil LC-18; 5 µm - acetoneitrilo / água (65:35) isocrático - detecção UV 388 nm		
5-HMF	<i>RP-HPLC</i>	Hernández <i>et al.</i> , 1992	cereais para bebé
	- Spherisorb S5 ODS-2 - acetoneitrilo / água (5:95) isocrático - detecção UV 284 nm		
5-HMF e Furfural	<i>RP-HPLC</i>	Mir <i>et al.</i> , 1992	brandies e corante caramelo
	- Lichrospher Merck C ₁₈ - MeOH / água (10:90) isocrático - detecção UV 280 nm		
5-HMF e Furfural	<i>MBEC</i>	Corradini e Corradini, 1992	sumo de uva
	- coluna capilar de sílica fundida - tampão fosfato 0,05 M (pH=7,5) + SDS 0,10 M - 10 kV - detecção UV 280 nm		
5-HMF	<i>IEC</i>	Kim e Richardson, 1992	sumo, mel, xarope, pasta de tomate, concentrado de sumo de uva e pêras liofilizadas
	- pré-col. Wescan de exclusão aniónica - Wescan SH de exclusão aniónica - ác. sulfúrico 10 mM - detecção UV 285 nm		

Tabela 1 (continuação)

Composto	Método	Referência	Aplicação
5-HMF, Glucose, Frutose, Sacarose, Etanol e Glicerol	IEC	Fuleki e Pelayo, 1993	sumos de uvas naturais e comerciais
	- pré-col. Sugar-Pak II - Sugar-Pak I - propionato de Ca 0,1 mM / EDTA dissódico de Ca 1 mM - detecção índice de refração		
5-HMF	RP-HPLC	Villanova <i>et al.</i> , 1993	cereais de pequeno almoço
	- Spherisorb S5 ODS-2 - acetonitrilo / água (5:95) isocrático - detecção UV 285 nm		
Aldeídos furânicos	Semi-automático descontinuo por FIA	Mansilla <i>et al.</i> , 1993	mel, sumos de uva e de laranja, vinho de Málaga e vinho tinto
	- reacção do TBA - detecção visível 425 nm		
5-HMF	RP-HPLC	Traore <i>et al.</i> , 1993	sumos e concentrados de laranja
	- derivatização a hidrazona - Nucleosil; 5 µm - acetato de etilo / éter de isopropilo (9:1) isocrático - detecção fluorescência 444 nm		
5-HMF e Furfural	RP-HPLC	Lo Coco <i>et al.</i> , 1994	sumo de citrinos
	- derivatização a 2,4-dinitrofenilhidrazonas - Supelcosil LC-18; 5 µm - acetonitrilo / água (55:45) isocrático - detecção UV 385 nm		
5-HMF	HPTLC	Kiridena <i>et al.</i> , 1994	extracto de baunilha
	- placa HPTLC de gel de sílica - clorofórmio / acetato de etilo / 1-propanol (47:1:2) - detecção UV 280 nm		
5-HMF e Ác. ascórbico, quínico, fórmico, láctico, chiquínico, málico, tartárico, cítrico, isocítrico, fumárico, galacturónico, succínico e oxálico	RP-HPLC	Grosheney <i>et al.</i> , 1995	sumos de fruta
	- Spherisorb ODS 2 (40 °C); 5 µm - K ₂ PO ₄ 0,01 M + TBAP - detecção UV 210 e 270 nm		
5-HMF e Furfural	RP-HPLC	Lo Coco <i>et al.</i> , 1995	cerveja
	- derivatização a 2,4-dinitrofenilhidrazonas - Supelcosil C-18; 5 µm - acetonitrilo / água (55:45) isocrático - detecção UV 385 nm		

Tabela 1 (continuação)

Composto	Método	Referência	Aplicação
5-HMF, Sacarose, Glucose e Frutose	RP-HPLC	Yuan <i>et al.</i> , 1996	bebidas
	- Aminex HPX-8H - acetonitrilo / ác. sulfúrico 10 mM (2:3) - detecção UV 280 nm 5-HMF - detecção índice de refração açúcares		
5-HMF, Furfural, <i>p</i> -hidroxibenzaldeído, Vanilina, Siringaldeído e Ác. gálhico, vanílico, siringio e elágico	RP-HPLC	Barroso <i>et al.</i> , 1996	brandies do Jerez
	- LiChrospher RP-C ₁₈ ; 5 µm - MeOH + ác. acético + água (5:2:93) / MeOH + ác. acético + água (90:2:8) isocrático - detecção «diode array» 240-390nm		
5-HMF e Furfural	RP-HPLC	Lo Coco <i>et al.</i> , 1996	mel
	- derivatização a 2,4-dinitrofenilhidrazonas - Supelcosil LC-18; 5µm - acetonitrilo / água (55:45) isocrático - detecção UV 385 nm		
5-HMF e Furfural	RP-HPLC	Nicoletti <i>et al.</i> , 1996	bebidas
	- Supelcosil LC-18; 5 µm - acetonitrilo / água (3:47) isocrático - detecção UV 280 nm		

Conforme se pode constatar a partir da Tab. 1, várias técnicas têm sido empregues para dosear o 5-HMF e o furfural nos alimentos, nomeadamente colorimétricas, espectrofotométricas, cromatográficas (GC, RP-HPLC, HPTLC, IEC e MECC) e por FIA. No entanto, nos últimos anos têm-se recorrido preferencialmente à HPLC de fase reversa para dosear os aldeídos furânicos nos alimentos, dada a simplicidade, rapidez e economia desta técnica.

As técnicas de RP-HPLC propostas apresentam em comum as seguintes características:

- empregarem colunas de fase estacionária apolar C₁₈, em geral
- uso de eluentes polares: acetonitrilo, água, metanol, geralmente sob a forma de misturas binárias (acetonitrilo/água; metanol/água)
- detecção no UV, geralmente entre 280-285 nm.

3. Ácido clorogénico

O ácido clorogénico parece ter sido isolado pela primeira vez em 1908 por Goter e a sua estrutura estabelecida como ácido 3-*O*-cafeoilquínico (3-CQA) por Fisher & Dangschat em 1932 (Clifford, 1989). Com os avanços das técnicas analíticas verificou-se que o ácido clorogénico inicialmente isolado era o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (5-CQA) e não o 3-CQA.

Neste trabalho o ácido clorogénico será empregue como sinónimo de 5-CQA.

3.1. Propriedades físicas e químicas

O ácido clorogénico, também frequentemente designado por ácido 3,4-dihidroxicinâmico ou 5-carboxi-2,3,5-trihidroxiciclohexil éster ou ácido 5-*O*-cafeoilquínico apresenta uma massa molecular de 354,30. A sua estrutura apresenta-se na Figura 5 e tem um ponto de fusão de 208 °C.

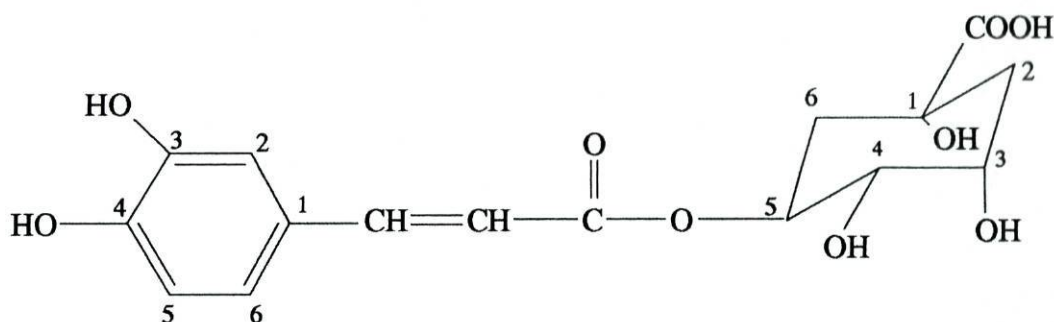


Fig. 5 - Estrutura química do ácido clorogénico

O ácido clorogénico é muito solúvel em álcool e acetona. É ligeiramente solúvel em acetato de etilo. A sua solubilidade em água a 25 °C é cerca de 4%, sendo muito mais solúvel em água quente.

O ácido cafeico é um produto da sua hidrólise com ácido clorídrico diluído.

Este composto absorve na região do UV, apresentando o seu espectro em metanol um máximo de absorção a 247 nm e outro a 322 nm, com um ponto de inflexão a 298 nm (Fig. 6).

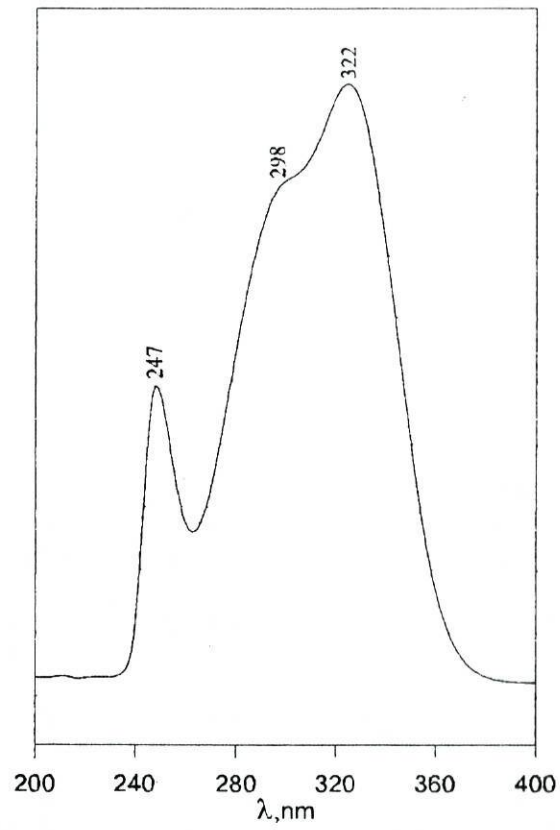


Fig. 6 - Espectro de absorção do ácido clorogénico no UV

3.2. Actividade biológica

Tanaka *et al.*, 1990, estudaram o efeito inibitório do ácido clorogénico sobre a hepatocarcinogenicidade em ratos e hamsters. Estes investigadores concluíram que o ácido clorogénico possuía, na realidade, um efeito inibitório sobre a carcinogenicidade a nível do fígado e cólon.

Aeschbacher e Jaccaud, 1990, constataram que o ácido clorogénico (150 mg/peso corporal) possuía efeito inibitório sobre as lesões de DNA induzidas pela nitrosourea nos ratinhos.

Conney *et al.*, 1991, verificaram que, embora o ácido clorogénico fosse um inibidor fraco da lipoxigenase epidérmica e da inflamação do ouvido induzida pelo 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), este mostrou ser mais activo do que os ácidos cafeico e ferúlico. Os efeitos inibitórios do ácido clorogénico sobre a promoção de tumores induzidos pelo TPA na pele de ratinhos são semelhantes aos seus efeitos inibitórios sobre a inflamação epidérmica induzida pelo TPA e às actividades lipoxigenásica e cicloxigenásica epidérmicas.

Por sua vez, Huang *et al.*, 1991, constataram que o ácido clorogénico (50 a 200 μ M) não afectavam a actividade «in vitro» da proteína quinase C dos cérebros de ratinhos.

Gutnisky *et al.*, 1992, verificaram que o ácido clorogénico possuía um intenso efeito inibitório sobre a absorção intestinal do ferro em ratos para dosagens de 0,58 a 1,7 mM de ácido clorogénico por rato.

Por outro lado, o ácido clorogénico mostrou possuir um efeito hepático protector sobre a toxicidade induzida pelo bromobenzeno. O ácido clorogénico não foi capaz de influenciar a hepatotoxicidade «in vivo» (Payá *et al.*, 1993).

Abraham e colaboradores, 1993, constataram que a administração oral de ácido clorogénico (50, 100 e 200 mg/kg de peso corporal) no ratinho podia diminuir significativamente a frequência de eritrócitos micronucleados policromáticos induzidos pela exposição do corpo à radiação gama. Este efeito foi observado em células da medula óssea após 24, 30 e 48 horas de exposição à radiação.

Stavric e Klassen, 1994, verificaram que a excreção de benzoílalpireno na biliar foi reduzida pelo ácido clorogénico em ratos.

O ácido clorogénico mostrou ser capaz de inibir a N-nitrosação da amina aromática 2,3-diamino-naftaleno mediante captação do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil. Assim, o ácido clorogénico poderá ser um factor protector não só contra o stress oxidativo, como também um potente inibidor das reacções mutagénicas e carcinogénicas «in vivo» (Kono *et al.*, 1995).

Facino *et al.*, 1995, constataram que o ácido clorogénico possuía um efeito protector

contra a degradação do colagénio tipo II induzida pelos radicais livres.

Laranjinha *et al.*, 1995, constataram que os ácidos fenólicos, tais como os ácidos clorogénico e cafeico, reduzem a ferritina e a metamioglobina.

Yamada e Tometa, 1996, estudaram os efeitos mutagénicos dos ácidos cafeico e clorogénico no sistema da *Salmonella typhimurium*. Estes compostos mostraram possuir efeitos inibitórios sobre a mutagenicidade do Trp-P-1 e Glu-P-2.

Tsuchiya *et al.*, 1996, verificaram que o ácido clorogénico tinha um efeito protector sobre o stress oxidativo induzido pelo paraquato em ratos.

O ácido clorogénico mostrou possuir um efeito inibitório significativo sobre a úlcera gástrica em ratos (Fujikawa, 1996).

Arion *et al.*, 1997, estudaram as interacções entre o ácido clorogénico e o 2-hidroxi-5-nitrobenzaldeído. Estes dois compostos mostraram ser inibidores competitivos do sistema hepático da glucose-6-fosfatase no rato. O ácido clorogénico liga-se ao transportador da glucose-6-fosfato T1. A ligação do ácido clorogénico no T1 é reversível.

Yamanaka *et al.*, 1997, debruçaram-se sobre os efeitos dos ácidos cafeico e clorogénico na oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) humanas induzida pelo Cu^{2+} durante as fases de iniciação e de propagação. Os ácidos cafeico e clorogénico ($\geq 0,1 \mu\text{M}$) favoreceram a fase de propagação da oxidação das LDL. $0,5 \mu\text{M}$ dos ácidos cafeico e clorogénico inibiram a fase de iniciação da oxidação das LDL.

3.3. Metodologias de doseamento

Vários métodos têm sido propostos para a determinação do ácido clorogénico nos alimentos. Na Tabela 2 estão resumidas algumas das metodologias utilizadas nos últimos anos.

Tabela 2 - Métodos propostos para o doseamento do ácido clorogénico

Composto	Método	Referência	Aplicação
Ác. clorogénico, ferúlico, gentísico e cafeico	<i>RP-HPLC</i>	Reynaldo <i>et al.</i> , 1983	sumo de citrinos
	- LC 3 Partisil - etanol isocrático - detecção UV 235 nm		
Ác. clorogénico, escopolina, escopoletina, esculósido, esculetina, umbeliferona, isofraxidina e feruilputrescina	<i>RP-HPLC</i>	Malmberg e Theander, 1984	batatas
	- pré.-col. μ Bondapak C ₁₈ Corasil - μ Bondapak C ₁₈ - gradiente MeOH / sol. MeOH HCl 1% - detecção UV ác. clorogénico e feruilputrescina - detecção fluorimétrica 400-700 nm		
Ác. clorogénico e proteínas	<i>GFC</i>	Lasztity <i>et al.</i> , 1984	sementes de óleo de girassol
	- Sephadex G-100 - tampão fosfato - detecção UV 280 nm proteínas - detecção UV 313 nm ác. clorogénico		
Ác. clorogénico, cafeico e quínico	<i>RP-HPLC</i>	Malmberg e Theander, 1985	batatas
	- μ Bondapak C ₁₈ ; 10 μ m - gradiente MeOH / KH ₂ PO ₄ 0,05 M - detecção UV 313 nm		
Ác. clorogénico e cafeico	<i>RP-HPLC</i>	Vioque e Millan, 1985	óleo de girassol
	- Bio-Rad ODS-5S; 2 μ m - MeOH aq. 35% + ác. acético 1-3% isocrático - detecção UV 313 nm		
Ác. clorogénico	<i>Espectrofotometria derivativa</i>	Humphrey e Macrae, 1987	café e chicória
	- detecção UV 325 nm		
Ác. clorogénico, quercetina e morina	<i>Espectrofotométrico</i>	Sastry <i>et al.</i> , 1988	chá
	- detecção UV/VIS 430, 310 e 600 nm		

Tabela 2 (continuação)

Composto	Método	Referência	Aplicação
Ác. clorogénicos	<i>Colorimétrico</i>	Vaintraub e Laptera, 1988	grãos de soja
	- reacção de Wade - detecção visível 500 nm		
Ác. clorogénicos e cafeína	<i>GFC</i>	Trugo <i>et al.</i> , 1991	café
	- pré.-col. LBK - TSK-G 3000 SW - água + 0,05% de azida de sódio - detecção UV 280 nm		
Ác. clorogénicos	<i>Colorimétrico</i>	Griffiths <i>et al.</i> , 1992	pó de batata liofilizado
	- ureia aq. acidificada + NaNO ₂ + NaOH - detecção visível 510 nm		
Ác. clorogénico	<i>RP-HPLC</i>	Paton, 1992	cana do açúcar
	- pré-col. Nova-Pak Guard Pak - Nova-Pak C ₁₈ - gradiente MeOH / água / ác. acético - detecção UV 280 nm		
Ác. clorogénico	<i>Espectrofotométrico</i>	Dao e Fiedman, 1992	batatas
	- detecção UV 325-328 nm		
Ác. clorogénico e cafeína	<i>FTIR</i>	Fabian <i>et al.</i> , 1994	cafés
	- KBr - medição espectrofotométrica 1900-1500 cm ⁻¹		
Ác. clorogénico, gálgico, protocatéquico e cafeico	<i>RP-HPLC</i>	Rodriguez-de-Sotillo <i>et al.</i> , 1994	pele de batata
	- Bondapak C ₁₈ - água / MeOH /ác. acético (64:35:1) isocrático - detecção UV 313 nm		
Ác. clorogénico	<i>Enzimático por FIA</i>	Cliffe <i>et al.</i> , 1994	sumos de fruta naturais
	- lacase fúngica - detecção electroquímica c/ eléctrodo de carbono de vidro e eléctrodo de ref. Ag /AgCl		
Ác. clorogénico, gálgico, protocatéquico e catequina	<i>RP-HPLC</i>	Shi e Schwedt, 1995	vinho
	- Nucleosil 120-5 C ₁₈ - MeOH /água (3:17) ajustado a pH 2,5 c/ HClO ₄ isocrático - detecção UV 280 nm		
Ác. clorogénicos, cafeína e trigonelina	<i>GFC</i>	De-Maria <i>et al.</i> , 1995	café verde
	- TSK-3000 SW - água - detecção UV 272 nm		

Tabela 2 (continuação)

Composto	Método	Referência	Aplicação
ác. clorogénico, cafeico, ferúlico e gálgico	<i>RP-HPLC</i>	Shahrzad e Bitsch, 1996	sumos
	- LiChrospher 100 RP-18; 5 μ m - água / acetato de etilo / ác. acético (95,6:4,1:0,3) isocrático - detecção UV 280 e 320 nm		

Tal como se verifica a partir da Tab. 2, várias técnicas têm sido utilizadas para dosear o ácido clorogénico nos produtos alimentares, nomeadamente colorimétricas, espectrofotométricas, cromatográficas (GFC e RP-HPLC) e enzimáticas associadas ao FIA. Porém, a técnica a que se recorre preferencialmente para dosear este composto nos alimentos é ao HPLC de fase reversa pelas razões já referidas neste texto.

4. Cafeína

4.1. Propriedades físicas e químicas

A cafeína, também designada por 1,3,7-trimetilxantina, 1,3,7-trimetil-2,6-dioxopurina ou metilteobromina é uma ureída bicíclica com uma massa molecular de 194,19. A este composto corresponde a estrutura representada na Fig. 7.

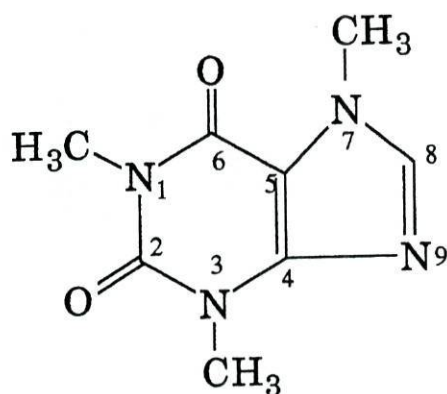


Fig. 7 - Estrutura química da cafeína

A cafeína à temperatura ambiente apresenta-se sob a forma de um pó branco. Por sublimação (a 178 °C) forma-se prismas hexagonais. O seu ponto de fusão é 238 °C. A densidade deste composto é 1,23.

Um grama de cafeína dissolve-se em 46 ml de água; 5,5 ml de água a 80 °C; 1,5 ml de água fervente; 66 ml de álcool; 22 ml de álcool a 80 °C; 5,5 ml de clorofórmio; 530 ml de éter; 100 ml de benzeno e 22 ml de benzeno em ebulição. Este composto é muito solúvel em pirrol e tetrahydrofurano contendo cerca de 4% de água. É também solúvel em acetato de etilo, sendo ligeiramente solúvel em éter de petróleo. A solubilidade em água aumenta em presença de citratos ou salicilatos (The Merck Index).

A cafeína absorve na região do Ultravioleta, apresentando o seu espectro em metanol um máximo situado a 272,5 nm (Fig. 8).

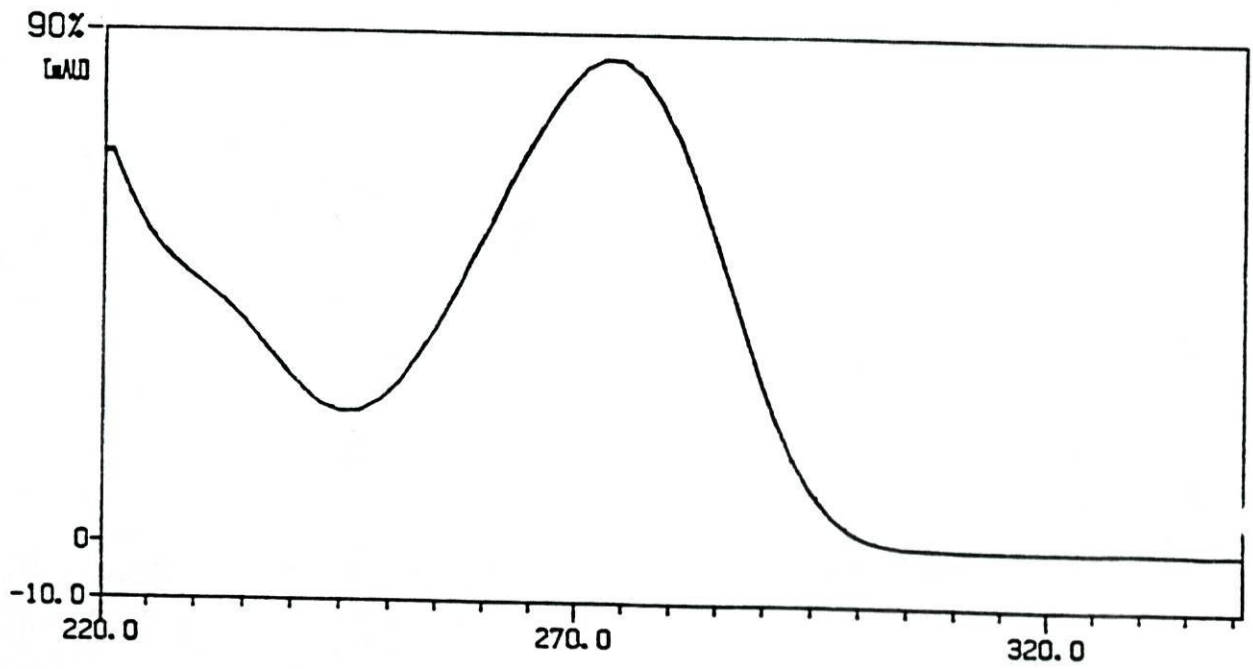


Fig. 8 - Espectro de absorção da cafeína no UV (Martelli e Belliardo, 1987)

4.2. Actividade biológica

O efeito teratogénico da cafeína tem sido claramente demonstrado em roedores. No entanto, a sensibilidade das diferentes espécies é variável. Tem-se verificado malformações em ratinhos para doses de cafeína de 50-75 mg/kg de peso corporal, enquanto que nos ratos a dose mais baixa para induzir malformações é de 80 mg/kg de peso corporal. Porém, quando a cafeína é administrada em doses fraccionadas ao longo do dia, são necessárias 330 mg/kg/dia para se verificarem efeitos teratogénicos.

As malformações mais frequentemente observadas nos roedores são as dos membros e dos dedos, craniofaciais e atrasos na ossificação dos membros, maxilares e esterno. No entanto, mesmo nos roedores a cafeína pode ser considerada um agente teratogénico fraco, uma vez que só em grandes quantidades é que este composto é capaz de induzir malformações.

Nos seres humanos a cafeína não apresenta qualquer efeito teratogénico. Contudo, a cafeína potencia o efeito teratogénico de outras substâncias, tais como o tabaco e o álcool, actuando sinergicamente com a ergotamina e o propranolol para induzir vasoconstrição materno-fetal provocada por isquémia. Por conseguinte, embora a cafeína não pareça ser prejudicial para o feto humano quando a sua ingestão é moderada e repartida ao longo do dia, algumas associações, especialmente com o álcool, tabaco e medicamentos vasoconstritores devem ser evitadas.

O consumo materno de cafeína afecta a composição cerebral, particularmente nos casos em que há uma dieta pobre em proteínas, parecendo também interferir com a fixação do zinco no cérebro. A exposição materna à cafeína induz também efeitos a longo termo sobre o sono, locomoção, capacidades de aprendizagem, emotividade e ansiedade no rato recém-nascido.

Nos seres humanos são necessários mais estudos para determinar os efeitos comportamentais a longo termo da ingestão da cafeína por mulheres grávidas (Nehlig e Debry, 1994).

Sadzuka *et al.*, 1995, examinaram os efeitos da combinação da adriamicina (ADR) e cafeína sobre o DNA, biossíntese proteica e sobre a actividade das DNA polimerases α e β em tecidos normais e com tumores.

Os autores concluíram que o efeito da cafeína sobre a concentração de ADR nas células desempenha um papel importante no mecanismo através do qual a cafeína favorece a actividade antitumoral da ADR.

Por outro lado, a cafeína injectada nas doses de 20, 40 e 80 mg/kg aumentou os níveis cerebrais de triptofano, 5-hidroxitriptamina (5-HT) e ácido 5-hidroindol acético (5-HIAA) no cérebro de rato. Tendo em atenção um possível papel da 5-HT na depressão induzida pela cafeína, Haleem *et al.*, 1995, estudaram os efeitos da administração repetida de doses elevadas de cafeína sobre o metabolismo cerebral da 5-HT em ratos.

Os autores concluíram que a administração repetida da cafeína provoca alterações adaptativas nos neurónios serotoninérgicos decrescendo a conversão de triptofano em 5-HT e poderá precipitar a depressão, principalmente em condições de remoção da cafeína.

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) tem sido investigada devido à sua potencial actividade antioxidante contra o dano oxidativo nos microssomas hepáticos de rato. Tal dano foi induzido por três espécies reactivas de oxigénio de importância fulcral na lesão da membrana «in vivo», nomeadamente o radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), o radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) e o oxigénio singleto ($^1\text{O}_2$).

Os resultados obtidos mostraram que a cafeína era um inibidor efectivo da peroxidação lipídica, para concentrações milimolares, contra as três espécies reactivas. A extensão da inibição foi elevada contra a peroxidação induzida pelo $\cdot\text{OH}$, média na peroxidação induzida pelo $^1\text{O}_2$ e baixa na peroxidação induzida pelo $\text{ROO}\cdot$. Em geral, a capacidade antioxidante da cafeína foi semelhante ao do antioxidante biológico glutatona e significativamente superior à do ácido ascórbico (Devasagayam *et al.*, 1996).

4.3. Metodologias de doseamento

Várias metodologias têm sido empregues para dosear a cafeína em produtos alimentares, estando na Tabela 3 resumidas algumas dessas metodologias.

Tabela 3 - Metodologias propostas para o doseamento da cafeína

Composto	Método	Referência	Aplicação
Cafeína e 5-HMF	HPLC	Smith, 1981	café e extractos de chicória
	- Hypersil ODS - isopropanol 5% / diclorometano isocrático - detecção UV 280 nm		
Cafeína, Trigonelina e Teobromina	RP-HPLC	Trugo <i>et al.</i> , 1983	café instantâneo, cacau, chocolate, chá e colas
	- Spherisorb ODS 2; 5 µm - gradiente MeOH / tampão citrato de potássio (pH=6) - detecção UV 272 nm		
Cafeína e Teobromina	RP-HPLC	Blauch <i>et al.</i> , 1983	café, chá e cacau
	- µBondapak C ₁₈ - acetonitrilo / água (8:92) isocrático - detecção UV 245 nm		
Cafeína, Teofilina e Teobromina	RP-HPLC	Terada e Sakabe, 1984	café, chá e chocolate
	- Lichrosorb RP-8 (45 °C); 5 µm - MeOH / água / tampão fosfato 0,2 M c/ pH = 5 (9:36:5) isocrático - detecção UV 275 nm		
Cafeína	RP-HPLC	Fukuhara <i>et al.</i> , 1985	café e chocolate
	- FLC-ODS - água / acetonitrilo (15:1) isocrático - detecção UV 280 nm		
Cafeína	Espectrofotométrico	Paseiro e Simal, 1985	café moído
	- detecção UV 250-290 nm		
Cafeína	RP-HPLC	Marx <i>et al.</i> , 1985	sementes de guaraná
	- pré-col. RSil C ₁₈ HL - Spherisorb ODS; 5 µm - gradiente NaH ₂ PO ₄ 0,02 M em MeOH ajustado a pH = 7 c/ NaOH -detecção UV 280 nm		
Cafeína, Teofilina e Teobromina	RP-HPLC	Vergnes e Alary, 1986	café, chá, mate e colas
	- Spherisorb 800; 5 µm - 90% CH ₂ Cl ₂ metanólico / acetato de sódio 0,01 M - acetonitrilo(9:1) isocrático - detecção UV 273 nm		

Tabela 3 (continuação)

Composto	Método	Referência	Aplicação
Cafeína	<i>Colorimétrico</i>	Agrawal e Sharma, 1986	café e chá
	- derivatização a murexida - detecção visível 520 nm		
Cafeína	<i>GC</i>	Chen, 1987	café, chá e colas
	- Gas-Chrom Q - gás de arrastamento: azoto - detector de azoto / fósforo		
Cafeína	<i>Espectrofotometria derivativa</i>	Abdel e Moety, 1988	café e infusões de chá
	- detecção UV 287 nm		
Cafeína	<i>SFC</i>	Upnmoor e Brunner, 1989	café
	- Lichrosorb Si 60 (40 °C) - 15% MeOH em CO ₂ - detecção UV 272 nm		
Cafeína	<i>Colorimétrico</i>	Kuznetsov e Semenova, 1989	café
	- CHCl ₃ + HCl 3M + 15% H ₂ O ₂ - detecção visível 537 nm		
Cafeína	<i>GC</i>	Abdel e Moety, 1989	café, infusões de chá e colas
	- Diatomite C-AW DMCS - gás de arrastamento: azoto - detector FID		
	<i>Espectrofotometria derivativa</i>		
	- detecção UV 287 nm		
Cafeína, Sacarina, Tartrazina e Ác. benzóico, sórbito e carmínico	<i>RP-HPLC</i>	Ren <i>et al.</i> , 1990	bebidas
	- Altex Ultrasphere - gradiente acetato de amónio / MeOH - detecção UV 274 nm		
Cafeína	<i>RP-HPLC</i>	Muhtadi <i>et al.</i> , 1990	bebidas e chocolates de café
	- µBondapak C ₁₈ ; 10 µm - gradiente acetonitrilo aq. c/ 2% de ác. acético - detecção UV 274 nm		
	<i>GC</i>		
	- Chromosorb WHP - gás de arrastamento: azoto - detector FID		

Tabela 3 (continuação)

Composto	Método	Referência	Aplicação
Cafeína	<i>TLC</i>	Li, 1990	café e pó de café
	- placa de sílica gel GF 254 - CHCl ₃ / acetona (9:1) - detecção UV 275 e 350 nm		
Cafeína	<i>Espectrofotometria derivativa</i>	Cepeda <i>et al.</i> , 1991	café
	- detecção UV 272,5 nm		
Cafeína e ác. clorogénicos	<i>GFC</i>	Trugo <i>et al.</i> , 1991	café
	- pré-col. LBK - TSK-G - água c/ 0,05% NaN ₃ - detecção UV 280 nm		
Cafeína	<i>GC</i>	Hills <i>et al.</i> , 1991	chá
	- DB 225 - gás de arrastamento: hélio - detector FID		
Cafeína	<i>RP-HPLC</i>	Tsé, 1991	café torrado, chá e colas
	- μ Bondapak C ₁₈ - 90% acetonitrilo aq. / [MeOH + ác. acético + água (15:1:4)] (3:2) - detecção UV 254 nm		
	<i>TLC</i>		
	- placa de celulose - butanol + ác. acético + água (4:1:5) / etanol + ác. acético + água		
Cafeína	<i>Espectrofotometria derivativa</i>	Lau <i>et al.</i> , 1992	café e chá
	- detecção UV 298,6 nm		
Cafeína, Teobromina e Teofilina	<i>IEC</i>	Genaro <i>et al.</i> , 1992	café, chá e colas
	- LiChrospher 100 RP-18; 5 μ m - acetilamina aq. 5 mM ajustada a pH 6-6,8 c/ H ₃ PO ₄ isocrático - detecção UV 274 nm		

Tabela 3 (continuação)

Composto	Método	Referência	Aplicação
Cafeína, Teofilina e Teobromina	<i>Espectrofotometria derivativa</i>	Albuirjeie <i>et al.</i> , 1992	café, chá e creme de chocolate
	- detecção UV 246 nm teobromina - detecção UV 278 nm teofilina - detecção UV 275 nm cafeína		
	<i>RP-HPLC</i>		
	- Lichrocat C ₈ - acetato de sódio 0,01 M / acetonitrilo (17:3) ajustado a pH = 4 c/ ác. acético glacial isocrático - detecção UV 272 nm		
Bases púricas, Galhatos de epigalocatequina e epicatequina, Epigalocatequina e Catequina	<i>RP-HPLC</i>	Terada <i>et al.</i> , 1992	alimentos
	- Inertsil ODS-2 (40 °C) - MeOH / água / tampão fosfato 0,2 M, pH = 3 (12:33:5) isocrático - detecção UV 207 nm		
Cafeína, Aspartame e Ác. benzóico	<i>CZE</i>	Jimidar <i>et al.</i> , 1993	colas dietéticas e adoçantes
	- coluna capilar de sílica fundida - tampão fosfato de sódio (pH = 11) - 15 kV - detecção UV 215 nm		
Cafeína	<i>CE</i>	Hurst <i>et al.</i> , 1993	café, chá, colas e cacau
	- coluna capilar de sílica fundida - 22 kV - tampão tetraborato de sódio (pH = 9,6) - detecção UV 280 nm		
Cafeína	<i>MECC</i>	Burton <i>et al.</i> , 1994	café instantâneo e grãos de café
	- coluna capilar de sílica fundida - 20 kV - NaH ₂ PO ₄ 0,5 mM / Na ₃ PO ₄ 0,5 mM c/ ou s/ SDS - detecção UV 214 nm		
Cafeína e Ác. clorogénico	<i>Espectroscopia de FTIR</i>	Fabian <i>et al.</i> , 1994	café
	- KBr - detecção IV 1900-1500 cmmin ⁻¹		
Cafeína	<i>SFE</i>	Heglund <i>et al.</i> , 1994	café
	- detecção IV		

Tabela 3 (continuação)

Composto	Método	Referência	Aplicação
Cafeína e Piperina	SFE	Braumann <i>et al.</i> , 1995	café torrado e pimenta moída
	- CO ₂ puro - detecção RMN		
Cafeína, Trigonelina e Ác. clorogénico	HPGFC	De-Maria <i>et al.</i> , 1995	café verde
	- TSK; G-3000 - água - detecção UV 272 nm		
Cafeína, Aspartame, Sacarina, Acessulfame- k, Dulcina e Ác. sórbico e benzóico	MECC	Thomson <i>et al.</i> , 1995	bebidas não alcoólicas, marmelada, molho de tomate, geleia e adoçantes
	- coluna capilar de sílica fundida (27 °C) - 20 kV - deoxicolato de sódio 0,05 M / borato 0,01 M / tampão fosfato 0,01 M (pH = 8,6) - detecção UV 275 nm		
Cafeína, Teobromina e Teofilina	RP-HPLC	Moriyasu <i>et al.</i> , 1996	alimentos
	- Cosmosil 5C ₁₈ -AR - acetonitrilo / tampão fosfato 0,01 M, pH = 3,5 (1:9) isocrático - detecção UV 275 nm		
Cafeína	RP-HPLC	Shi <i>et al.</i> , 1996	café, chá e bebidas não alcoólicas
	- Spherisorb C ₁₈ (35 °C) - MeOH / K ₂ PO ₄ 10 mM em Na ₂ PO ₄ , pH = 8,2 (1:9) isocrático - detecção UV 260 nm		
1-Metilxantina, 3-Metilxantina, 7-Metilxantina, Teofilina, Teobromina, Paraxantina e Cafeína	RP-HPLC	Terada <i>et al.</i> , 1996	alimentos
	- Capcell Pak C ₁₈ -SG 120 (37 °C); 5 µm - MeOH / água / tampão fosfato 0,2 M c/ pH = 4,0 (12:83:5) isocrático - detecção UV 275 nm		
Cafeína, Teofilina, Teobromina e Adenina	RP-HPLC	Meyer <i>et al.</i> , 1996	bebidas
	- Spherisorb C18 - MeOH / tampão fosfato c/ pH = 3,5 (9:1) isocrático - detecção amperométrica c/ eléctrodo de carbono e eléctrodo de ref. Ag/AgCl		
Cafeína, Teofilina, Teobromina e Ác. ascórbico	RP-HPLC	Yang <i>et al.</i> , 1996	chá
	- Hypersil ODS (40 °C) - MeOH aq. a 10% isocrático - detecção UV 320 nm		

Tabela 3 (continuação)

Composto	Método	Referência	Aplicação
Cafeína, Catequinas, Teanina e Ác. ascórbico	<i>CZE</i>	Horie <i>et al.</i> , 1997	chá verde
	- coluna de sílica fundida - tampão borato 20 mM - 30kV - detecção UV 200 nm		
Cafeína e seus metabolitos	<i>MEEC</i>	Zhao e Lunte, 1997	café e chá
	- coluna de sílica fundida - tampão fosfato 20 mM (pH = 11) + SDS 40 mM - detecção UV 274 nm		

Várias técnicas têm sido empregues para dosear a cafeína nos alimentos, nomeadamente colorimétricas, espectrofotométricas, cromatográficas (RP-HPLC, GC, TLC, GFC, IEC, CZE, CE e MEEC) e extractivas em fluido supercrítico (Tab. 3). Destas as mais correntemente empregues são as cromatográficas, mais precisamente HPLC de fase reversa, atendendo à simplicidade, rapidez e economia da técnica em questão.

5. Café

5.1. Café verde

5.1.1. Breve introdução histórica

O emprego do café (do turco "kahveh" e do árabe "gahwah") como estimulante teve a sua origem na Abissínia (Etiópia) por volta do ano 900. As tribos montanhosas nómadas recolham os grãos de café de arbustos selvagens, moiam-nos e misturavam-nos com gordura animal para formar bolas, funcionando como parte da dieta durante as migrações. Outras tribos comiam os grãos moídos na forma de papa ou bebiam um vinho fermentado obtido a partir do fruto do café.

O café foi levado do Norte de África para a Arábia por mercadores e foi cultivado em plantações. No final do século XIII, os Árabes torravam e moíam o café antes de o beberem. Sendo somente preparado pelos homens, as mulheres árabes recorriam a esta bebida para aliviar o desconforto durante o período menstrual.

O café foi introduzido na Europa como bebida no início do século XVII, tendo pela primeira vez sido comercializado em 1615. Embora inicialmente a Igreja Católica tenha acusado o café de constituir uma ameaça satânica para a alma, esta bebida difundiu-se rapidamente após ter sido abençoada pelo Papa Clemente VIII. Em 1645 abriu a primeira cafetaria italiana e um século depois havia uma cobertura total do país. O café teve um percurso semelhante na França, Holanda, Inglaterra e Áustria.

Em 1725 foi cultivada a primeira planta do café nas Índias Orientais. O cultivo do café expandiu-se rapidamente pelas Caraíbas e América Latina, tendo finalmente atingido o Brasil e a América do Sul (Parliment e Stahl, 1995).

5.1.2. Origem botânica

A planta do café é um arbusto relativamente pequeno originário de África, pertencendo ao género *Coffea* e à família Rubiaceae. A maioria das 80 espécies conhecidas são selvagens, tendo-se adaptado a altitudes específicas, tipos de solo e pluviosidade. As duas variedades que têm interesse comercial são a *Coffea arabica* Linn (frequentemente conhecida como Arábica) e *Coffea canephora* Pierre ex Frohner variedade *robusta* (designada Robusta).

A planta do café possui flores brancas, as quais sofrem auto-polinização na variedade Arábica e polinização cruzada na variedade Robusta. Após seis meses surgem os frutos semelhantes a cerejas. As cerejas das diferentes variedades podem ser diferenciadas pela cor, a qual varia do vermelho até ao amarelo ou púrpura. Os frutos de uma árvore não amadurecem todos ao mesmo tempo. Em algumas regiões, tais como a Colômbia, colhem-se apenas os frutos maduros; noutras regiões, tais como o Brasil, todos os frutos são colhidos ao mesmo tempo, o que resulta numa colheita de frutos predominantemente maduros com alguns verdes e outros muito maduros. Um fruto típico contém duas sementes verde claras ou amarelas denominadas grãos de café.

O café Arábica parece ser originário do Norte de África (Etiópia) e cresce a maiores altitudes. O café Robusta parece ser proveniente das florestas chuvosas da África Central. As suas plantas são mais robustas e crescem a menores altitudes, toleram temperaturas mais elevadas e maiores pluviosidades, sendo mais resistentes a doenças e pestes. O café Robusta cresce principalmente no Uganda, Costa do Marfim, Indonésia e algumas regiões do Brasil.

As duas variedades diferem na sua composição química. A Arábica contém teor mais elevado de lípidos, trigonelina e sacarose enquanto que a Robusta contém maiores teores de ácidos clorogénicos e cafeína. Porque a variedade Arábica tem um sabor e aroma mais agradável, ela é mais consumida (constituindo cerca de 80% do comércio mundial) e possui um preço mais elevado do que a variedade Robusta (Parliment e Stahl, 1995).

5.1.3. Aspectos gerais sobre a composição química do café verde

Um aspecto de importância fulcral quando se fala na composição química do café verde é a grande variabilidade, existente a nível quantitativo e qualitativo, dos seus constituintes, devido a factores como: espécie, variedade, práticas agrícolas, grau de maturação ou condições de armazenamento, que dificultam o estabelecimento de valores médios de composição para um dado café. Este facto é ainda mais significativo para o café torrado e para a bebida de café, cuja composição é extremamente alterada, quando comparada com a original. A existência de vários métodos analíticos, originando diferentes resultados para um dado componente, é causa adicional das diferenças e dispersões encontradas nos dados de composição dos cafés (Clarke, 1987).

Assim, e numa análise sumária dos valores compilados, a constituição do grão verde de café nos principais grupos de compostos mostra que, cerca de 50% do resíduo seco é representado por glúcidos, essencialmente polissacáridos. As proteínas representam 10-12% e os lípidos 10 a 18%. A fracção insaponificável dos lípidos brutos pode atingir valores superiores a 10%, sendo constituída por esteróis, hidrocarbonetos e tocoferóis. Existem ainda álcoois diterpénicos (cafestol, kahweol e derivados kaurânicos), predominantemente esterificados com ácidos gordos. Uma fracção importante, que pode atingir os 10% do resíduo seco nos grãos verdes, é constituída pelos ácidos clorogénicos. O conteúdo em cafeína pode variar de 0,6 a 2%, atingindo em algumas espécies 3% do resíduo seco.

Na Tabela 4 estão compilados alguns valores médios dos constituintes mais abundantes típicos descritos na literatura (Parliment e Stahl, 1995) para os cafés Arábica e Robusta.

Componente	Arábica	Robusta
Alcalóides (cafeína)	1,20	2,20
Trigonelina	1,00	0,70
Cinzas	4,20	4,40
Ácidos clorogénicos totais	6,50	10,00
quínicos	0,40	0,40
alifáticos	1,00	1,00
Sacarose	8,00	4,00
Açúcares redutores	0,10	0,40
Polissacáridos	46,00	50,00
Lenhina	3,00	3,00
Proteínas	11,00	11,00
Aminoácidos livres	0,50	0,80
Lípidos	16,00	10,00

Tabela 4 - Composição química do café verde (conteúdos médios típicos-resíduo seco %, adaptado de Parliment e Stahl, 1995)

5.2. Café torrado

5.2.1. Efeito da torrefacção sobre os constituintes do café

A torrefacção é o processo tecnológico com intervenção do calor a temperaturas e tempos variáveis conforme a unidade torrefactora que a pratica. Esta operação é essencial em todo o processamento, uma vez que confere ao café verde as características aromáticas, sápidas e a desejável friabilidade do café torrado, indispensáveis para a obtenção da bebida de café.

De um modo geral, são referidos dois tipos de torrefacção, a «rápida» (tempo de torrefacção de poucos minutos) e a «convencional» (tempo de torrefacção de 12 a 15 minutos), existindo, no entanto, um tipo intermédio com um tempo de 5-8 minutos. Uma outra classificação também usual é a que utiliza os termos de torrefacção «leve», «média» e «forte», tendo como parâmetro a cor obtida no final do processo, uma vez que a monitorização da torrefacção a nível comercial é, normalmente, efectuada através da mudança da cor verde para castanho, sofrida pelo grão. O aumento de volume é outra das alterações bem visíveis originadas durante a torrefacção do café.

A torrefacção do café provoca múltiplas e complexas alterações químicas e físicas, que dependem do tipo de torrefacção efectuado, principalmente da relação temperatura/tempo. Estas transformações, caracterizam-se numa primeira fase, fundamentalmente, pela perda de água e, numa segunda fase, por reacções de desidratação, fragmentação, recombinação e polimerização, algumas das quais estão associadas à reacção de Maillard, e que levam à formação de compostos de baixo peso molecular como o dióxido de carbono, água e ainda compostos responsáveis pelo aroma e pelo sabor (álcoois, fenóis, aldeídos, derivados furânicos e pirrólicos, hidrocarbonetos, tiofenóis, etc). Algumas das reacções levam à formação de compostos corados, denominados melanoidinas, responsáveis pelo escurecimento do grão de café. A grande parte dos lípidos e da cafeína sobrevive a este tratamento térmico, sendo as alterações mais marcadas na composição do grão de café que ocorrem durante a torrefacção as seguintes:

- decréscimo do teor de proteínas e aminoácidos
- perda de ácidos clorogénicos
- perda de sacarose
- diminuição da arabinose e dos açúcares redutores
- decréscimo de trigonelina
- perda de água
- formação de bases de Maillard a partir de açúcares, proteínas e aminoácidos
- formação de melanoidinas (Parliment e Stahl, 1995).

5.2.2. Composição química

5.2.2.1. Carbohidratos

Conforme já se referiu, durante a torra há perda de açúcares, quer por reacções de desidratação e ciclização, quer por combinação com compostos aminados. Enquanto que as primeiras reacções originam aldeídos furânicos, nomeadamente 5-HMF a partir das hexoses, as segundas originam compostos corados de elevado peso molecular (melanoidinas).

No café torrado foram já identificados e doseados os seguintes mono e dissacáridos: fucose, arabinose, galactose, glucose, sacarose, xilose, manose, frutose e ribose (Prodolliet *et al.*, 1995).

No que se refere aos polissacáridos do café, o arabinogalactano durante a torra é convertido em furfural. Apesar disso, o principal precursor do furfural no café torrado é a sacarose (De Maria *et al.*, 1994).

Em relação aos outros polissacáridos do café, nomeadamente manano e celulose, estes parecem ser mais estáveis à torra (Parliment e Stahl, 1995).

5.2.2.2. Compostos azotados

Os principais compostos azotados do café poderão ser divididos em 5 classes: alcalóides, trigonelina, ácido nicotínico, aminoácidos e proteínas (Macrae, 1989). Enquanto que os primeiros sobrevivem à torra, a trigonelina sofre degradação, originando para além do ácido nicotínico (principal produto da sua degradação), piridinas, pirróis e compostos bicíclicos (Parliment e Stahl, 1995).

No que se refere aos alcalóides, a cafeína é o principal componente deste grupo no café torrado, assim como no verde. Para além deste composto surgem também no café pequenas quantidades vestigiais de teobromina e teofilina.

Stadler e Fay (1995) verificaram a formação de 8-oxocafeína no café torrado mediante captação do radical hidroxilo pela cafeína.

Em relação às proteínas, a torra provoca a sua desnaturação e insolubilização. No que se refere aos aminoácidos, estes sofrem também perdas (Parliment e Stahl, 1995).

5.2.2.3. Ácidos clorogénicos

No café foram identificados os seguintes grupos de ácidos clorogénicos: CQA, diCQA, FQA, CoCQA e CFQA (Trugo e Macrae, 1989).

Durante a torra há diminuição dos teores destes compostos, uma vez que a sua porção aromática é convertida em vários compostos fenólicos. Assim, o ácido cafeico origina catecol,

4-etilcatecol, 4-vinilcatecol e 3,4-dihidroxialdeído cinâmico. Por sua vez, o ácido ferúlico origina vinilguiacol e guiacol enquanto que o ácido quínico produz fenol, catecol, hidroquinona e pirogalol (Parliment e Stahl, 1995).

5.2.2.4. Ácidos

Alguns ácidos alifáticos voláteis, tais como os ácidos acético e fórmico, são gerados durante a torra por pirólise dos carboidratos. Outros ácidos, tais como o cítrico e o málico, os quais existem no café verde, sofrem um decréscimo durante a torra.

O ácido quínico forma-se a partir da degradação do ácido clorogénico.

O ácido fosfórico é estável à torra (Parliment e Stahl, 1995).

5.2.2.5. Lípidos

A fracção lipídica sofre pouco durante a torra. No entanto, os terpenóides sofrem degradação durante a torra originando monoterpenóides, tais como o linalol e o mirceno (Dart e Nursten, 1989).

Durante a torra há igualmente conversão das formas *cis* dos ácidos gordos em *trans* (Oliveira *et al.*, 1995).

5.2.2.6. Compostos voláteis

Durante a torra há formação de compostos voláteis por pirólise dos açúcares, aminoácidos e trigonelina.

Dart e Nursten (1989) dividiram os compostos voláteis do café torrado nos seguintes grupos: compostos sulfurados (ex: furfuriltiol e furfurilmetil dissulfito), pirazinas (ex: alquilpirazinas), piridinas (ex: 2-metilpiridina e 3-etilpiridina), pirróis (ex: furfurilpirróis e alquilpirróis), oxazóis, furanos (ex: furano, 2-metilfurano e álcool furfurílico), aldeídos (ex: metanal e etanal), cetonas (ex: maltol e 2,3-butanodiona) e fenóis.

De Maria *et al.* (1996) identificaram outro grupo de compostos voláteis denominado furanonas (ex: 2-metil-tetrahydro-3-furanona e 2-metil-3-[2H]-furanona).

O furfurilmercaptano é um composto volátil importante no café torrado, sendo a sua formação proporcional ao grau da torra. Este composto forma-se principalmente por reacção do furfural com a cisteína (Parliment e Stahl, 1995).

5.2.3. Actividade biológica do café

O peróxido de hidrogénio (H_2O_2) tem sido considerado o principal responsável pela mutagenicidade e genotoxicidade «in vitro» do café.

Stadler *et al.*, 1994, mostraram que a formação de H_2O_2 no café torrado moído e no café instantâneo atingiu níveis de 400-450 μM após um período de incubação de 1h. A formação do peróxido de hidrogénio ocorreu através de um processo de auto-oxidação onde os polifenóis, na presença dos metais de transição, reduzem o oxigénio atmosférico. No entanto, o café também possui actividade antioxidante «in vitro», a qual é demonstrada pela sua capacidade de inibir a peroxidação lipídica nas reacções Fenton de hidroxilação.

Os efeitos pró e antioxidante reflectem-se também nas suas actividades mutagénica e antimutagénica no teste de Ames. O café mostrou ser directamente mutagénico nas estirpes TA 100 e TA 102 devido à formação de H_2O_2 . O café é também um antimutagénico. Esta bebida exerce um forte efeito protector contra a mutagenicidade induzida pelo oxidante t-butil-hidroperóxido (t-BOHH).

Por conseguinte, o café, assim como muitos outros antioxidantes, possui um efeito duplo «in vitro», o qual é fortemente dependente de parâmetros, tais como a dose, oxigénio atmosférico, metais de transição, etc.

Daglia *et al.* (1994) demonstraram que o café torrado possui actividade antibacteriana sobre o *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, dependendo esta actividade do grau de torra.

Ruiz-Lapuente *et al.*, 1994, estudaram a relação entre o consumo de café e os níveis totais de colesterol no soro numa população constituída por 609 mulheres com idades compreendidas entre os 18 e os 65 anos. O consumo de café parece estar positivamente associado com a colesterolémia nos indivíduos com idade inferior a 30 anos ($p < 0,01$) e no grupo com idades compreendidas entre os 30 e 45 anos ($p < 0,05$).

Os autores concluíram que o café aumentava a colesterolémia na população feminina, tornando-se recomendável a sua redução nos indivíduos hipercolesterolémicos.

Abraham, 1995, pretendeu investigar o efeito do café sobre as genotoxinas e/ou carcinogénios transplacentários. Para isso, administrou oralmente café a ratos albinos suíços, em período de gestação de 15-16 dias, 90 min antes da exposição à ciclofosfamida (CPH), N-nitrosodietilamina (DEN), N-nitro-N-etilureia (ENU) e mitomicina C (MMC). No final do

tratamento, avaliou-se a indução dos eritrócitos policromáticos micronucleados no fígado e sangue fetais, assim como na medula óssea materna.

Os resultados deste teste sugerem que a administração do café em vez de água (controle) pode inibir significativamente os efeitos genotóxicos da CPH, DEN, ENU e MMC no fígado e sangue fetais. O café mostrou também inibir significativamente a genotoxicidade da CPH, ENU e MMC nas células da medula óssea materna.

Nishi *et al.*, 1996, investigaram a relação dose-efeito entre o café e o risco de cancro do pâncreas. Para isso recorreram a 141 pacientes com cancro do pâncreas e 282 controlos (2 para cada caso) agrupados em função do sexo, idade e local de residência.

Os autores constataram que a relação dose-resposta entre o café (chávena/dia) e o risco relativo de doença formava uma curva em forma de U, situando-se o risco relativo mais baixo (0,18 para os homens e 0,53 para as mulheres) nos consumidores ocasionais de café. Por conseguinte, parece que pequenas doses de café poderão prevenir o cancro do pâncreas enquanto que maiores quantidades poderão provocar a doença.

Nygaard *et al.*, 1997, referem uma associação entre o consumo de café e a concentração total de homocisteína (tHcy) no plasma, a qual representa um factor de risco na doença cardiovascular. Os autores recorreram a uma população com 75891 homens e 8585 mulheres com idades compreendidas entre os 40 e 67 anos e sem história de hipertensão, diabetes, doença isquémica cardíaca ou doença cerebrovascular. Constataram que existia uma relação dose-resposta marcadamente positiva entre o consumo de café e a tHcy plasmática, a qual mostrou ser superior à relação entre o café e o colesterol sérico total.

Com o intuito de investigar o efeito do consumo do café sobre o ferro, zinco e cobre, Aldrian *et al.*, 1997, recorreram a 64 ratos fêmea Sprague-Dawle, os quais foram divididos em 2 grupos: gestantes e não gestantes. Por sua vez, cada um destes grupos foi subdividido em 2 grupos: um deles recebeu água enquanto que o outro recebeu café na forma de uma solução liofilizada (1,1% peso/volume), constituindo este a única fonte de líquidos durante o estudo de 18 dias. A todos os grupos foi fornecida uma dieta purificada marginal em ferro.

No dia 18 (de gestação), os animais receberam por sonda gástrica 0,033 MEq de ⁵⁹Fe, tendo sido sacrificados 4, 8, 12 ou 24 horas após a intubação.

O aporte de líquidos era significativamente menor nos grupos que receberam café. Porém, o café não pareceu afectar o consumo de alimentos, ganho de peso, hemoglobina ou hematócrito,

quer nos 2 grupos em estudo (gestantes e não gestantes).

Nos ratos não gestantes a percentagem de ^{59}Fe foi mais baixa no plasma e mais elevada no baço e eritrócitos no grupo que recebeu café.

Nas gestantes que receberam café a percentagem de ^{59}Fe foi mais elevada no estômago (apenas após 4 horas), sangue e osso do que nos controlos.

Não se verificaram efeitos significativos do café sobre as concentrações teciduais de ferro, zinco ou cobre no grupo não gestante. No entanto, os ratos que receberam café apresentaram concentrações mais elevadas de ferro no fígado, osso e placenta e concentrações mais baixas de zinco placentário do que os controlos.

Os autores concluíram que o consumo de café conduz a um aumento na eritropoiese, o qual constitui um indicador da deficiência de ferro, quer em ratos gestantes quer em não gestantes. O consumo de café é igualmente responsável por um transporte placentário de ferro diminuído.

5.2.4. Metodologias de análise

Várias metodologias têm sido empregues para analisar o café, estando na Tabela 5 resumidas algumas destas metodologias.

Tabela 5 - Metodologias propostas para a análise do café

Composto	Método	Referência	Aplicação
5-HMF e Cafeína	<i>HPLC</i>	Smith, 1981	extractos de café e chicória
	- Hypersil ODS - isopropanol 5% / diclorometano isocrático - detecção UV 280 nm		
Trigonelina, Cafeína e Teobromina	<i>RP-HPLC</i>	Trugo <i>et al.</i> , 1983	café instantâneo, chá e colas
	- Spherisorb ODS; 5 µm - gradiente MeOH / tampão citrato de tripotássio 0,015 M (pH = 6,0) - detecção UV 272 nm		
Colesterol, Campesterol, Sigmasterol, β-sitosterol, Fucosterol, Δ-5-avenosterol, Δ-7-stigmasterol e Δ-7-avenasterol	<i>GC</i>	Duplatre <i>et al.</i> , 1984	cafés em grão torrados
	- coluna capilar de sílica fundida revestida c/ OV 17 - gás de arrastamento: hidrogénio - detector FID		
3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3-FQA, 4-FQA, 5-FQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA e 4,5-diCQA	<i>RP-HPLC</i>	Trugo e Macrae, 1984	café instantâneo
	- Spherisorb ODS; 5 µm - gradiente MeOH / sol. de citrato de tripotássio 0,01 M - detecção UV 325 nm		
3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 5-FQA, 3,4-diCQA e 4,5-diCQA	<i>RP-HPLC</i>	Clifford, 1986	grãos de café verde
	- Spherisorb ODS; 5 µm - gradiente H ₂ CO ₂ / MeCN - detecção UV 313 nm		

Tabela 5 (continuação)

Composto	Método	Referência	Aplicação
3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3-FQA, 4-FQA, 4,5-diCQA, 3,5-diCQA, cafeoiltriptofano e ác. 3-O-cafeoil-4-O- feruloilquínico	<i>RP-HPLC</i>	Morishita <i>et al.</i> , 1986	grãos de café verde
	- Finepak SIL C ₁₈ ; 5 µm - gradiente H ₃ PO ₄ 10 mM / MeOH - detecção UV 325 nm		
Cafeína, Teobromina e Teofilina	<i>RP-HPLC</i>	Vergnes e Alary, 1986	café, chá, malte, extractos e bebidas não alcoólicas
	- Spherisorb 800; 5 µm - diclorometano / MeOH (90:10) isocrático - detecção UV 273 nm		
Formaldeído	<i>GC</i>	Hayashi <i>et al.</i> , 1986	café instantâneo
	- derivatização a tiazolidina - coluna capilar de sílica fundida revestida c/ Carbowax 20 M - detector de massa		
Ác. quínico, Sacarose e 5-CQA	<i>GC</i>	Hughes e Thorpe, 1987	café torrado
	- coluna capilar de sílica fundida revestida c/ CP-SIL5-CB - gás de arrastamento: hélio - detector FID		
CQA total, diCQA total, 5-FQA e Cafeína	<i>RP-HPLC</i>	Clifford <i>et al.</i> , 1989	frutos e sementes de café
	- Spherisorb ODS I; 3 µm - gradiente ác. fórmico / sol. aq. MeCN - detecção UV 313 nm CQA e FQA - detecção UV 276 nm cafeína		
Arabinose, Frutose, Manose, Glucose, Galactose e Xilose	<i>RP-HPLC</i>	Blanc <i>et al.</i> , 1989	cafés solúveis
	- pré-col. SS-Gu - Spheri-5 sílica; 5 µm - acetonitrilo / sol. de fosfato (80:20) isocrático - pós-col. derivatização c/ azul de tetrazólio - detecção visível 530 nm		
Maltose e Sacarose	<i>GC</i>		
	- coluna megabore de sílica fundida - gás de arrastamento: hélio - detector FID		

Tabela 5 (continuação)

Composto	Método	Referência	Aplicação
Sacarose, Glucose, Xilose, Galactose, Arabinose, Manose, Frutose, Inositol e Manitol	GC	Davis <i>et al.</i> , 1990	cafés solúveis
	- coluna megabore de sílica fundida - gás de arrastamento: hélio - detector de massa		
	IEC		
	- pré-col. Micro-Guard Cation-H - CHO-682 - 100% água isocrático - pós-col. derivatização c/ ABH - detecção UV 400 nm		
5-HMF	RP-HPLC	Dauberte <i>et al.</i> , 1990	cafés torrefacto e s/ açúcar e sumos de fruta
	- C ₁₈ Waters; 5 µm - MeOH / água (10:90) isocrático - detecção UV 280 nm		
Glucose, Frutose e Sacarose	RP-HPLC		
	- NH ₂ Merck; 10µm - acetonitrilo / água (85:15) isocrático - detecção índice de refração		
Cafeína, 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 5-FQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA e Ác. protocatéquico	RP-HPLC	Clifford e Martinez, 1991	grãos de café verde
	- Spherisorb ODS1; 3 µm - gradiente sol. aq. de ác. fórmico 0,5% / 0,5% de ác. fórmico em 50% de sol. aq. de acetonitrilo - detecção UV 276 nm cafeína e ác. protocatéquico - detecção UV 313 nm ác. clorogénicos		
Ác. clorogénicos e Cafeína	HPGFC	Trugo <i>et al.</i> , 1991	café
	- TSK 3000-SW - água + 0,05% de azida sódica - detecção UV 280 nm		
Cafeína, Teobromina e Teofilina	IEC	Gennaro e Abrigo, 1992	chá, cafés expresso e descafeinado e colas
	- LiChrospher 100 RP-18; 5 µm - octilamina ortofosfato (pH = 6,0-6,8) - detecção UV 274 nm		
Cafeína	Espectrofotometria derivativa	Lau <i>et al.</i> , 1992	bebidas não alcoólicas, café e chá
	- detecção UV 298,6 nm		

Tabela 5 (continuação)

Composto	Método	Referência	Aplicação
Glucose	<i>Amperométrico</i>	Matsukura <i>et al.</i> , 1993	café instantâneo
	- detecção amperométrica c/ eléctrodo de enzima		
Ác. oxálico, málico, cítrico, fumárico e vitamina C	<i>RP-HPLC</i>	Oderiz <i>et al.</i> , 1994	grãos de café verde
	- pré-col. Newguard RP-18 - Spherisorb ODS 2; 5 µm - água + ác. sulfúrico (pH = 2,2) isocrático - detecção UV 245 nm vitamina C e ác. oxálico - detecção UV 215 nm restantes ác. orgânicos		
Trigonelina, 5-HMF e Ác. nicotínico, clorogénico e cafeico	<i>RP-HPLC</i>	Daglia <i>et al.</i> , 1994	cafés verde e torrado
	- Lichrosorb 100 RP18; 5 µm - gradiente MeOH / HCl 1 mM, pH = 3,27 ± 0,02 - detecção UV 260 nm trigonelina e ác. nicotínico - detecção UV 272 nm 5-HMF e cafeína - detecção UV 320 nm ác. clorogénico e cafeico		
Sacarose, Manitol, Manose, Ramnose, Arabinose, Galactose, Glucose, Xilose, Frutose e Ribose	<i>IEC</i>	Prodollet <i>et al.</i> , 1995	cafés solúveis
	- pré-col. CarboPac PA ₁ - CarboPac PA ₁ ; 10 µm - NaOH 300 mM / água isocrático - detecção amperométrica por pulsos		
3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 5-FQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA, 3,4-CFQA, 4,5-CFQA, ác. <i>p</i> -coumaroil- quínico e cafeoiltriptofano	<i>RP-HPLC</i>	Murata <i>et al.</i> , 1995	grãos de café verde
	- ODS; 10 µm - gradiente CH ₃ CN / ác. acético / água - detecção «diode array»		
3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 4-FQA, 5-FQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA e 7-cafeoil tirosina	<i>RP-HPLC</i>	Correia <i>et al.</i> , 1995	cafés verde e torrado
	- Spherisorb ODS; 5 µm - gradiente MeOH / sol. de citrato de tripotássio 0,01 M - detecção UV 313 e 280 nm		
Cafestol, Kahweol, 16-O-metilcafestol e 5-α-colestanol	<i>GC</i>	Ugert <i>et al.</i> , 1995	café torrado e café bebida
	- coluna capilar de sílica fundida - gás de arrastamento: hidrogénio - detector FID		

Tabela 5 (continuação)

Composto	Método	Referência	Aplicação
Ác. clorogénicos, Trigonelina e Cafeína	<i>GFC</i>	De Maria <i>et al.</i> , 1995	café verde
	- TSK G-3000 - água - detecção UV 272 nm		
3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 4-FQA, 5-FQA, 3,4-diCQA, 4,5-diCQA, CFQA-1, CFQA-2 e CFQA-3	<i>RP-HPLC</i>	Bicchi <i>et al.</i> , 1995	cafés verde e torrado
	- Hypersil ODA; 5 µm - gradiente MeOH / sol. tampão citrato - HCl (pH = 3) - detecção «diode array»		
8-oxocafeína	<i>RP-HPLC</i>	Stadler e Fay, 1995	café
	- Supelcosil LC ₁₈ ; 5 µm (31 °C) - gradiente ác. cítrico 50 mM + NaOH (pH = 5,25) / MeOH - detecção electroquímica c/ eléctrodo de carbono e eléctrodo de ref. AgCl / KCl		
Manitol, Fucose, Arabinose, Galactose, Glucose, Sacarose, Xilose, Manose, Frutose e Ribose	<i>IEC</i>	Prodolliet <i>et al.</i> , 1995 a)	café solúvel
	- pré-col. CarboPac A ₁ - CarboPac A ₁ ; 10 µm - NaOH 300 mM / água isocrático - detecção amperométrica por pulsos		
Adenina, Cafeína, Teofilina e Teobromina	<i>RP-HPLC</i>	Meyer <i>et al.</i> , 1996	café, chá e cacau
	- Spherisorb C ₁₈ - MeOH / tampão fosfato c/ pH = 3,5 (9:1) isocrático - detecção amperométrica c/ eléctrodo de carbono e eléctrodo de ref. Ag / AgCl		
Manitol, Fucose, Arabinose, Galactose, Glucose, Sacarose, Xilose e Frutose	<i>IEC</i>	Bernal <i>et al.</i> , 1996	café instantâneo
	- pré-col. Carbo-Pac - Carbo Pac A ₁ - gradiente água / NaOH 0,2 M detecção amperométrica por pulsos		
2-etinil-3-etil-5-metilpirazina e 3-etinil-2-etil-5-metilpirazina	<i>HRGC-MS</i>	Czerny <i>et al.</i> , 1996	café torrado
	- SE-54 - gás de arrastamento: hélio - detector de massa		
Cafeína e seus metabolitos	<i>MEEC</i>	Zhao e Lunte, 1997	café e chá
	- coluna de sílica fundida - tampão fosfato 20 mM c/ pH = 11 + SDS 40 mM - detecção UV 274 nm		

Tabela 5 (continuação)

Composto	Método	Referência	Aplicação
Aspartame	<i>RP-HPLC</i>	Aboul-Enein e Bakr, 1997	bebidas não alcoólicas e café
	- Chirobiotic T; 5 µm - etanol / água (11:9), pH = 3,85 isocrático - detecção UV 215 nm		
Formaldeído	<i>CZE</i>	Csiba <i>et al.</i> , 1997	carne, ovos e café
	- coluna de sílica fundida - tampão fosfato 25 mM / tampão borato 25 mM (1:1), pH = 9 - 15 kV - detecção UV 214 nm		
Formaldeído	<i>RP-HPLC</i>	Csiba <i>et al.</i> , 1997	carne, ovos e café
	- derivatização a 1,2,4-triazolo [3,4a] ftalazina - LiChrosorb RP-18; 7 µm - KH ₂ PO ₄ 0,05 M / acetonitrilo (7:3) isocrático - detecção UV 237 nm		

Várias técnicas têm sido empregues para dosear os compostos químicos no café, nomeadamente espectrofotométricas, cromatográficas (IEC, GC, HRGC / MS, RP-HPLC e HPGFC) e amperométricas (Tabela 5). Mesmo assim, a técnica a que mais frequentemente se recorre para analisar o café é HPLC de fase reversa, atendendo à rapidez, simplicidade e economia características desta técnica. No entanto, para o doseamento dos açúcares recorre-se preferencialmente à cromatografia de troca iónica ou à cromatografia gasosa acoplada a um detector de massa. No caso das gorduras a técnica eleita é a cromatografia gasosa acoplada ao FID.

II - Parte Experimental

2.1. Optimização de uma metodologia para o doseamento simultâneo de aldeídos furânicos (5-HMF e furfural), ácido 5-O-cafeoilquínico e cafeína em café verde e torrado

2.2. Estudo da termodegradação do 5-HMF

2.1. Optimização de uma metodologia para o doseamento simultâneo de aldeídos furânicos (5-HMF e furfural), ácido 5-O-cafeoilquínico e cafeína em café verde e torrado

2.1.1. Introdução

Conforme referido anteriormente, embora estes compostos tenham sido determinados individualmente, parece útil o desenvolvimento de uma técnica multiparamétrica, permitindo assim com uma única determinação controlar:

- a qualidade do processo de torrefacção
- a genuidade do produto e
- a origem botânica.

2.1.2. Material e métodos

2.1.2.1. Amostras

As amostras foram fornecidas por uma indústria de torrefacção local. Foram conservadas em frascos herméticos para uso alimentar, à temperatura ambiente.

Utilizaram-se:

- 1 lote de café verde, *Coffea canephora* variedade robusta, originário da Índia, que apresentou uma perda de massa por secagem de 8,8%;
- o mesmo lote de café torrado que apresentou uma perda de massa por secagem de 2,1%;

2.1.2.1.1. Preparação das amostras

2.1.2.1.1.1. Processo de torrefacção

O processo de torra foi executado em torrefactor automático, durante 14 minutos, com aquecimento gradual desde 160 a 221°C. Findo este tempo, as amostras foram retiradas do torrefactor e arrefecidas em corrente de ar forçado.

As amostras de café verde e torrado foram trituradas respectivamente em almofariz apropriado e moinho para café, apresentando no final uma granulometria de 0,8 mm.

2.1.2.1.1.2. Processo extractivo

Um grama de pó de café em grão foi misturado com 200 ml de água desionizada em ebulição e deixou-se ferver durante 2 minutos. Esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 250 ml, deixou-se arrefecer e completou-se o volume. Após homogeneização e filtração, procedeu-se à injeção de 20 μ l em sistema cromatográfico de HPLC.

Na preparação das amostras verificou-se que uma clarificação prévia com solução de Carrez ou por passagem através de coluna Sep-pack C₁₈ causava perdas dos compostos em análise.

2.1.2.2. Reagentes e padrões

Os padrões de 5-HMF, furfural, ácido 5-O-cafeoilquínico e cafeína utilizados eram da marca Sigma.

A água usada para cromatografia apresentava resistividade superior a 15 M Ω , tendo sido filtrada por membrana de 0,2 μ m de porosidade e desgaseificada.

O metanol tinha grau Lichrosolv. Os restantes reagentes apresentavam grau de pureza p.a. e eram da marca Merck ou Pronalab.

2.1.2.3. Metodologia

2.1.2.3.1. Aparelhagem

Cromatógrafo líquido de alta pressão, Gilson, equipado com 2 bombas, modelos 302 e 305; injector Rheodyne, modelo 7125, provido de loop de 20 μ l.

Coluna cromatográfica Spherisorb RP ODS2 (5 μ m; 25,0 cm x 4,6 mm).

Detector «diode-array», Gilson, modelo 160.

Membranas filtrantes Schleider & Schull, 0,2 μ m, NL 16.

Banho de ultra-sons, marca Bandelin Sonorex RK 100.

2.1.2.3.2. Condições cromatográficas

A melhor resolução cromatográfica dos compostos em análise, depois de terem sido experimentados vários gradientes, foi obtida nas seguintes condições:

- Eluente A: solução aquosa de ácido acético a 0,2%.
- Eluente B: metanol.
- Gradiente: 0 min-7,5% B; 10 min-20% B; 12 min-30% B; 20 min-35% B; 28 min-40% B.
- Fluxo: 1 ml/min.
- Detecção com detector de díodos
- Registo dos cromatogramas a 280nm.

2.1.2.3.3. Identificação

Os compostos em análise foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção (t_R) e dos espectros de UV com padrões.

2.1.3. Doseamento

Para a quantificação dos compostos em estudo (5-HMF, furfural, ácido 5-*O*-cafeoilquínico e cafeína) empregou-se o método do padrão externo.

Fizeram-se tentativas para a utilização do método do padrão interno, nomeadamente com o ácido gálico. Este mostrou ser um bom padrão interno no caso do café torrado, mas não apresentou o mesmo comportamento com o café verde. Dada a grande complexidade e diversidade das matrizes em estudo (café verde e café torrado), optou-se pela utilização do método do padrão externo.

Fizeram-se curvas de calibração de 4 misturas de padrões com a seguinte constituição:

- P_1 : 0,25mg/l em 5-HMF; 0,10 mg/l em furfural; 5 mg/l em ácido 5-*O*-cafeoilquínico e 10 mg/l em cafeína.

- P_2 : 0,50 mg/l em 5-HMF; 0,25 mg/l em furfural; 10mg/l em ácido 5-*O*-cafeoilquínico e 25 mg/l em cafeína.

- P_3 : 2,50 mg/l em 5-HMF; 0,50 mg/l em furfural; 50mg/l em ácido 5-*O*-cafeoilquínico e 100 mg/l em cafeína.

- P_4 : 5 mg/l em 5-HMF; 2,50 mg/l em furfural; 75 mg/l em ácido 5-*O*-cafeoilquínico e 150 mg/l em cafeína

Os ensaios para cada mistura de padrões foram efectuados em triplicado.

As soluções padrão foram preparadas em água desionizada, refrigeradas e mantidas ao abrigo da luz.

As curvas de calibração e respectivas equações da recta para cada composto em análise apresentam-se nas Figuras 9 a 12.

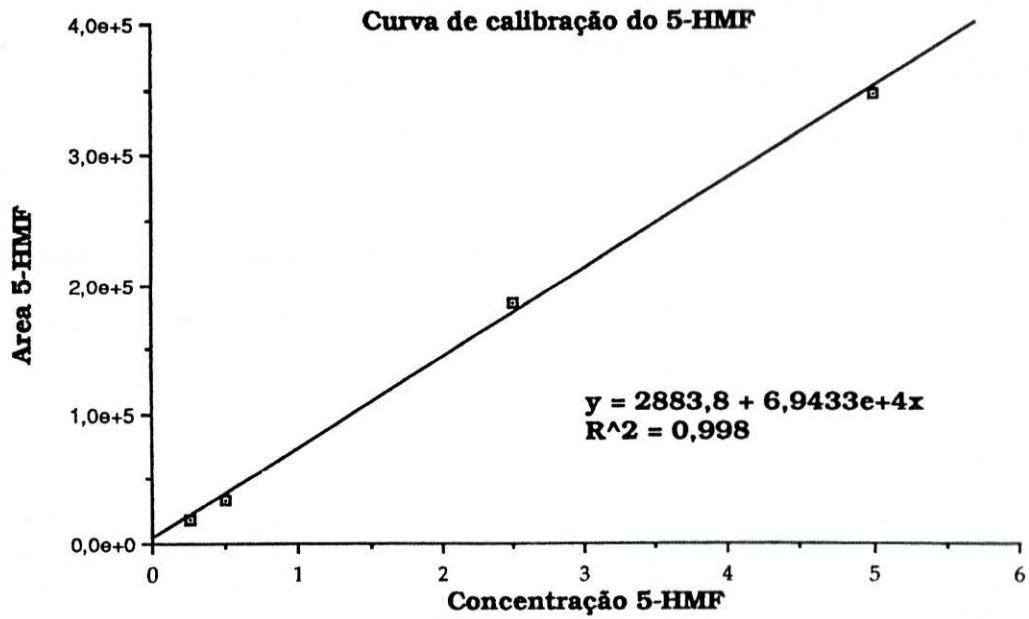


Fig. 9 - Curva de calibração do 5-HMF

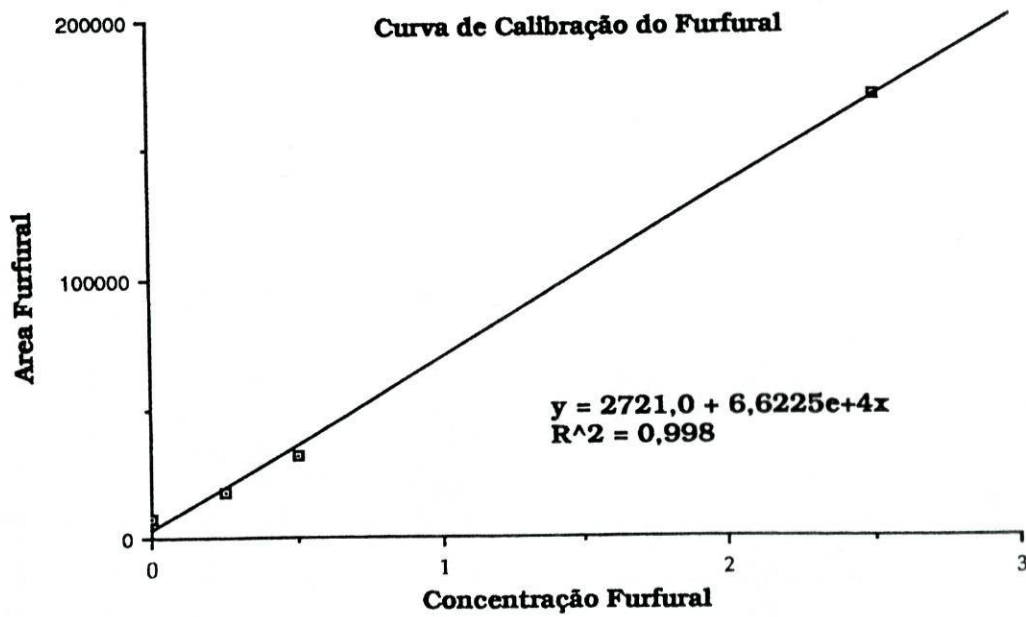


Fig. 10 - Curva de calibração do furfural

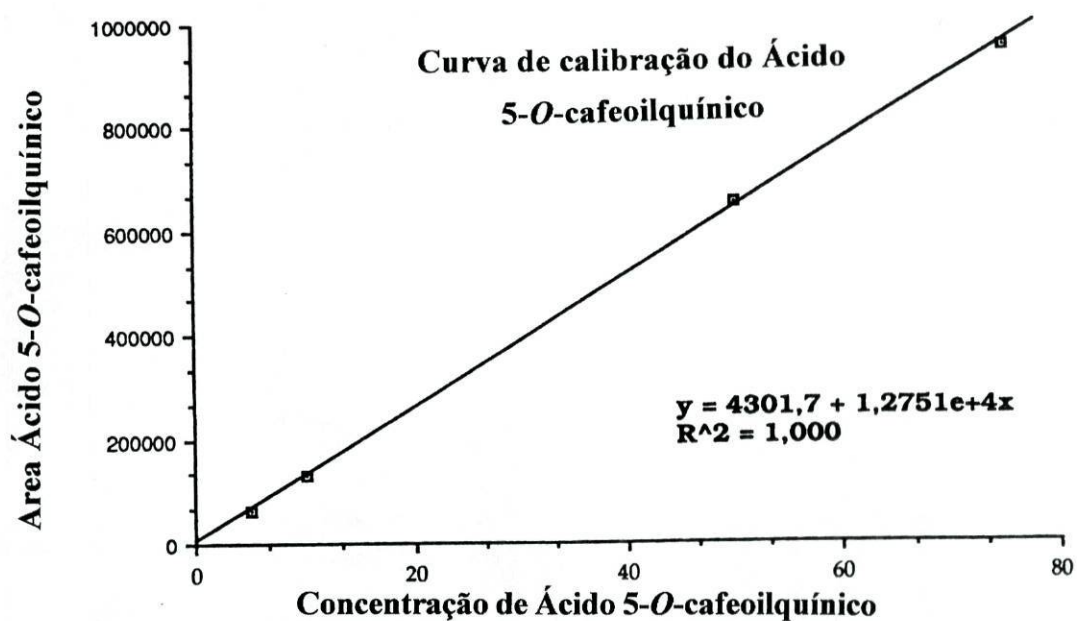


Fig. 11 - Curva de calibração do ácido 5-O-cafeoilquínico

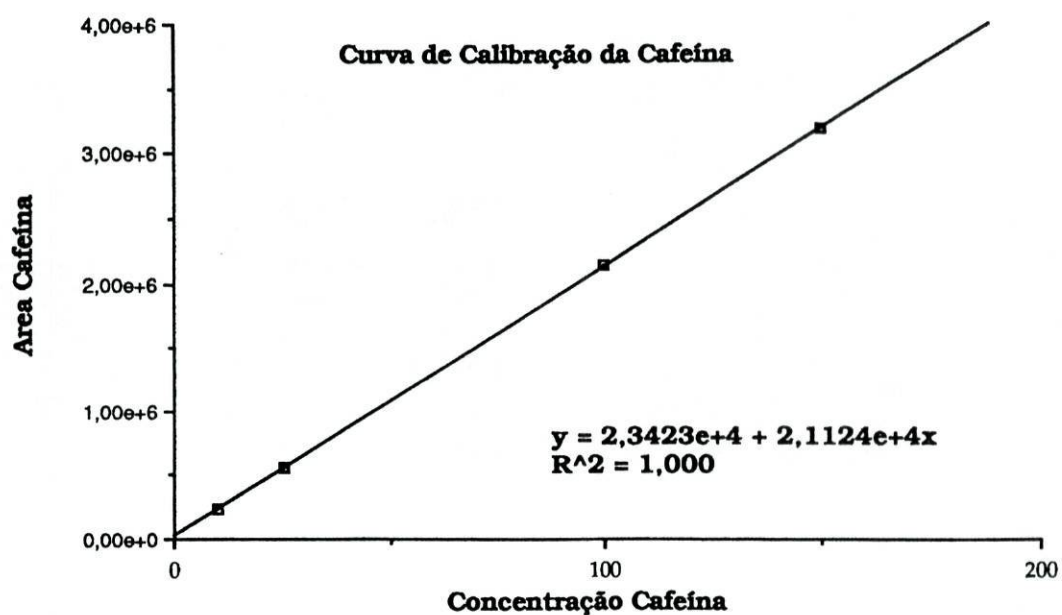


Fig. 12 - Curva de calibração da cafeína

Como se pode verificar todas as curvas de calibração apresentam coeficientes de correlação que invariavelmente excedem 0,99 para os quatro compostos em estudo.

As curvas de calibração para o 5-HMF, furfural, ácido 5-*O*-cafeoilquínico e cafeína foram, respectivamente, $y = 69433x + 2883,8$; $y = 66225x + 2721,0$; $y = 12751x + 4301,7$ e $y = 21124x + 23423,0$.

2.1.4. Validação do método

2.1.4.1. Limite de detecção

O limite de detecção foi calculado como sendo a concentração correspondente a três vezes o desvio-padrão do ruído de fundo.

2.1.4.2. Linearidade

Nas condições de ensaio foi obtida uma relação linear entre a concentração e a absorvância no UV (280nm).

2.1.4.3. Reprodutibilidade

Para o estudo da reprodutibilidade realizaram-se 10 determinações sobre a mesma amostra de café e calcularam-se no café verde e torrado os valores da média, desvio-padrão e coeficiente de variação para cada composto em análise.

2.1.4.4. Recuperação

A determinação das percentagens de recuperação foi realizada pelo método das adições. Para isso, adicionaram-se aos café verde e torrado quantidades conhecidas dos compostos em análise, tendo sido efectuadas 3 injeções para cada concentração. A partir da quantidade de cada composto encontrada na análise por HPLC, e do seu teor original, calcularam-se as respectivas percentagens de recuperação.

2.2. Estudo da termodegradação do 5-HMF

2.2.1. Material e métodos

2.2.1.1. Aparelhagem

Cromatógrafo líquido de alta pressão, Gilson, equipado com 2 bombas, modelos 302 e 305; injetor Rheodyne, modelo 7125, provido de loop de 20 μ l.

Coluna cromatográfica Spherisorb RP ODS2 (5 μ m; 25,0 cm x 4,6 mm).

Detector de díodos, Gilson, modelo 160.

Membranas filtrantes Schleider & Schull, 0,2 μ m, NL 16.

Banho de ultra-sons, marca Bandelin Sonorex RK 100.

2.2.1.2. Reagentes e padrões

O padrão de 5-HMF apresentava grau de pureza de 99% e era da marca Sigma.

A água usada para cromatografia apresentava resistividade superior a 15 M Ω , tendo sido filtrada por membrana de 0,2 μ m de porosidade e desgaseificada.

O MeOH empregue no HPLC era Lichrosolv. Os restantes reagentes apresentavam grau de pureza p.a. e eram da marca Merck ou Pronalab.

2.2.1.3. Protocolo

Nove quantidades iguais de 5-HMF (50 mg) foram colocadas no fundo de cápsulas de porcelana e submetidas a aquecimento em estufa às temperaturas de 100, 120, 140, 160, 180, 200, 210, 215 e 220 °C durante 15 minutos. Posteriormente, cada amostra foi transferida para um balão volumétrico com metanol, tendo-se completado o volume de 5 ml. A mistura foi filtrada e 20 μ l foram injectados no cromatógrafo de HPLC acoplado a um detector de díodos.

2.2.1.4. Condições cromatográficas

A melhor resolução cromatográfica dos compostos em análise, depois de terem sido experimentados outros gradientes, foi obtida nas seguintes condições:

- Eluente A: solução aquosa de ácido acético a 0,2%
- Eluente B: MeOH
- Gradiente: 0 min-7,5% B; 7 min-40% B; 18 min-60% B; 24 min-80% B; 29 min-90% B
- Fluxo: 1 ml/min
- Detecção com detector de díodos
- Registro dos cromatogramas a 280 nm.

2.2.1.5. Isolamento do composto bis [2-formilfurano-5-il] dimetiléter

A partir do ensaio a $T_{210^{\circ}\text{C}}$, procedeu-se ao isolamento do composto t_R 14,5 min. (composto 2) por HPLC semi-preparativa, utilizando-se para isso uma coluna Spherisorb ODS2 (10 μm ; 10,0 mm x 25,0 cm). O volume de amostra injectado foi de 2 ml. Manteve-se o mesmo gradiente empregue no HPLC analítico, mas aumentou-se o fluxo (2 ml/min.).

2.2.1.6. Identificação do composto bis [2-formilfurano-5-il] dimetiléter

O eluato do composto 2 foi concentrado no vázio a temperatura inferior a 40 °C, tendo subsequentemente sido utilizado nas análises de GC/MS e ^1H -RMN.

III - Resultados e Discussão

3.1. Validação da metodologia otimizada para o doseamento simultâneo de 5-HMF, furfural, ácido 5-*O*-cafeoilquínico e cafeína em café verde e torrado

A Tabela 7 apresenta os tempos de retenção, limite de detecção e linearidade dos compostos em análise.

Composto	5-HMF	Furfural	Ác. 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	Cafeína
tempo de retenção	9 min 53 s	13 min 49 s	18 min 27 s	24 min 49 s
Limite de detecção	0,25 µg / ml	0,10 µg / ml	2,50 µg / ml	0,25 µg / ml
Linearidade	0,25 - 10,00 µg / ml	0,10 - 10,00 µg / ml	2,50 - 100,00 µg / ml	0,25 - 200,00 µg / ml

Tabela 7 - Tempo de retenção, limite de detecção e linearidade dos compostos em análise

3.1.1. Limite de detecção

Os limites de detecção dos compostos em análise e determinados pela metodologia descrita foram 0,25 µg/ml; 0,10 µg/ml; 2,50 µg/ml e 0,25 µg/ml, respectivamente para o 5-HMF, furfural, ácido 5-*O*-cafeoilquínico e cafeína.

Verifica-se que o furfural é o composto com um limite de detecção inferior (0,10 µg/ml). Pelo contrário, o ácido 5-*O*-cafeoilquínico apresenta um limite de detecção de 2,5 µg/ml, dez vezes superior ao encontrado para o 5-HMF e cafeína (0,25 µg/ml).

3.1.2. Linearidade

Nas condições de ensaio foi obtida uma relação linear entre a concentração e a absorvância a 280 nm dos quatro compostos em estudo.

As gamas das concentrações variaram entre limites diversos o que está relacionado com os teores desses compostos na matriz em estudo. Assim, o estudo da linearidade desta técnica para o furfural ocorreu entre 0,10 e 10 µg/ml, uma vez que é o composto que regra geral aparece em quantidades reduzidas. Para a cafeína, um componente mais abundante o estudo da linearidade foi feito entre 0,25 e 200 µg/ml.

3.1.3. Reprodutibilidade

Os valores das médias, desvio-padrão e coeficientes de variação para os compostos em análise inserem-se nas Tabelas 8 e 9, respectivamente para o café verde e torrado.

Para o café torrado o desvio-padrão foi 0,776; 1,270; 0,115 e 0,251, respectivamente para o 5-HMF, furfural, ácido 5-*O*-cafeoilquínico e cafeína. O coeficiente de variação foi 0,52%; 0,62%; 0,14% e 0,50%, respectivamente para o 5-HMF, furfural, ácido 5-*O*-cafeoilquínico e cafeína.

Para o café verde o desvio-padrão foi 0,350 e 0,263, respectivamente para o ácido 5-*O*-cafeoilquínico e cafeína enquanto que os coeficientes de variação correspondentes foram 0,76% e 0,89%.

Composto	5-HMF	Furfural	Ác. 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	Cafeína
média (n=10)*	-	-	46,5 x 10 ³	29,4 x 10 ³
desvio-padrão*	-	-	0,350	0,263
CV%	-	-	0,76%	0,89%

Tabela 8 - Média, desvio-padrão e CV% para os compostos analisados no café verde

* valores expressos em mgkg⁻¹

Composto	5-HMF	Furfural	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	Cafeína
média (n=10)*	61,6	19,9	7,3 x 10 ³	27,5 x 10 ³
desvio-padrão*	0,776	1,270	0,115	0,251
CV%	0,52%	0,62%	0,14%	0,50%

Tabela 9 - Média, desvio-padrão e CV% para os compostos analisados no café torrado

* valores expressos em mgkg⁻¹

Como se pode verificar no café verde não é possível estudar a reprodutibilidade para o 5-HMF e furfural, uma vez que estes compostos não existem nesta matriz. No café torrado, e resultante das alterações que ocorrem durante a torrefacção, estes compostos estão já presentes em teores da ordem dos 60 mgkg^{-1} para o 5-HMF e 20 mgkg^{-1} para o furfural, apresentando, respectivamente, coeficientes de variação de 0,52 e 0,62%.

Quanto à cafeína e ácido 5-*O*-cafeoilquínico, são substâncias presentes em maior quantidade no café verde (respectivamente $29,4 \times 10^3$ e $46,5 \times 10^3 \text{ mgkg}^{-1}$) que no café torrado (respectivamente $27,5 \times 10^3$ e $7,3 \times 10^3 \text{ mgkg}^{-1}$), apresentando coeficientes de variação inferiores no café torrado.

É de notar que a observação das Tabelas 8 e 9 permite verificar claramente as modificações ocorridas com a torrefacção justificando, como já foi referido, que o café verde e torrado correspondem a matrizes muito diversas.

É nítido:

- o aparecimento de aldeídos furânicos (5-HMF e furfural) desde teores não detectados até 62 e 20 mgkg^{-1} ;
- o desaparecimento do ácido 5-*O*-cafeoilquínico de $46,5 \times 10^3 \text{ mgkg}^{-1}$ no café verde para $7,3 \times 10^3 \text{ mgkg}^{-1}$ no café torrado;
- a estabilidade apresentada pela cafeína (variou de $29,4 \times 10^3$ para $27,5 \times 10^3$).

Tais factos são também facilmente visualizados pelos perfis cromatográficos apresentados nas Fig. 13 e 14.

3.1.4. Recuperação

Os resultados obtidos do estudo da recuperação do método encontram-se expressos nas Tabelas 10 e 11. O método apresentou boa recuperação, demonstrando tratar-se de um processo de extracção eficaz.

Pode verificar-se que:

- os valores médios da percentagem de recuperação para o 5-HMF e furfural foram, respectivamente, 93,4% (variou nas diferentes concentrações adicionadas entre 85,0 e 104,4%) e 97,3% (com variações entre 87,0 e 103,0%).

Pelos valores da percentagem de recuperação encontrados, as concentrações mais pequenas são as que fornecem menores percentagens de recuperação.

A recuperação (%) só foi estudada no café torrado, uma vez que estes compostos não existem no café verde;

	Adicionado (mg/kg)	Encontrado*	Desvio padrão	CV%	Recuperação (%)
Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	10,00	7,28	0,438	6,02	72,8
	25,00	18,53	0,919	4,96	74,1
	40,00	29,00	0,177	0,61	72,5
Cafeína	10,00	9,43	0,148	1,58	94,3
	25,00	24,53	0,156	0,63	98,1
	50,00	48,90	0,007	0,01	97,8

Tabela 10 - Estudo da recuperação do ácido 5-*O*-cafeoilquínico e da cafeína em café verde

* valor médio de três ensaios para cada concentração

	Adicionado (mg/kg)	Encontrado*	Desvio padrão	CV%	Recuperação (%)
5-HMF	0,50	0,43	0,007	1,7	85,0
	1,00	0,92	0,021	2,3	91,0
	2,50	2,61	0,141	5,4	104,4
Furfural	0,50	0,44	0,078	17,9	87,0
	1,00	1,03	0,156	15,1	103,0
	2,00	2,04	0,092	4,5	101,8
Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	10,00	9,40	0,325	3,5	94,0
	25,00	22,43	0,198	0,9	89,7
	40,00	35,24	0,170	0,5	88,1
Cafeína	10,00	7,71	0,120	1,6	77,1
	25,00	17,09	0,255	1,5	68,4
	50,00	37,11	0,834	2,3	74,2

Tabela 11 - Estudo da recuperação dos compostos analisados no café torrado

* valor médio de três ensaios para cada concentração

- o valor médio de percentagem de recuperação do ácido 5-*O*-cafeoilquínico no café verde é 73,1%, variando entre 72,5 e 74,1%.

No café torrado o valor médio encontrado foi 90,6%, com variações entre 88,1 e 94,0%.

Pelos valores encontrados parece possível inferir que este método extractivo é mais adequado ao café torrado;

- o estudo da percentagem de recuperação da cafeína permitiu obter um valor médio de 96,7% (variações entre 94,3 e 98,1%) no café verde e um valor médio de 73,2% (variações entre 68,4 e 77,1%) no café torrado.

Contrariamente ao referido para o ácido 5-*O*-cafeoilquínico, o processo extractivo parece ser mais adequado para o café verde;

- o diferente comportamento dos quatro compostos em estudo é justificado pelas estruturas químicas que têm e como já foi referido são bastante diversas.

3.1.5. Cromatogramas

Nas Fig. 13 e 14 apresentam-se os perfis cromatográficos das separações optimizadas dos quatro compostos de uma amostra, respectivamente de café verde e do correspondente café torrado. É claramente visível o desaparecimento do ácido 5-*O*-cafeoilquínico (3), uma diminuição da cafeína (4) e o aparecimento de 5-HMF (1) e de furfural (2), por efeito da torrefacção.

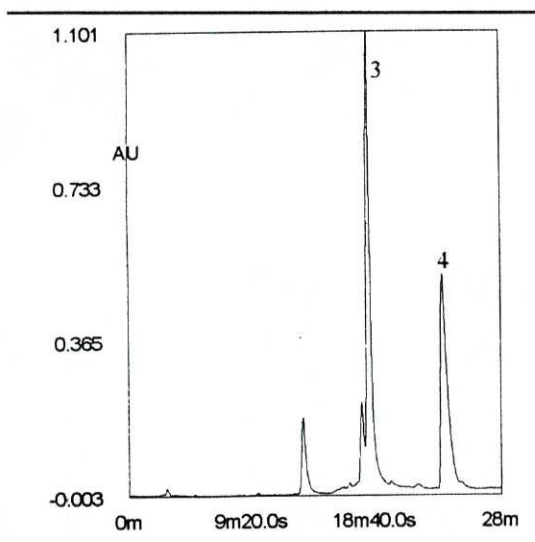


Fig. 13 - Perfil cromatográfico do café verde

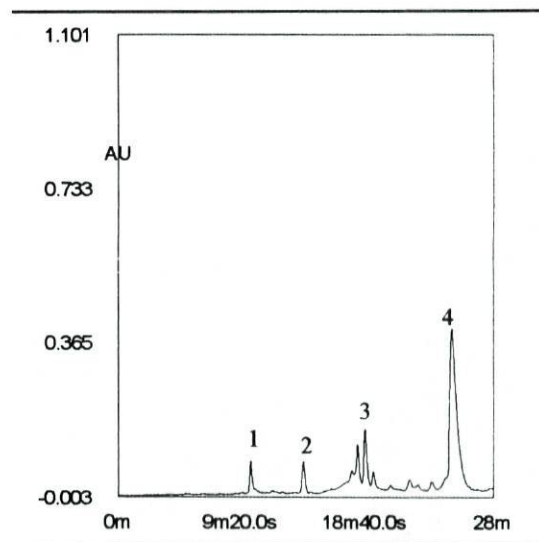


Fig. 14 - Perfil cromatográfico do café torrado

3.2. Isolamento e identificação do bis [2-formilfurano-5-il] dimetiléter

3.2.1. Cromatografia em camada fina

Com o objectivo de controlar o ensaio de termodegradação uma alíquota do filtrado foi submetido a cromatografia em placas cromatográficas de folha de plástico Kieselgel 60 da Merck. As placas foram colocadas em câmara de eluição com acetato de etilo/clorofórmio (80:20). Após eluição, as placas foram visualizadas a 366 nm. Enquanto que para a temperatura ambiente, 140° e 160°C obteve-se apenas uma mancha opaca, a partir dos 180°C obtiveram-se duas manchas fluorescentes com R_f diferentes da anterior.

Por outro lado, quando se aplicou como revelador a resorcina em meio clorídrico (teste de Fiehe), verificou-se o aparecimento de maior número de manchas. Assim, à temperatura ambiente surgiram três manchas vinosas. A partir dos 140°C apareceu outra mancha. Para a temperatura de 180°C, apareceram três manchas (desapareceu a mancha com R_f maior. Finalmente, para as temperaturas 200 e 220°C só houve desenvolvimento da mancha com R_f menor (próxima da linha de solvente). Assim, será de concluir que mesmo à temperatura ambiente existe mais do que um composto no padrão de 5-HMF. No entanto, a partir de certa temperatura ($T_{200^\circ\text{C}}$) a presença de 5-HMF torna-se insignificante para surgir apenas um composto com R_f mais baixo.

3.2.2. HPLC

O perfil cromatográfico da amostra pura (Fig. 15) evoluiu às diferentes temperaturas (Fig. 16-24), observando-se um decréscimo de 5-HMF (1) e o aparecimento de vários picos, sendo de realçar os compostos de t_R 14,5 min (2), t_R 20,9 min (3) e t_R 23,0 min (4). Pode-se, igualmente, visualizar um pico com t_R 23,1 min (5) quando a mostra foi submetida a temperaturas mais elevadas.

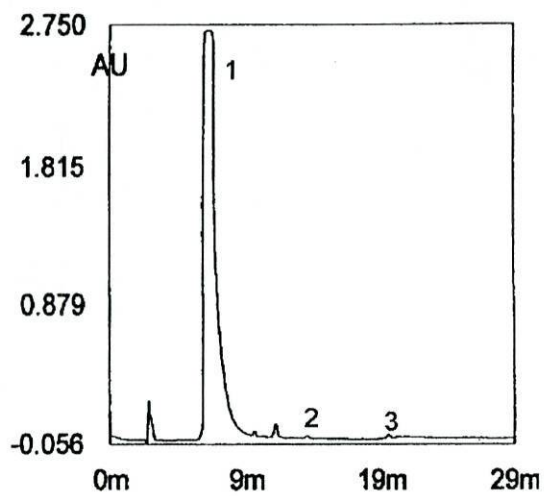


Fig. 15 - 5-HMF à temp. ambiente

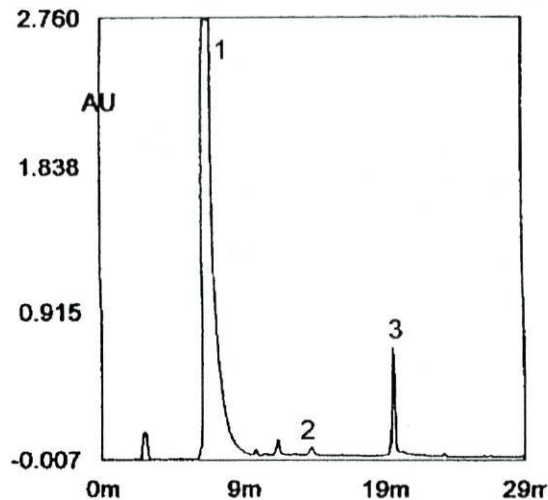


Fig. 16 - 5-HMF a 100 °C

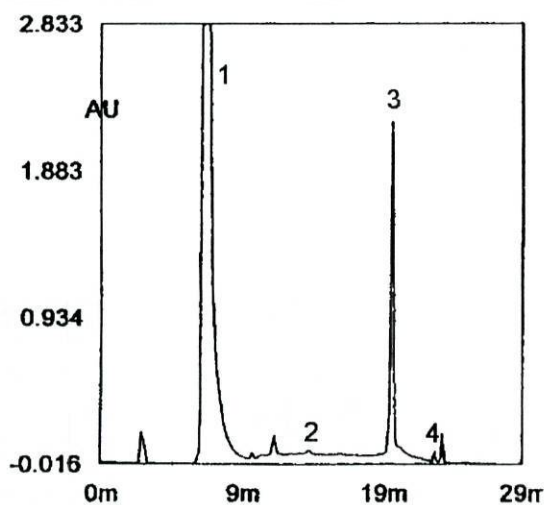


Fig. 17 - 5-HMF a 120 °C

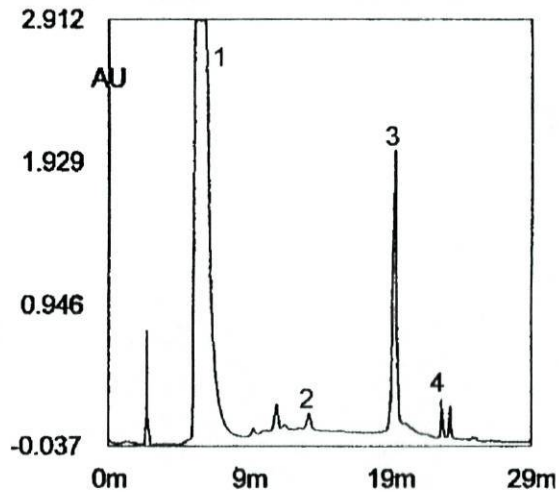


Fig. 18 - 5-HMF a 140 °C

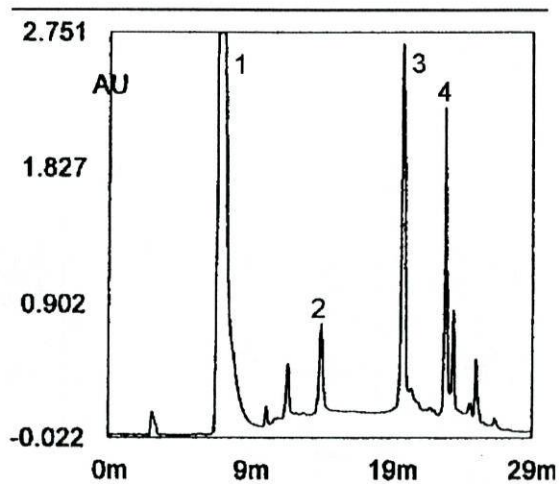


Fig. 19- 5-HMF a 160 °C

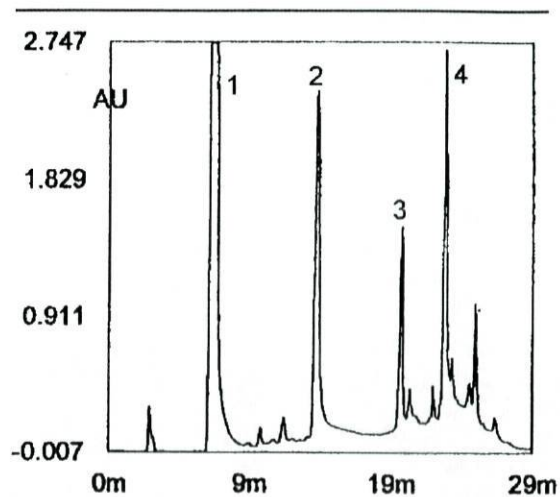


Fig. 20 - 5-HMF a 180 °C

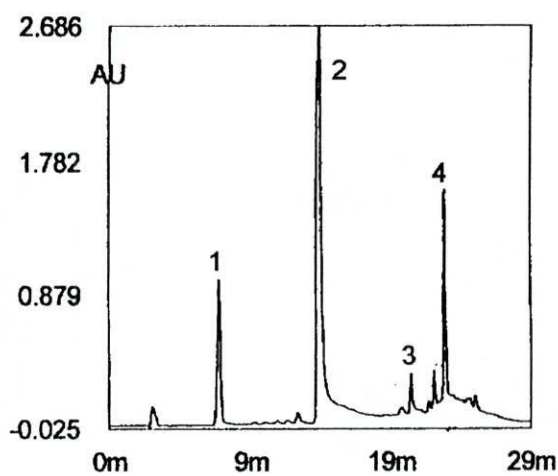


Fig. 21 - 5-HMF a 200 °C

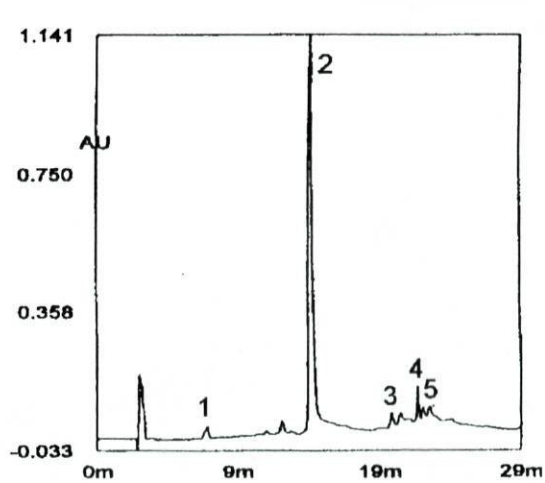


Fig. 22 - 5-HMF a 210 °C

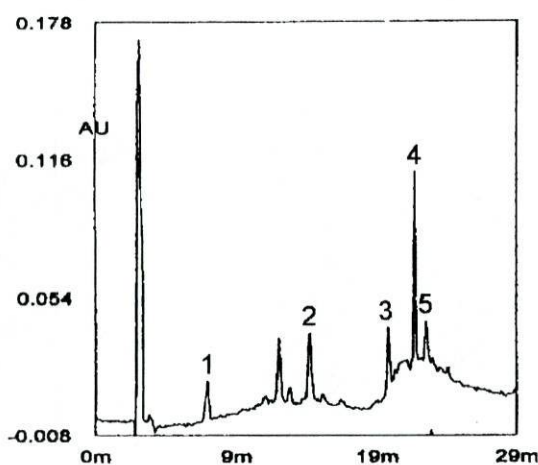


Fig. 23 - 5-HMF a 215 °C

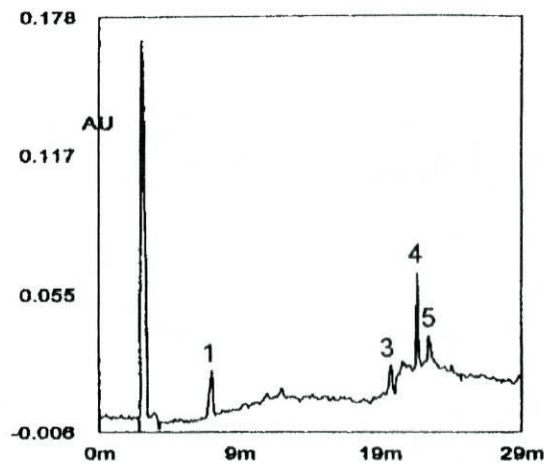


Fig. 24 - 5-HMF a 220 °C

Da análise dos perfis cromatográficos constata-se que o composto com t_R 20,9 min (3) é já detectável no padrão de 5-HMF em quantidades vestigiais (Fig. 15), aos 100 °C sofre já um incremento (Fig. 16), atingindo o seu máximo para $T_{160^\circ\text{C}}$ (Fig. 19). A partir daí, este composto vai diminuído, estando em quantidades quase vestigiais a $T_{200^\circ\text{C}}$ (Fig. 22).

A partir de $T_{160^\circ\text{C}}$ verifica-se o incremento dos picos (2) e (4) que no entanto apresentam perfis degradativos muito diferentes. Enquanto que o composto (4) atinge o seu máximo para $T_{200^\circ\text{C}}$ (Fig. 20), o composto (2) atinge o seu máximo para $T_{210^\circ\text{C}}$ (Fig. 22). Nesta última temperatura o composto (4) quase não é visível.

Na Figura 25 está representada a evolução global dos cinco compostos no que se refere à percentagem das áreas relativas em função da temperatura do ensaio de degradação. Para além do que já foi referido, pela análise dos perfis cromatográficos, a partir deste gráfico constata-se que o 5-HMF sofre um decréscimo gradual desde os 100 °C até aos 210 °C. A $T_{210^\circ\text{C}}$ o 5-HMF está quase completamente decomposto.

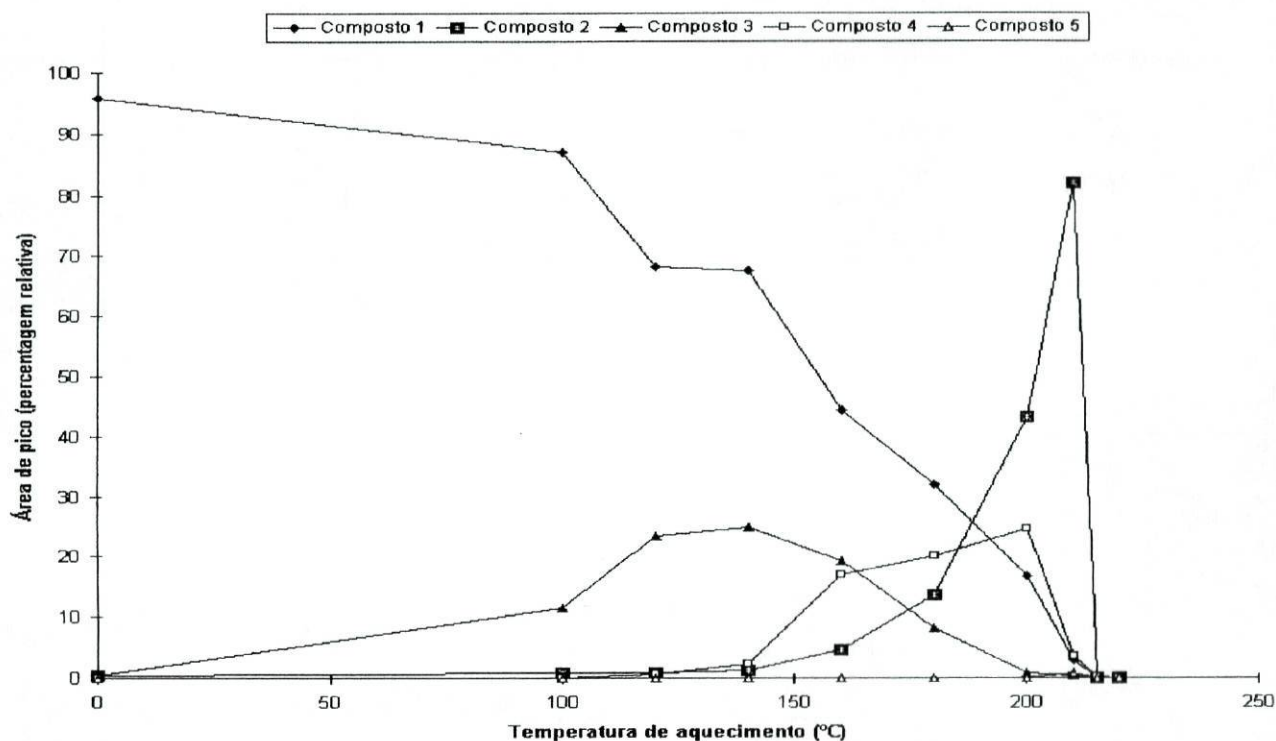


Fig. 25 - Decomposição térmica do 5-HMF

Pelo descrito, quando o 5-HMF está completamente decomposto o composto (2) atinge a sua concentração máxima. Pela sua grande estabilidade a temperaturas elevadas, e em produtos sujeitos a processamento térmico, talvez seja melhor como indicador da drasticidade do processo a detecção deste composto (2) que a determinação dos teores de 5-HMF.

Por tal facto, procedeu-se ao isolamento do referido composto e à sua identificação.

3.2.3. Absorção no UV

O espectro no ultravioleta do composto (2) apresenta um $\lambda_{\text{máx}}$ para 281,4 nm e um ombro a 234,2 nm (Fig. 26).

Quando se comparam os espectros de UV do 5-HMF com o do composto (2) constata-se que ambos são sobreponíveis, sendo estes semelhantes aos espectros electrónicos dos aldeídos furânicos.

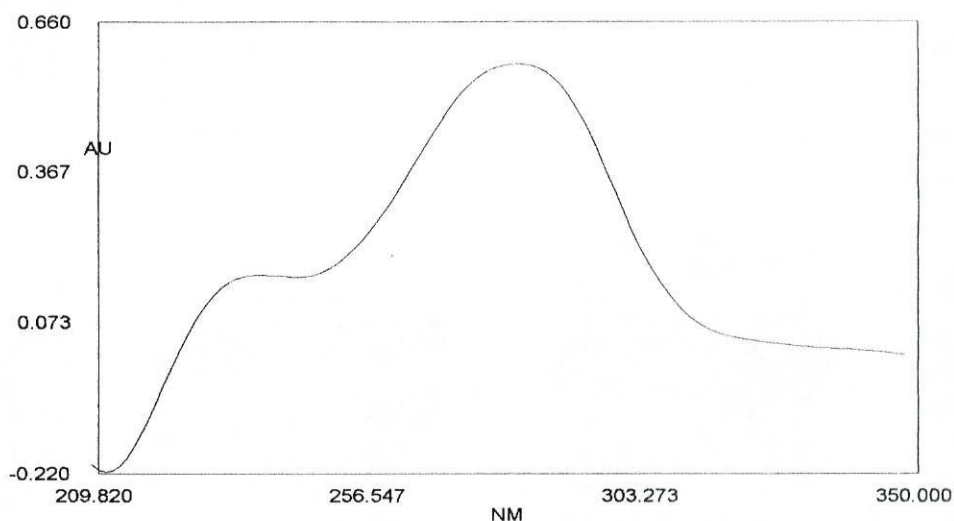


Fig. 26 - Espectro de absorção do composto (2) no UV obtido com um detector de díodos

3.2.4. ^1H -RMN

O espectro do composto (2), redissolvido em clorofórmio deuterado, foi executado a 300 MHz, empregando como padrão interno o TMS (Fig. 27). Este apresentou um singlete a δ : 9,64 (s, 2H, 2 x CHO), um duplete δ : 7,22 (d, $J=3,5$ Hz, 2H, 2 x $\text{C}_3\text{-H}$), outro duplete a δ : 6,58 (d, $J=3,6$ Hz, 2H, 2 x $\text{C}_4\text{-H}$) e um singlete a δ : 4,64 (s, 4H, 2 x CH_2).

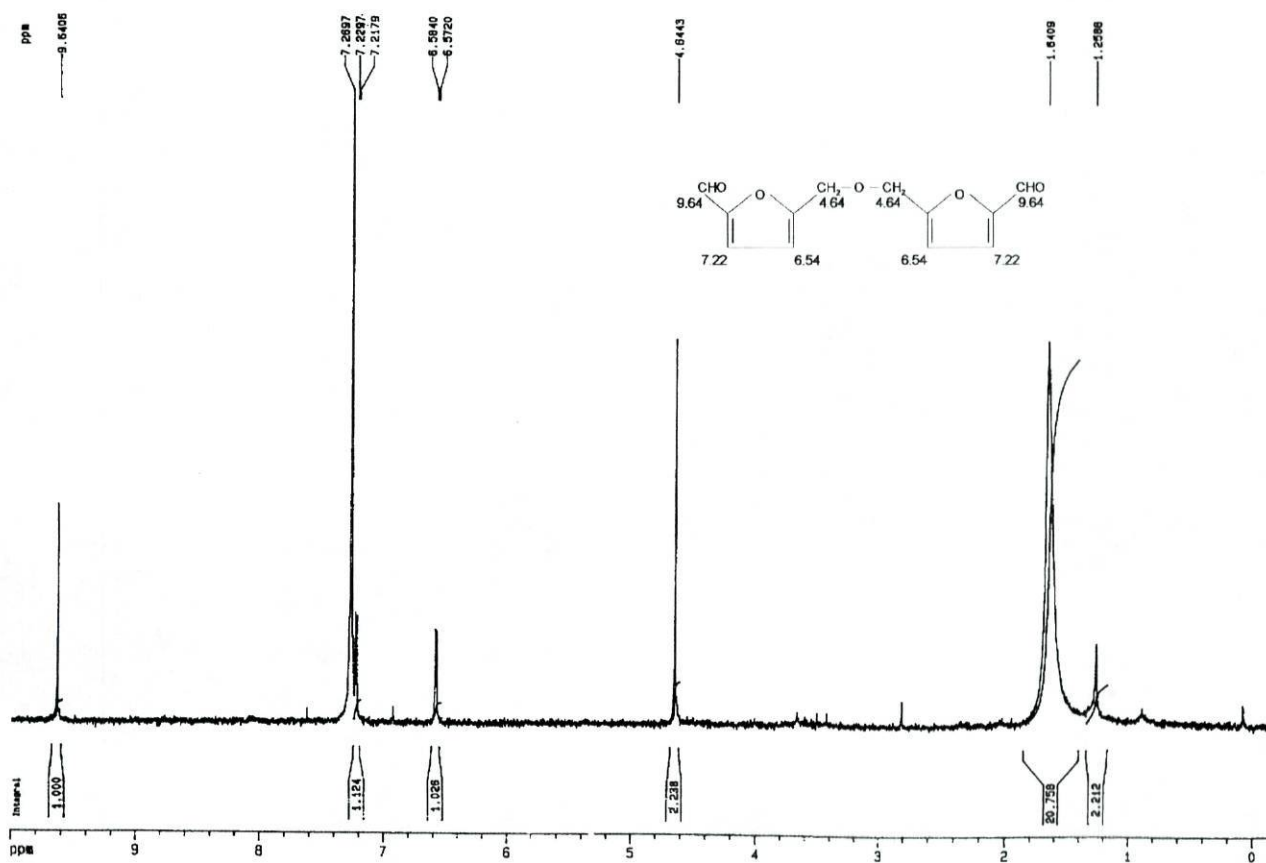


Fig. 27 - Espectro de ¹H-RMN do composto (2) em CDCl₃

3.2.5. GC/MS

O espectro de massa do composto (2) foi obtido por impacto electrónico num sistema HP 5980/6970 MSD GC/MS, equipado com uma coluna capilar DB-5MS, 30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm de espessura de filme (J&W Scientific), acoplada a um detector de massa.

Procedeu-se à injeção de 1,5 µl de amostra em modo «splitless» a 220 °C.

A temperatura inicial da coluna era de 70 °C, mantida durante 1 min., tendo em seguida a temperatura aumentado 25 °C/min. até aos 280 °C.

A aquisição dos dados foi feita em varrimento total (35:600) após optimização das condições analíticas do espectrómetro de massa com perfluortributilamina.

Obtiveram-se como iões mais abundantes os correspondentes aos fragmentos de relação m/z (intensidade relativa %): M⁺ 234 (C₁₂H₁₀O₅) (1%), 206 (7%), 177 (1%), 138 (3%), 125 (7%), 123 (8%), 110 (43%), 109 (100%), 96 (2%), 95 (18%), 82 (30%), 81 (99%), 79 (7%),

69 (13%), 68 (5%), 53 (94%), 52 (36%), 51 (31%), 50 (16%), 41 (30%), 39 (59%) e 38 (25%) (Fig. 28).

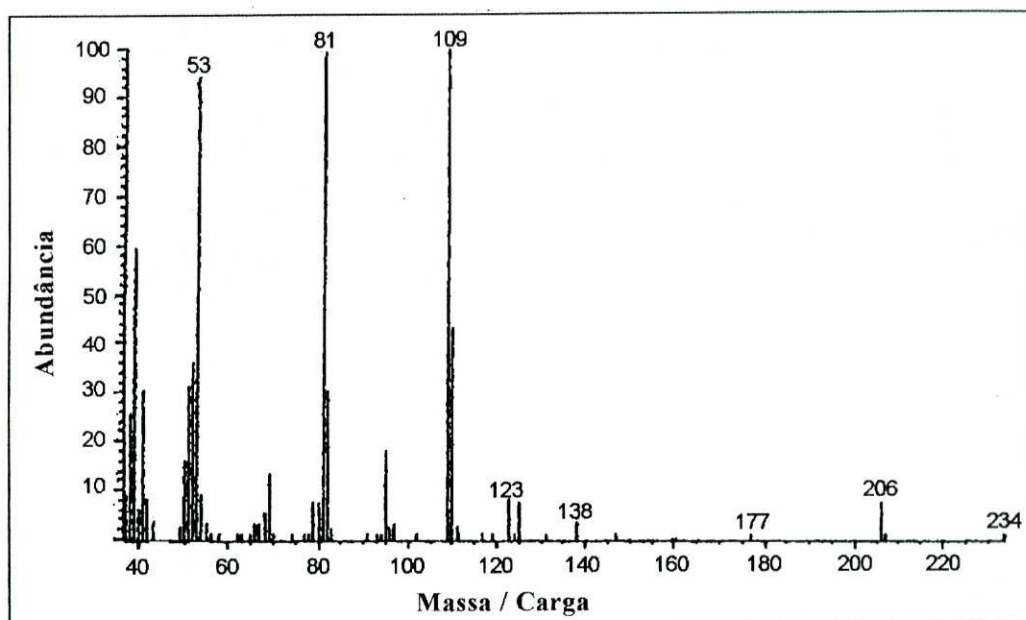


Fig. 28 - Espectro de massa do composto (2) obtido por impacto electrónico (70 eV)

Na Fig. 29 apresenta-se o possível esquema de fragmentação do composto (2) elaborado de acordo com o esquema de fragmentação para compostos furânicos proposto por Porter e Baldas.

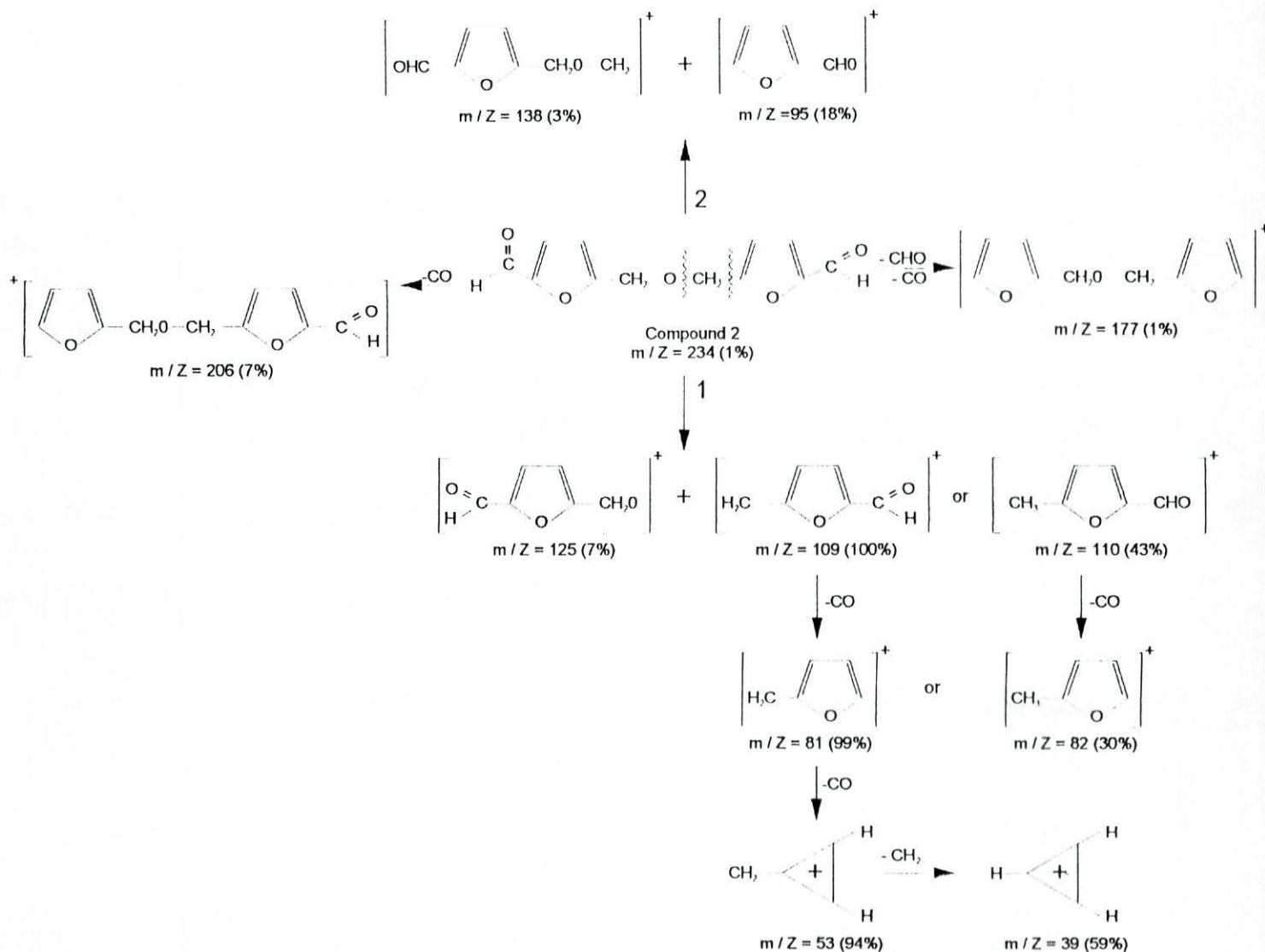


Fig. 29 - Possível mecanismo de fragmentação do composto (2)

3.2.6. Identificação do composto isolado

Todos os dados apresentados são consistentes com a fórmula molecular $C_{12}H_{10}O_5$ e com a estrutura química apresentada na Figura 30.

Do ponto de vista teórico, a formação do composto (2) poderá ser facilmente explicada a partir de duas moléculas de 5-HMF, por eliminação intermolecular de água, tal como se mostra

na Figura 31.

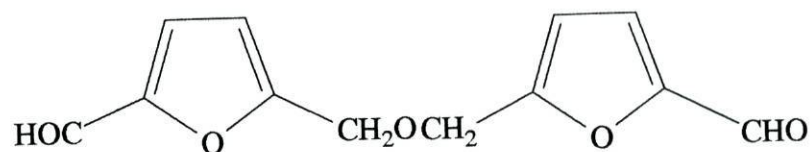


Fig. 30 - Estrutura química do composto (2)

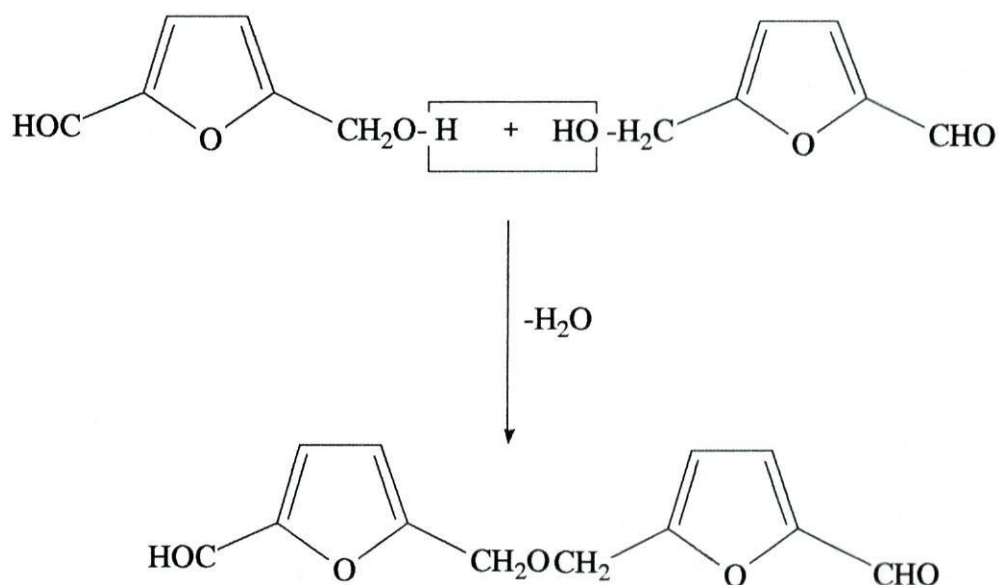


Fig. 31 - Mecanismo de formação do composto (2)

Do estudo de termodegradação do 5-HMF conclui-se que este quando exposto a temperaturas tão baixas quanto os 100 °C durante 15 min sofre decomposição térmica, tendo

ficado quase totalmente decomposto para $T_{210\text{ }^{\circ}\text{C}}$. Nas condições experimentais empregues formaram-se igualmente outros compostos termolábeis à excepção do composto (2), um éter simétrico, dímero do 5-HMF e quimicamente identificado como o bis [2-formilfurano-5-il] dimetiléter (M^+ 234; $C_{12}H_{10}O_5$). Este composto poderá corresponder a um melhor marcador de tratamento térmico dos alimentos até 200-210 °C do que o próprio 5-HMF.

IV - Conclusões

Os objectivos do trabalho foram atingidos no essencial:

1. Foi possível desenvolver uma metodologia simples e rápida de HPLC/detector de díodos que permite, simultaneamente, dosar com fiabilidade aceitável quatro compostos: 5-HMF, furfural, ácido 5-*O*-cafeoilquínico e cafeína.

2. Foram realizados com êxito ensaios de termodegradação de 5-HMF, em estufa às temperaturas de 100, 120, 140, 160, 180, 200, 210, 215 e 220 °C, durante um período constante de exposição (15 min.).

3. Foi possível por análise cromatográfica de HPLC/UV seguir o comportamento de termodecomposição do 5-HMF em ensaio e estudar a evolução dos produtos da sua degradação.

4. Observou-se a formação de cinco compostos maioritários que o detector de UV revelou conter o cromóforo furfural, tendo-se seguido a evolução de cada um dos compostos.

5. Destes cinco compostos o produto mais estável que inicialmente designamos por composto (2), com t_R 14,5 min. (cujo início de formação foi observada no ensaio de termodegradação à temperatura de 160 °C, que atingiu o máximo de concentração no ensaio à temperatura de 210 °C e que praticamente se degradou à temperatura de 220 °C), foi isolado por cromatografia semi-preparativa de HPLC e identificado através das suas características espectrais de UV, ¹H-RMN e MS como sendo um éter metílico simétrico do 5-HMF, o bis [2-formilfurano-5-il] dimetiléter.

6. O composto mencionado em 5 poderá vir a revelar-se por ventura mais útil do que o 5-HMF (parâmetro clássico informativo do aquecimento e envelhecimento dos alimentos contendo na sua composição hidratos de carbono) no processo e torrefacção do café e da intensidade de calor/tempo praticados. Porém, a hipótese desta utilidade carece de demonstração que poderá ser feita após a sua aplicação a amostras autênticas de café torrado segundo metodologia de torrefacção conhecida.

V - Bibliografia

- Abdel-Moety, E. M. (1988). First-derivative spectrophotometric and gas-liquid chromatographic determination of caffeine in foods and pharmaceuticals. I. Rapid determination of caffeine in coffee, tea and drinks. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 186 (5), 412-416.
- Aboul-Enein, H. Y. and Bakr, S. A. (1997). Comparative study of the separation and determination of aspartame and its decomposition products in bulk material and diet soft drinks by HPLC and CE. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 20 (9), 1437-1444.
- Abraham, S. K. (1995). Inhibitory effects of coffee on transplacental genotoxicity in mice. *Mutat. Res.* 347 (1), 45-52.
- Abuirjeie, M. A., El-Din, M. S. and Mahmoud, I. I. (1992). Determination of theobromine, theophylline, and caffeine in various food products using derivative UV-spectrophotometric techniques and high-performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* 15 (1), 101-125.
- Aeschbacher, H. U. and Jaccaud, E. (1990). Inhibition by coffee of nitrosourea-mediated DNA damage in mice. *Food Chem. Toxicol.* 28 (9), 633-637.
- Agrawal, A. K. and Sharma, S. K. (1986). Spectrophotometric determination of caffeine as its murexide. *J. Inst. Chem. (India)* 58 (4), 146.
- Alfonso, F. C., Martin, G. E. and Dyer, R. H. (1980). High pressure liquid chromatographic determination of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde in caramel solution. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63 (6), 1310-1313.
- Aldrian, P. S., Keen, C. L., Lönnerdal, B. and Dewel, K.G. (1997). Effects of coffee consumption on iron, zinc and copper status in nonpregnant and pregnant Sprague-Dawley rats. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 48 (3), 177-189.
- Allen, B. H. and Chin, H. B. (1980). Rapid HPLC determination of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde in tomato paste. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63 (6), 1310-1313.
- Alonso, J., Bartroli, J. and Blanco, M. (1982). Determination of 2-furaldehyde by flow injection analysis. *Quim. Anal.* 1 (4), 261-267.
- Antal, M. J. J. and Mok, W. S. L. (1990). Mechanism of formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde from D-fructose and sucrose. *Carbohydr. Res.* 199, 91-109.
- Antal, M. J. J., Leesomboon, T. and Mok, W. S. (1991). Mechanism of formation of 2-furaldehyde from D-xylose. *Carbohydr. Res.* 217, 71-85.
- Arion, W. J., Canfield, W. K., Ramos, F. C., Schindler, P. W., Burger, H. J., Hemmerle, H., Schubert, G., Below, P. and Herling, A. W. (1997). Chlorogenic acid and

hydroxybenzaldehyde: new inhibitors of hepatic glucose 6-phosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 339 (2), 315-322.

• Barroso, C. G., Rodríguez, M. C., Guillén, D. A. y Pérez-Bustamante, J. A. (1996). Analysis of low molecular mass phenolic compounds, furfural and 5-hydroxymethylfurfural in Brandy de Jerez by high-performance liquid chromatography-diode array detection with direct injection. *J. Chromatogr. A* 724, 125-129.

• Bernal, J. L., Del-Nozal, M. J., Toribio, L. and Del-Alamo, M. (1996). HPLC analysis of carbohydrates in wines and instant coffees using anion-exchange chromatography coupled to pulsed amperometric detection. *J. Agric. Food Chem.* 44 (2), 507-511.

• Bicchi, C. P., Binello, A. E., Pellegrino, G. M. and Vanni, A. C. (1995). Characterization of green and roasted coffees through the chlorogenic acid fraction by HPLC-UV and principal component analysis. *J. Agric. Food Chem.* 1549-1555.

• Blanc, M. B., Davis, G. E., Parchet, J. M. and Viani, R. (1989). Chromatographic profile of carbohydrates in commercial soluble coffees. *J. Agric. Food Chem.* 37, 926-930.

• Blauch, J. L., Stanley, M. and Tarka, Jr. (1983). HPLC determination of caffeine and theobromine in coffee, tea and instant hot cocoa mixes. *J. Food Sci.* 48 (3), 745-747 e 750.

• Boekel, M. A. and Rehman, Z. (1987). Determination of hydroxymethylfurfural in heated milk by high-performance liquid chromatography. *Neth. Milk Dairy J.* 41, 297-306.

• Braumann, U., Handel, H., Albert, K., Ecker, R. and Spraul, M. (1995). Online monitoring of the supercritical-fluid extraction process with proton nuclear magnetic resonance chromatography. *Anal. Chem.* 67 (5), 930-935.

• Burton, D. E., Powell, L. L. and Xi, X. B. (1994). Reproducibility of the determination of caffeine in coffee by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Microcolumn* 6 (1), 5-10.

• Cepeda, A., Paseiro, P., Simal, J. and Rodriguez, J. L. (1991). Determination of caffeine in different types of coffee by UV spectrophotometry. I. Green coffees and natural roasted coffees. *An. Bromatol.* 42 (2), 241-249.

• Chambel, P., Oliveira, M. B., Andrade, P. B., Seabra, R. M. e Ferreira, M. A. (1996). Desenvolvimento de uma metodologia de HPLC/UV para a avaliação simultânea de aldeídos furânicos, ácido clorogénico e cafeína em café. *X Encontro Galego de Química*, Porto, 27-29 Nov.

• Chambel, P., Oliveira, M. B., Andrade, P. B., Seabra, R. M. and Ferreira, M. A. (1997). Development of an HPLC/diode array detector method for simultaneous determination of 5-HMF, furfural, 5-O-caffeoylquinic acid and caffeine in coffee. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 20

(18), 2949-2957.

• Chambel, P., Oliveira, M. B., Andrade, P. B., Fernandes, J. O., Seabra, R. M. and Ferreira, M. A. Identification of bis [2-formylfuran-5-yl] dimethylether by thermal decomposition of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (em publicação).

• Chambel, P., Oliveira, M. B., Casal, S. e Ferreira, M. Hidroximetilfurfural (5-HMF) em alimentos e bebidas: aspectos químicos, tecnológicos, toxicológicos e analíticos (em publicação).

• Chen, J. (1987). Determination of caffeine in tea, coffee and cola drink by gas chromatography with nitrogen-phosphorous detector. *Sepu* 5 (6), 367-369.

• Cilliers, J. J. L. and Niekerk, P. J. V. (1984). Liquid chromatographic determination of hydroxymethylfurfural in fruit juices and concentrates after separation on two columns. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67 (6), 1037-1039.

• Cliffe, S., Fawer, M. S., Maier, G., Tanaka, K. and Ritter, G. (1994). Enzyme assays for phenolic content of natural juices. *J. Agric. Food Chem.* 42 (8), 1824-1828.

• Clifford, M. N. (1986). Coffee bean dicaffeoylquinic acids. *Phytochem.* 25 (7), 1767-1769.

• Clifford, M. N. (1989) in Coffee (Clarke, R. J. and Macrae, R. Ed.), Vol. 1, pp 153-201, Elsevier Applied Science, New York, USA.

• Clifford, M. N., Williams, T. and Bridson, D. (1989). Chlorogenic acids and caffeine as possible taxonomic criteria in *Coffea* and *Psilanthus*. *Phytochem.* 28 (3), 829-838.

• Clifford, M. N. and Ramirez-Martinez, J. R. (1991). Phenols and caffeine in wet-processed coffee beans and coffee pulp. *Food Chem.* 40, 35-42.

• Conney, A. H., Lysz, T., Ferraro, T., Abidi, T. F., Manchand, P. S., Laskin, J. D. and Huang, M. T. (1991). Inhibitory effect of curcumin and some related dietary compounds on tumor promotion and arachidonic acid metabolism in mouse skin. *Adv. Enzyme Regul.* 31, 385-396.

• Cook, S. E. and Pinkerton, T. C. (1985). Liquid chromatography of tomato paste serum with sample preparation by ultrafiltration. *J. Chromatogr.* 325, 450-455.

• Corradini, D. and Corradini, C. (1992). Separation and determination of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde and 2-furaldehyde in fruit juices by micellar electrokinetic capillary chromatography with direct sample injection. *J. Chromatogr.* 624, 503-509.

• Correia, A. M. N., Leitão, M. C. A. and Clifford, M. N. (1995). Caffeoyl-tyrosine and Angol II as a characteristic markers for Angolan robusta coffees. *Food Chem.* 53, 309-313.

• Csiba, A., Juhasz, S., Lombai, G. and Szentgyorgyi, M. (1997). Determination of formaldehyde in foods by HPLC. *Magy Keni Foly* 103 (1), 45-49.

-
- Czerny, M., Wagner, R. and Grosch, W. (1996). Detection of odour-active ethenylalkylpyrazines in roasted coffees. *J. Agric. Food Chem.* 44 (10), 3268-3272.
 - Daglia, M., Cuzzoni, M. T. and Dacarro, C. (1994). Antibacterial activity of coffee: relationship between biological activity and chemical markers. *J. Agric. Food Chem.* 42, 2273-2277.
 - Dam, H. E., Kieboom, A. P. G. and Bekkum, H. (1986). The conversion of fructose and glucose in acidic media: formation of hydroxymethylfurfural. *Starch* 38, 95-101.
 - Dao, L. and Friedman, M. (1992). Chlorogenic acid content of fresh and processed potatoes determined by ultra-violet spectrophotometry. *J. Agric. Food Chem.* 40 (11), 2152-2156.
 - Dart, S. K. and Nursten, H. E. in *Coffee* (Clarke, R. J. and Macrae, R. Ed.), Vol. 1, pp 223-263, (Clarke, R. J. and Macrae, R. Ed.), Elsevier Applied Science, New York, USA.
 - Dauberte, B., Estienne, J., Guerere, M. et Guera, N. (1990). Contribution a l'étude de la formation d'hydroxyméthylfurfural dans les boissons a base de jus de fruits et dans les cafés "torrefacto". *Ann. Fals. Exp. Chim.* 83 (889), 231-253.
 - Davis, G. E., Garwood, V. W., Burfuss, D. L., Husaini, S. A., Blanc, M. B. and Viani, R. (1990). Chromatographic profile of carbohydrates in commercial coffees. 2. Identification of mannitol. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1347-1350.
 - De Maria, C. A. B., Trugo, L. C., Neto, F. R. A. and Moreira, R. F. A. (1994). Arabinogalactan as a potential furfural precursor in roasted coffee. *Int. J. Food Sci. Technol.* 29, 559-562.
 - De Maria, C. A. B., Trugo, L. C. and Moreira, R. F. A. (1995). Simultaneous determination of total chlorogenic acid, trigonelline and caffeine in green coffee samples by high-performance gel-filtration chromatography. *Food Chem.* 52 (4), 447-449.
 - De Maria, C. A. B., Trugo, L. C., Neto, F. R. A., Moreira, R. F. A. and Alviano, C. S. (1996). Composition of green coffee water-soluble fractions and identification of volatiles formed during roasting. *Food Chem.* 55 (3), 203-207.
 - Devasagayam, T. P., Kamat, J. P., Mohan, H. and Kesavan, P. C. (1996). Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta* 1282 (1), 63-70.
 - Duplatre, A., Tisse, C. et Estienne, J. (1984). Contribution a l'identification des espèces arabica et robusta par étude de la fraction stérolique. *Ann. Fals. Exp. Chim.* 828, 259-270.
 - Fabian, Z., Izvekov, V., Salgo, A. and Orsi, F. (1994). Near infra-red reflectance and Fourier-transform infra-red analysis of instant coffee mixtures. *Anal. Proc.* 31 (9), 261-263.
-

-
- Facino, R. M., Carini, M., Aldini, G., Saibene, L. and Mauri, P. (1995). Echinacoside and caffeoyl conjugates protect collagen from free radical-induced degradation: a potential use of *Echinacea* extracts in the prevention of skin photodamage. *Planta Med.* 61 (6), 510-514.
 - Fukuhara, K., Matsuki, Y. and Nanbara, T. (1985). Simultaneous determination of theobromine, theophylline and caffeine in foods by high-performance liquid chromatography. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 26 (2), 208-212.
 - Fujikawa, T., Yamaguchi, A., Morita, I., Takeda, H. and Nishibe, S. (1996). Protective effects of *Acanthopanax senticosus* Harms from Hokkaido and its components on gastric ulcer in restrained cold water stressed rats. *Biol. Pharm. Bull.* 19 (9), 1227-30.
 - Fuleki, T. and Pelayo, E. (1993). Sugars, alcohols, and hydroxymethylfurfural in authentic variety and commercial grape juices. *J. AOAC Int.* 76 (1), 59-66.
 - Genaro, M. C. and Abrigo, C. (1992). Caffeine and theobromine in coffee, tea and cola beverages. Simultaneous determination by reversed-phase ion-interaction HPLC. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 343 (6), 523-525.
 - Germond, J. E., Philippoussian, G., Richli, U., Bracco, I. and Arnaud, M. J. (1987). Rapid and complete urinary elimination of [¹⁴C]-5-hydroxymethyl-2-furaldehyde administered orally or intravenously to rats. *J. Toxicol. Environ. Health* 22 (1), 79-89.
 - Gomes, P. C., Andrade, P. B., Oliveira, M. B., Fernandes, J. O. e Ferreira, M. (1996). Estudo da termodegradação do 5-HMF. *XV Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química*, Porto, 22-25 Maio.
 - Gómez, J. M., Serrano, F. O. y Villanova, R. G. (1987). Determinación espectrofotométrica de furfural y 5-hidroximetilfurfural en vinos de Jerez, previa formación de la correspondiente tiosemicarbazona. *Anal. Bromatol.* 39 (2), 211-218.
 - Gomis, D. B., Alvarez, M. D. G., Naredo, L. S. and Alonso, J. J. M. (1991). High-performance liquid chromatographic determination of furfural and hydroxymethylfurfural in apples juices and concentrates. *Chromatographia* 32 (1-2), 45-48.
 - Griffiths, D. W., Bain, H. and Dale, M. F. B. (1992). Development of a rapid colorimetric method for the determination of chlorogenic acid in freeze-dried potato tubers. *J. Sci. Food Agric.* 58 (1), 41-48.
 - Grosheny, B., Idengard, H. D. and Philipp, O. (1995). Determination of twelve organic acids and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in fruit juices by HPLC. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 91 (5), 137-140.
 - Gutnisky, A., Rizzo, N., Castro, M. E. and Garbossa, G. (1992). The inhibitory action of chlorogenic acid on the intestinal iron absorption in rats. *Acta Physiol. Pharmacol. Ther.*
-

Latinoam 42 (3), 139-146.

• Haleem, D. J., Yasmeen, A., Haleem, M. A. and Zafar, A. (1995). 24 h withdrawal following repeated administration of caffeine attenuates brain serotonin but not tryptophan in rat brain: implications for caffeine-induced depression. *Life Sci.* 57 (19), PL 285-292.

• Hayashi, T., Reece, C. A. and Shibamoto, T. (1986). Gas chromatographic determination of formaldehyde in coffee via thiazolidine derivative. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69 (1), 101-105.

• Heglund, D. L., Tilotta, D. C., Hawthorne, S. B. and Miller, D. J. (1994). Simple fibre-optic interface for online supercritical-fluid extraction-Fourier-transform infra-red spectrometry. *Anal. Chem.* 66 (20), 3543-3551.

• Hernández, E. G., Montilla-Gomez, J. and Garcia-Villanova, R. (1990). Spectrophotometric and chromatographic determination of 2-furaldehyde in wine: comparative study. *Afinidad* 430, 401-404.

• Hernández, E. G., Villanova, B. G. and Gómez, J. M. (1992). Determination of hydroxymethylfurfural in baby cereals by high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* 15 (14), 2551-2559.

• Hills, J. W., Hill, H. H., jun. and Maeda, T. (1991). Simultaneous supercritical-fluid derivatization and extraction. *Anal. Chem.* 63 (19), 2152-2155.

• Horie, H., Mukai, T. and Kohata, K. (1997). Simultaneous determination of qualitatively important components in green tea infusions using capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 758 (2), 332-335.

• Huang, M. T., Lysz, T., Farraro, T., Abidi, T. F., Laskin, J. D. and Conney, A. H. (1991). Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. *Cancer Res.* 51 (3), 813-819.

• Hughes, W. J. and Thorpe, T. M. (1987). Determination of organic acids and sucrose in roasted coffee by capillary gas chromatography. *J. Food Sci.* 52 (4), 1078-1083.

• Humphrey, C. J. and Macrae, R. (1987). Determination of chlorogenic acid in coffee: derivative spectrophotometry and its application to the characterization of instant coffee-chicory extracts. *Int. Anal.* 1 (7), 31-32, 34.

• Hurst, W. J. and Martin, R. A., jun. (1993). Quantitative determination of caffeine in beverages using capillary electrophoresis. *Analisis* 21 (9), 389-391.

• Jeuring, H. J. and Kupperts, F. J. E. M. (1980). High performance liquid chromatography of furfural and hydroxymethylfurfural in spirits and honey. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63 (6), 1215-1218.

- Jimidar, M., Hamoir, T. P., Forieeeeers, A. and Massart, D. L. (1993). Comparison of capillary zone electrophoresis with high-performance liquid chromatography for the determination of additives in foodstuffs. *J. Chromatogr.* 636 (1), 179-186.
- Kim, H. J. and Richardson, M. (1992). Determination of hydroxymethylfurfural by ion-exclusion chromatography with UV detection. *J. Chromatogr.* 593, 153-156.
- Kiridera, W., Poole, S. K. and Poole, C. F. (1994). Identification of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde in vanilla extracts. *J. Planar Chromatogr.* 7, 272-277.
- Kono, Y., Shibata, H., Kodama, Y. and Sawa, Y. (1995). The supression of the N-nitrosating reaction by chlorogenic acid. *Biochem. J.* (Pt 3), 947-953.
- Kroh, L. W. (1994). Caramelisation in food and beverages. *Food Chem.* 51, 373-379.
- Kuznetsov, D. I. and Semenova, L. I. (1989). Determination of caffeine. *Pishch. Prom-st.* (Moscow) 9, 65-66.
- Laranjinha, J., Almeida, L. and Madeira, V. (1995). Reduction of ferrylmyoglobin by dietary phenolic acid derivatives of cinnamic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 19 (3), 329-337.
- Lasztity, R., El-Morsi, A. E., Abdel-Samei, M. B. and Ramadan, M E. (1984). Solubility of sunflower proteins and gel-filtration chromatography of their water-soluble fractions. *Period. Polytech. Chem. Eng.* 28 (1), 55-62.
- Lau, O., Luk, S., Cheng, O. and Chiu, T. P. Y. (1992). Background-correction methods for the determination of caffeine in beverages, coffee and tea by using second-derivative ultraviolet spectrophotometry. *Analyst* (London) 117 (4), 777-783.
- Lee, H. S., Rouseff, R. L. and Nagy, S. (1986). HPLC determination of furfural and 5-hydroxymethylfurfural in citrus juices. *J. Food Sci.* 51 (4), 1075-1076.
- Lee, H. S. and Nagy, S. (1988). Quality changes and nonenzymatic browning intermediates in grapefruit juice duraing storage. *J. Food Sci.* 53 (1), 168-180.
- Li, T. (1990). Determination of caffeine content in coffee beverages by dual-wavelength thin-layer scanning method. *Yaowu Fenxi Zazhi* 10 (6), 366-367.
- Lo Coco, F., Valentini, C., Novelli, V. and Ceccon, L. (1992). High-performance liquid chromatographic determination of 2-furaldehyde in spirits. *J. Chromatogr.* 590 (2), 235-240.
- Lo Coco, F., Valentini, C., Novelli, V. and Ceccon, L. (1994). High-performance liquid chromatographic determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in processed citrus juice. *J. Liq. Chromatogr.* 17 (3), 603-617.
- Lo Coco, F., Valentini, C., Novelli, V. and Ceccon, L. (1995). Liquid-chromatographic determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in beer. *Anal. Chim. Acta* 306 (1), 57-64.

-
- Lo Coco, F., Valentini, C., Novelli, V. and Ceccon, L. (1996). High-performance liquid chromatographic determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in honey. *J. Chromatogr. A* 749, 95-102.
 - Lopez, F. S., Tu, D., Xue, S., Meng, C., Mansilla, A. E. and Peña, A. M. (1992). Simultaneous determination of 2-furaldehyde and 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde by derivative spectrophotometry. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1022-1025.
 - Malmberg, A. G. and Theander, O. (1984). Analysis of chlorogenic acid, coumarins and feruloylputrescin in different parts of potato tubers infected with Phoma. *Swed. J. Agric. Res.* 14 (2), 63-70.
 - Malmberg, A. G. and Theander, O. (1985). Determination of chlorogenic acid in potato tubers. *J. Agric. Food Chem.* 33 (3), 549-551.
 - Mansilla, A. E., Salinas, F. and Nevado, J. J. B. (1992). Differential determination of furfural and hydroxymethylfurfural by derivative spectrophotometry. *J. AOAC Int.* 75 (4), 678-684.
 - Mansilla, A. E., Peña, M. and Salinas, F. (1993). Semiautomatic determination of furanic aldehydes in food and pharmaceutical samples by stopped-flow injection analysis method. *J. AOAC Int.* 76 (6), 1255-1261.
 - Marcy, J. E. and Rouseff, R. L. (1984). High-performance liquid-chromatographic determination of furfural [2-furaldehyde] in orange juice. *J. Agric. Food Chem.* 32 (5), 979-981.
 - Martelli, A. e Belliardo, F. (1987). Influenza del procedimento di estrazione dalla matrice nella determinazione della caffeina per HPLC in prodotti alimentari e dietetici. *Rev. Soc. Ital. Sci. Aliment.* 16 (2), 121-128.
 - Marx, F., Pfeilsticker, K. and Maia, J. G. S. (1985). Analysis of garana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). I. Determination of caffeine, theobromine and theophylline in garana seeds by HPLC. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 81 (12), 390-392.
 - Matsukura, R., Aleixo, L. M., Godinho, O. E. S. and Neto, G. O. (1993). Determination of glucose in instant coffee with an enzyme electrode. *Anal. Chim. Acta* 280, 49-52.
 - Meydav, S. and Berk, Z. (1978). Colorimetric determination of browning precursors in orange juice products. *J. Agric. Food Chem.* 26 (1), 282-285.
 - Meyer, A., Ngiruwonsanga, T. and Henze, G. (1996). Determination of adenine, caffeine, theophylline and theobromine by HPLC with amperometric detection. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 356, (3-4), 284-287.
 - Mijares, R. M., Park, G. L., Nelson, D. B. and Mciver, R. C. (1986). HPLC analysis of HMF in orange juice. *J. Food Sci.* 51, (3), 843-844.
-

-
- Mir, M. V., Granados, J. Q., Serrana, H. L. G. and Martinez, M. C. L. (1992). High performance liquid chromatography determination of furanic compounds in commercial brandies and caramels. *J. Liq. Chromatogr.* 15 (3), 513-524.
 - Montilla-Gomez, J., Olea-Serrano, F. and Garcia-Villanova, R. (1988). Spectrophotometric determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde as the thiosemicarbazones in Malaga wine. *Quim. Anal.* 7 (1), 77-84.
 - Morales, F. J. N., Romeno, C. E. y Jimenez, S. P. (1994). Presencia de 5-hidroximetilfurfural en leche tratada térmicamente. *Alimentacion, equipos y tecnologia* 13 (2), 43-50.
 - Morishita, H., Iwahashi, H. and Kido, R. (1986). 3-O-caffeoyl-4-O-feruloylquinic acid from green robusta coffee beans *Phytochem.* 25 (11), 2679-2680.
 - Moriyasu, T., Saito, K., Nakazato, M., Ishikawa, F., Fujinuma, K., Nishima, T. and Tamura, Y. (1996). Simultaneous determination of caffeine, theobromine and theophylline in foods by HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 37 (1), 14-19.
 - Muhtadi, F. J., El-Hawary, S. S. and Hifnawy, M. S. (1990). Comparative HPLC and GLC determination of caffeine in different food products. *J. Liq. Chromatogr.* 13 (5), 1013-1028.
 - Murata, M., Okada, H. and Homma, S. (1995). Hydroxycinnamic acid derivatives and *p*-coumaroyl-(L)-tryptophan. A novel hydroxycinnamic acid derivative from coffee beans. *Biosci. Biochem.* 59 (10), 1887-1890.
 - Namiki, M. (1988) in *Advances in Food Research* (Chichester, C. O. and Scheweigert, B. S., Ed.), Vol 32, pp 115-184, Academic Press Inc Ltd., London.
 - Nehlig, A. and Debry, G. (1994). Potential teratogenic and neurodevelopmental consequences of coffee and caffeine exposure a review on human and animal data. *Neurotoxicol. Teratol.* 16 (6), 531-543.
 - Nicoletti, I., Corradini, C., Cogliandro, E. and Corradini, D. (1996). Identification and dosage of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in beverages by reversed-phase chromatography with a microbore column. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 19 (8), 1241-1254.
 - Nishi, M., Ohba, S., Hirata, K. and Miyake, H. (1996). Dose-response relationship between coffee and the risk of pancreas cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 26 (1), 42-48.
 - Nygard, O., Refsum, H., Ueland, P. M., Stensvold, I., Nordrehaug, J. E., Kvale, G. and Vollset, S. E. (1997). Coffee consumption and total plasma homocysteine: The Hordaland Homocysteine Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 65 (1), 136-143.
-

-
- Oderiz, M. L. V., Blanco, M. E. V., Hernandez, J. L., Lazaro, J. S. and Rodriguez, M. A. R. (1994). Simultaneous determination of organic acids and vitamin C in green beans by liquid chromatography. *J. AOAC Int.* 77 (4), 1056-1059.
 - Oliveira, B., Andrade, P., Cabral, S., Chambel, P., Leitão, R., Seabra, R. e Ferreira, M. Café: Possíveis indicadores químicos de torrefacção (aldeídos furânicos, ácidos clorogénicos, cafeína e ácidos gordos *trans* insaturados. *Rev. Port. Farm.* (aceite para publicação).
 - Oliveira, B., M. P. P., Cabral, S. I. P., Gomes, P. C. A. C. e Ferreira, M., A. (1995). Efeito da torrefacção na composição dos ácidos gordos (isómeros *trans*) de cafés de diversas proveniências. *IX Encontro Galego Português de Química*, Lugo, Espanha, 22-24 Nov.
 - Parliment, T. H. and Stahl, H. D. (1995). What makes coffee smell so good?. *Chemtech.* Aug., 38-49.
 - Paseiro, P. and Simal, J. (1985). Contribution to spectrophotometric determination of caffeine in coffee. *An. Bromatol.* 36 (1), 97-108.
 - Paton, N. H. (1992). Sugar cane phenolics and first expressed juice colour. I. Determination of chlorogenic acid and other phenolics in sugar cane by HPLC. *Int. Sugar J.* 94 (1121), 99-100, 101-102,108.
 - Payá, M., Ferrandiz, M. L., Sanz, M. J. and Alcaraz, M. J. (1993). Effects of phenolic compounds on bromobenzene-mediated hepatotoxicity in mice. *Xenobiotica* 23 (3), 327-333.
 - Pompei, C., Rossi, M. and Barozzi, E. (1986). Rectified concentrated grape must: HPLC analysis of phenolic substances and hydroxymethylfurfural. *J. Food Sci.* 51 (6), 1498-1500.
 - Porreta, S. and Sandei, L. (1991). Determination of 5-(hydroxymethyl)-2-furfural (HMF) in tomato products: proposal of a rapid HPLC method and its comparison with the colorimetric method. *Food Chem.* 39, 51-57.
 - Porter, Q. N. and Baldas, J. (1971) in *Mass spectrometry of heterocyclic compounds*, Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc., New York.
 - Prodoliet, J., Bruehlhart, M., Lador, F., Martinez, C. and Obert, L. (1995). Determination of free and total carbohydrate profile in soluble coffee. *J. AOAC Int.* 78 (3), 749-760.
 - Prodoliet, J., Bugnes, E. and Feinberg, M. (1995). Determination of carbohydrates in soluble coffee by anio-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 78 (3), 768-782.
 - Puputti, E. and Lehtonen, P. (1986). High-performance liquid-chromatographic separation and diode-array spectroscopic identification of dinitrophenylhydrazone derivatives of carbonyl compounds from whiskies. *J. Chromatogr.* 353, 163-168.
 - Ren, Y., Gao, Z. and Huang, B. (1990). Rapid determination of preservatives, sweet-
-

eners, food colourings and caffeine by HPLC. *Shipin Yu Fajiao Gongye* 72-75.

• Reynaldo, I., Gonzalez-Abreu, A., Espinosa, M. and Benitez, G. (1983). Method for the separation of phenols present in citrus juices, using high-pressure liquid chromatography. *Rev. CENIC, Cienc. Biol.* 14 (2), 373-375.

• Rizzolo, A., Nani, R. e Picariello, M. (1989). Determinazione per HPLC di HMF, acido clorogenico e acido caffeico in succhi limpidi di piccoli frutti. *Ind. Bevande* 18, 183-186.

• Rodriguez-de-Sotillo, D., Hadley, M. and Holm, E. T. (1994). Phenolics in aqueous potato peel extract: extraction, identification and degradation. *J. Food Sci.* 59 (3), 649-651.

• Ruiz-Lapuente, M. A., Armandans, G. L., Vaqué, R. J., Rosselló, U. J., Alberti, J. J. and Chácon, C. P. (1995). Relationship between coffee and blood cholesterol in a sample of working women. *Med. Clin. (Barc.)* 105 (18), 687-690.

• Sadzuka, Y., Mochizuki, E. and Takino, Y. (1995). Mechanism of caffeine modulation activity of adriamycin. *Toxicol. Lett.* 75 (1-3), 39-49.

• Sastry, C. S. P., Rao, K. E., Vijaya, D., Rao, A. R. and Rao, M. V. (1988). Spectrophotometric methods for determination of morin, quercetin, tannin and chlorogenic acid. *J. Food Sci. Technol.* 25 (3), 156-157.

• Shahrzad, S. and Bitsch, I. (1996). Determination of some pharmacologically active phenolic acids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 741, 223-231.

• Shi, R. and Schwedt, G. (1995). HPLC and TLC analysis of phenolic compounds in wine. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 91 (1), 14-17.

• Shi, Y. L., Han, J. T., Liu, Q. P., Liu, J. C. and Cheng J. K. (1996). Separation of purine biological bases by reversed-phase high-performance liquid chromatography and the determination of caffeine in beverages. *Fenxi Shiyanshi* 15 (3), 15-18.

• Shimizu, J. and Watanabe, M. (1979). Gas chromatographic analysis of furfural and hydroxymethylfurfural in wine. *Agric. Biol. Chem.* 43 (6), 1365-1366.

• Smith, R. M. (1981). Determination of 5-hydroxymethylfurfural and caffeine in coffee and chicory extracts by high performance liquid chromatography. *Food Chem.* 6, 41-45.

• Stadler, R. H., Turesky, R. J., Muller, O., Markovic, J. and Leong-Morgenthaler, P. M. (1994). The inhibitory effects of coffee on radical-mediated oxidation and mutagenicity. *Mutat. Res.* 308 (2), 177-190.

• Stadler, R. H. and Fay, L. B. (1995). Antioxidative reactions of caffeine: formation of 8-oxocaffeine (1,3,7-trimethyluric acid) in coffee subject to oxidative stress. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1332-1338.

• Stavric, B. and Klassen, R. (1994). Dietary effects on the uptake of benzo(a)pyrene.

Food Chem. Toxicol. 32 (8), 727-734.

- Surth, Y. J. and Tannenbaum, S. R. (1994). Activation of the Maillard reaction product 5-(hydroxymethyl)furfural to strong mutagens via allylic sulfonation and chlorination. *Chem. Res. Toxicol.* 7 (3), 313-318.

- Surth, Y. J., Liem, A., Miller, J. A. and Tannenbaum, S. R. (1994). 5-Sulfooxymethylfurfural as a possible ultimate mutagenic and carcinogenic metabolite of the Maillard reaction product 5-hydroxymethylfurfural. *Carcinogenesis* 15 (10), 2375-2377.

- Tanaka, T., Nishikawa, A., Shima, H., Sugie, S., Shinoda, T., Yoshimi, N., Iwata, H. and Mori, H. (1990). Inhibitory effects of chlorogenic acid, reserpine, polyphenolic acid (E-5166), or coffee on hepatocarcinogenesis in rats and hamsters. *Basic Life Sci.* 52, 429-440.

- Terada, H. and Sakabe, Y. (1984). High-performance liquid-chromatographic determination of theobromine, theophylline and caffeine in food products. *J. Chromatogr.* 291, 453-459.

- Terada, H., Suzuki, A., Tanaka, H. and Yamamoto, K. (1992). Determination of chatecins and methylxantines in foodstuffs by semi-micro high-performance liquid chromatography. *Shohukin Eiseigaku Zasshi* 33 (4), 347-354.

- Terada, H., Suzuki, A., Tanaka, H. and Miyabe, M. (1996). Semi-micro high-performance liquid chromatographic determination of caffeine and related substances (methylxanthines) in dairy foods. *Jpn. J. Food Chem.* 3 (2), 125-129.

- The Merck Index (1989) 10 th edn. (Windholtz Ed.), pp 248, 330-331, 673, 767, Rahway, N. J.: Merck and Co.

- Thompson, C. O., Trenerry, V. C. and Kemmery, B. (1995). Micellar electrokinetic capillary-chromatographic determination of artificial sweeteners in low-Joule soft drinks and other foods, *J. Chromatogr.* 694 (2), 507-514.

- Traore, F., Pianetti, G. A., Dallery, L., Tod, M., Chalom, J., Farotti, R. and Mahuzier, G. (1993). Determination of picomole amounts of carbonyl as luminarin hydrazones by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Chromatographia* 36, 96-104.

- Trugo, L. C., Macrae, R. and Dick, J. (1983). Determination of purine alkaloids and trigonelline in instant coffee and other beverages using high-performance liquid chromatography. *J. Sci. Food Agric.* 34 (3), 300-306.

- Trugo, L. C. and Macrae, R. (1984). Chlorogenic acid composition of instant coffees, *Analyst* 109, 263-266.

- Trugo, L. C., De-Maria, C. A. B. and Werneck, C. C. (1991). Simultaneous determination of total chlorogenic acid and caffeine in coffee by high-performance gel-filtration chroma-

tography. *Food Chem.* 42 (1), 81-87.

- Tse, S. Y. H. (1991). Coffee contains cholinomimetic compound distinct from caffeine. I. Purification and chromatographic analysis. *J. Pharm. Sci.* 80 (7), 665-669.
- Tsuchiya, T., Suzuki, O. and Igarashi, K. (1996). Protective effects of chlorogenic acid on paraquat-induced oxidative stress in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60 (5), 765-768.
- Upmooor, D. and Brunner, G. (1989). Applications of supercritical-fluid chromatography (SFC) for online analysis. *GIT Fachz. Lab.* 33 (4), 311-314.
- Urget, R., Weg, G., Kosmeijer-Schuil, T. G., Bovenkamp, P., Hovenier, R. and Katan, M. B. (1995). Levels of cholesterol-elevating diterpenes cafestol and kahewol in various coffee brews. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2167-2172.
- Vaintraub, I. A. and Lapteva, N. A. (1988). Colorimetric determination of phytate in unpurified extracts of seeds and the products of their processing. *Anal. Biochem.* 175 (1), 227-230.
- Vergnes, M. F. and Alary, J. (1986). Determination of natural xanthines by HPLC. *Talanta.* 33 (12), 997-1000.
- Villanova, B. G., Hernández, E. G., Gómez, E. M. and Montilla, J. (1993). Liquid chromatography for the determination of 5-(hydroxymethyl)-2-furfuraldehyde in breakfast cereals. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1254-1255.
- Vioque, E. and Millan, F. (1985). Quantitative determination of chlorogenic and caffeic acids by high-performance liquid chromatography. *Grasas Aceites* (Seville) 36 (85-6), 325-327.
- White, J. W. J. (1979). Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 62 (3), 509-514.
- Williams, M. A., Humphreys, R. C. and Reader, H. P. (1983). The analysis of 5-hydroxymethylfurfural in Port by high performance liquid chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.* 34 (2), 57-60.
- Wong, D. W. S. (1989) in *Química de los alimentos. Mecanismos y teoría*, pp 117-136, Cornell University, Editorial Acribia, S. A., Zaragoza, España.
- Yamada, J. and Tomita, Y. (1996). Antimutagenic activity of caffeic acid and related compounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60 (2), 328-329.
- Yamanaka, N., Oda, O. and Nagao, S. (1997). Prooxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavonoid phenolic acid, on Cu²⁺-induced low density lipoprotein oxidation. *FEBS Lett.* 405 (2), 186-190.
- Yang, Z. J., Ye, J. N., Liu, T. and Fang, Y. Z. (1996). Determination of vitamin C and purine bases in tea by high-performance liquid chromatography. *Sepu* 14 (6), 492-493.

- Yuan, J. P., Guo, S. Y. and Li, L. (1996). Simultaneous determination of sugars and their degradation product 5-hydroxymethylfurfural [5-(hydroxymethyl)-2-furfuraldehyde] in foods and pharmaceuticals. *Fenxi Huaxe* 24 (1), 57-60.
- Zhang, X. M., Chan, C.C., Stamp, D., Minkin, S., Archer, M. C. and Bruce, W. R. (1993). Initiation and promotion of colonic aberrant crypt foci in rats by 5-hydroxymethyl-2-furfuraldehyde in thermilized sucrose. *Carcinogenesis* 14 (4), 773-775.
- Zhao, Y. and Lunte, C. E. (1997). Determination of caffeine and its metabolites by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B* 688 (2), 265-274.



Errata

<u>Página</u>	<u>Linha</u>	<u>Onde se lê</u>	<u>Deve-se ler</u>
iv	9	...bis (2-formylfuran-5-yl) dime-	...5,5'-oxy-dimethylene-bis(2-furalde-
viii	8	thyleher...	hyde)...
85	3		
vii	18	...bis [2-formilfurano-5-il] dime-	...5,5'-oxi-dimetileno-bis(2-furfural-
81	3-4	tiléter...	deído)...
82	19-20		
x		Acrescentar: SFC - "Supercritical-Fluid Chromatography" (Cromatografia em Fluido Supercritico)	
x		Acrescentar: TBAP - "Tetrabutylammonium phosphate" (Fosfato de Tetrabutilamónio)	
12	7	...pequena...	...menor...
12	11	...ácido 5-hidroximetilfuróico...	...ácido 5-hidroximetil-2-furóico...
12	12-13	...N-(hidroximetil-2-furoilglicina).	...N-(5-hidroximetil-2-furoilglicina).
14	6	...guanidina...	...guanina...
14	8	...8-azaguanidina.	...8-azaguanina.
14	13	...ratos jovens...	...ratinhos macho jovens...
16	26	... <i>Salmonella</i> <i>Salmonella typhimurium</i> ...
26	19-21	...o ácido clorogénico mostrou possuir um efeito hepático protector sobre a toxicidade induzida pelo bromobenzeno.	Pretendeu-se estudar o efeito do ácido clorogénico sobre a toxicidade hepática induzida pelo bromobenzeno.
26	27	...benzoilalpireno...	...benzo[a]pireno...
26	30	...radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazil.	...agente de nitroação azoto sexque-óxido.
27	1	...colagénio tipo II...	...colagénio tipo III...
28	Tabela 2	- detecção UV ác. clorogénico e feruilputrescina	- detecção UV 313 nm ác. clorogénico e feruilputrescina
29	Tabela 2	- detecção UV 280 nm	- detecção UV 313 nm
	7		
37	Tabela 3	1991	1990
	7		
37	Tabela 3	<i>Eliminar, porque não é a cafeína que é detectada</i>	
	17-25		
38	Tabela 3	...cmmin ⁻¹	...cm ⁻¹
	34		
39	Tabela 3	- detecção UV 275 nm	- detecção UV 220 nm
	14		
39	Tabela 3	- detecção UV 320 nm	- detecção UV 230 nm
	35		

<u>Página</u>	<u>Linha</u>	<u>Onde se lê</u>	<u>Deve-se ler</u>
43	9	...(Clarke, 1987).	...(Clarke, 1989).
47	14	...(t-BOHH).	...(t-BOOH).
47	18	...1994...	...1995...
48	17	...75891...	...7589...
67	4	...0,115 e 0,251...	...0,115 x 10 ³ e 0,251 x 10 ³ ...
67	Tabela 9		
	3		
67	8-9	...0,350 e 0,263...	...0,350 x 10 ³ e 0,263 x 10 ³ ...
67	Tabela 8		
	3		
74	4	...T _{200°C}T _{210°C} .
74	7	...T _{200°C}T _{180°C} ...
84	25-27	...(1991). Determination of caffeine... <i>An. Bromatol.</i> 42 (2), 241-249.	... (1990). Contribución à la determinación por espectrofotometria ultravioleta del contenido de cafeina en cafés solubles. <i>Alimentaria</i> (211), 23-27
85	<i>Acrescentar:</i> Clarke, R. J. (1989) in <i>Coffee</i> (Clarke, R. J. and Macrae, R. Ed.), Vol.2, pp 73-107, Elsevier Applied Science, New York, USA.		
93	34	...benzoilalpyrene.	...benzo[a]pyrene.