

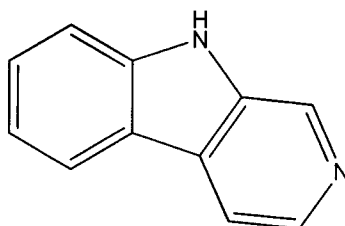
**U. PORTO**



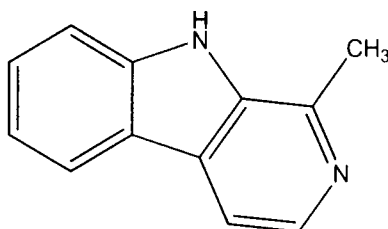
FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

**MESTRADO EM CONTROLO DE QUALIDADE**

**CARACTERIZAÇÃO DO TEOR DE NORARMANA E HARMANA  
EM CAFÉS VERDES E TORRADOS**



**NORARMANA**



**HARMANA**

**Ana Filipa Ramos Gomes**

**Porto, 2006**

**MESTRADO EM CONTROLO DE QUALIDADE**

**CARACTERIZAÇÃO DO TEOR DE NORARMANA E HARMANA  
EM CAFÉS VERDES E TORRADOS**

FACULDADE DE FARMACIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 19/10/2006
Res. 3501
Cota

FFM  
GOM  
3501

**Ana Filipa Ramos Gomes**

**Porto, 2006**

---

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre,  
apresentada à Faculdade de Farmácia  
da Universidade do Porto

---

---

Trabalho realizado no Serviço de Bromatologia da FFUP sob orientação das Professoras Doutoras Beatriz Oliveira e Susana Casal Vicente.

Apoio do Instituto de Bebidas e Saúde (iBeSa), no âmbito das bolsas à Pesquisa e Investigação, época 2004-2005.

---

---

## Resumo

O café é uma das bebidas de maior consumo, caracterizada pelo seu aroma e "flavour". De facto, o café é uma mistura complexa de mais de um milhar de compostos, alguns dos quais de conhecida actividade biológica. As preocupações acerca dos seus potenciais riscos para a saúde têm contribuído para inúmeras publicações científicas, maioritariamente baseadas em estudos epidemiológicos. Contudo, na maioria dos casos, os resultados são contraditórios e pouco conclusivos. Mais recentemente, o consumo de café foi associado com a redução de risco de várias patologias crónicas, nomeadamente a doença de Parkinson. A cafeína, o composto mais estudado no café, não parece ser o principal interveniente. Por outro lado, o possível envolvimento das  $\beta$ -carbolinas, uma classe de compostos neuroactivos, é cada vez mais colocado em questão.

Com base nesta premissa, e enquanto se espera pela confirmação da implicação das  $\beta$ -carbolinas na doença de Parkinson e noutras doenças, o objectivo principal deste trabalho foi determinar a quantidade de  $\beta$ -carbolinas, norarmana e harmana, em 17 amostras de grãos de café arábica (10) e robusta (7), de várias origens geográficas. Uma vez que se sabe que estes compostos aumentam com a temperatura foram não só analisados os cafés verdes, como também três intensidades diferentes de torra em todas as amostras, perfazendo um total de 68 amostras. Os compostos (norarmana e harmana) foram extraídos por extracção em fase sólida (SPE), separados por RP-HPLC-FD e quantificados pelo método do padrão interno.

Resultado das características individuais, nem todos os cafés atingiram o mesmo grau de torra quando submetidos à mesma temperatura. Por isso, realizou-se uma avaliação complementar do grau de torra de cada da amostra, quer por cálculo da "organic roast loss" (ORL) quer por análise fotométrica por IV, para melhor correlacionar com os teores de  $\beta$ -carbolinas obtidos.

Os resultados demonstraram claramente que as  $\beta$ -carbolinas se formam essencialmente durante a torra, aumentando com a temperatura, já que se encontram num teor muito reduzido nos grãos verdes. Os grãos robusta apresentam teores de ambas as  $\beta$ -carbolinas superiores aos arábica, quer nos grãos verdes quer nos torrados. Geralmente obtêm também um grau de torra superior para a mesma temperatura, o que parece estar relacionado com as características da espécie

---

enquanto verde (menor dimensão e menor teor de gordura). No entanto, com o número de amostras analisado, não parece possível uma previsão do grau de torra com base na relação entre os valores de ORL e das duas  $\beta$ -carbolinas, nem o oposto. A formação destes compostos com a torra parece depender não só da razão tempo:temperatura atingida durante o processamento e do grau de torra consequente, mas principalmente das características intrínsecas do próprio grão, que variam com a espécie, a origem geográfica e provavelmente o lote, e que poderão determinar diferentes teores iniciais de precursores e diferentes velocidades de formação e conversão das  $\beta$ -carbolinas.

Os teores médios de norarmana encontrados no café verde foram de 0,03  $\mu\text{g/g}$  para o café arábica e de 0,06  $\mu\text{g/g}$  para o café robusta. A harmana está presente em teores de 0,03  $\mu\text{g/g}$  para o café arábica e de 0,07  $\mu\text{g/g}$  para o café robusta. Nos cafés torrados, verificou-se uma variação do teor de norarmana entre 2,43 e 3,26  $\mu\text{g/g}$  para o café arábica e entre 5,31 e 10,72  $\mu\text{g/g}$  para o café robusta. Relativamente ao teor de harmana, verificou-se uma variação entre 0,83 e 0,44  $\mu\text{g/g}$  para o café arábica e entre 1,57 e 2,34  $\mu\text{g/g}$  para o café robusta. Estes valores colocam o café como provavelmente uma das mais importantes fontes alimentares de ingestão destes compostos.

---

## Abstract

Coffee is one of the most widely consumed beverages, lauded for its aroma and flavour. In fact, coffee is a complex mixture of more than a thousand compounds, some of which with known biological activity. The concerns about its potential health risks have contributed to immeasurable scientific publications, mostly based on epidemiological studies. However, in most cases, the results are contradictory and little conclusive. More recently, the coffee consumption has been associated with the risk reduction of several chronic pathologies, namely Parkinson's disease. Caffeine, the single most studied compound in coffee, does not seem to be the main contributor. On the other hand, the possible involvement of  $\beta$ -carbolines, a class of neuroactive compounds recently reported in coffee, is being increasingly questioned.

Based on this premise, and while waiting for the assurance of  $\beta$ -carbolines implication in the Parkinson's disease and in other diseases, our main objective was to determine the norharman and harman  $\beta$ -carbolines amounts in 17 samples of arabica (10) and robusta (7) coffee beans from several geographical origins. Knowing that these compounds increase with the roasting temperature, besides the unroasted beans three different roasting intensities were also analysed in all samples, performing a total of 68 samples. The compounds (norharman and harman) were extracted by solid phase extraction (SPE), separated by RP-HPLC-FD and quantified by the internal standard method.

As a result of individual characteristics, the coffees roast degree varied when submitted to the same roasting temperature. Therefore, a complementary roast degree evaluation was performed, in all samples, by both "organic roast loss" (ORL) calculation and photometric analysis by IR in order to allow a better correlation with the  $\beta$ -carbolines levels achieved.

The results clearly demonstrate that the  $\beta$ -carbolines are essentially formed during the roasting procedure, increasing with the roasting temperature, since their content in the unroasted beans is reduced. The robusta beans present higher amounts of both  $\beta$ -carbolines than arabica ones, either in unroasted beans or in roasted beans. They usually get also a higher roast degree at the same temperature, what seems to be associated with specie characteristics (smaller size and less fat amount). Nevertheless, based on the number of samples analysed, the relation between the two compounds

---

and the ORL values doesn't seem to allow a prevision of roast degree, nor the opposite. The formation of these compounds with roast seems to depend not only on the time:temperature ratio achieved during processing and consequent roast degree, but mainly on the bean intrinsic characteristics, that vary with the specie, geographic origin and probably lot that ultimately will determinate different initial precursors amounts and different formation and conversion velocities of  $\beta$ -carbolines.

The mean levels for norharman found in unroasted coffee were 0,03  $\mu\text{g/g}$  for arabica coffee and 0,06  $\mu\text{g/g}$  for robusta coffee. Harman is present in amounts of 0,03  $\mu\text{g/g}$  for arabica coffee and 0,07  $\mu\text{g/g}$  for robusta coffee. In roasted coffee, a variation of norharman between 2,43 and 3,26  $\mu\text{g/g}$  was verified in arabica coffee and between 5,31 and 10,72  $\mu\text{g/g}$  in robusta. Concerning the harman amount, it was verified a variation between 0,83 and 0,44  $\mu\text{g/g}$  for arabica coffee and between 1,57 and 2,34  $\mu\text{g/g}$  for robusta coffee. These levels place coffee as probably one of the most important dietary sources to the ingestion of these compounds.

---

## **Trabalhos desenvolvidos no decurso da preparação desta dissertação:**

### **Comunicações científicas**

“Caracterização do teor de norarmana e harmana em cafés verdes e torrados”

Ana F. Gomes, Susana Casal, Beatriz Oliveira

3ª Jornada “Bebidas e Saúde”, Anfiteatro do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 7 de Fevereiro de 2006 (Oral)

“Neuroactive beta-carbolines in coffee beans”

Ana F. Gomes, Susana Casal, Beatriz Oliveira

4º Encontro do Requite, Hotel Cinquentenário - Fátima, 31 de Março e 1 de Abril de 2006 (Poster)

“Presença de beta-carbolinas neuroactivas em grãos de café”

Ana F. Gomes, Susana Casal, Beatriz Oliveira

V Congresso de Nutrição e Alimentação, Hotel Le Meridien-Porto, 25 e 26 de Maio de 2006 (Oral)

“Presença de beta-carbolinas no café”

Ana F. Gomes, Rita Alves, Susana Casal, Beatriz Oliveira

I Encontro Nacional de Bromatologia, Hidrologia e Toxicologia, Sesimbra, 2 e 3 de Junho de 2006 (Poster)

“Neuroactive beta-carbolines in arabica and robusta coffee”

Ana F. Gomes, Susana Casal, Rui Alves, Beatriz Oliveira

21<sup>st</sup> International Conference on Coffee Science – ASIC 2006, Montpellier, 11 a 15 de Setembro de 2006 (Oral)

### **Artigos em preparação**

Neuroactive beta-carbolines in coffee beans: influence of species and roast degree.

---

## Objectivos

Estudos recentes parecem indicar que as  $\beta$ -carbolinas, norarmana e harmana estão implicadas na prevenção de algumas doenças humanas, inclusivamente na doença de Parkinson, uma doença neurodegenerativa que tem vindo a aumentar a sua incidência na sociedade actual.

Visto que a exposição do Homem às  $\beta$ -carbolinas resulta de diversas fontes, entre elas algumas de origem alimentar e que, de acordo com os últimos estudos, o café parece ser de todas as fontes alimentares, aquela que contribui para uma maior ingestão, um dos objectivos deste trabalho foi quantificar as referidas  $\beta$ -carbolinas, norarmana e harmana, em cafés de diferentes espécies (robusta e arábica) e origens geográficas. Sabendo-se que se formam nos alimentos em consequência do processamento térmico, foi também objectivo deste trabalho verificar a influência da temperatura de torra no teor final de norarmana e harmana dos diferentes cafés estudados.

Mais concretamente, pretendeu-se:

- Proceder à torra das diferentes amostras usando três temperaturas de torra (240, 260 e 280°C), durante cerca de 4 min, de forma a avaliar diferentes intensidades de torra (ligeira, média e intensa);
- Adaptar e aplicar a metodologia descrita por Herraiz (2002) para café bebida na determinação do teor de norarmana e harmana nas amostras de café verde e torrado em grão, com a respectiva revalidação do protocolo extractivo;
- Determinar o grau de torra das amostras com base na ORL, após avaliação do teor de humidade, e por fotometria de IV;
- Tratar estatisticamente os dados, relacionando o teor das  $\beta$ -carbolinas com a espécie, origem geográfica, temperatura de torra e grau de torra.

---

## Agradecimentos

Durante o desenvolvimento deste meu trabalho de investigação, realizado no laboratório de Bromatologia da FFUP, foram várias as pessoas que conheci, que colaboraram no meu trabalho, com que convivi e algumas tornaram-se mesmo minhas amigas. Todas essas pessoas contribuíram do seu modo para o meu bom desempenho, no entanto, não posso deixar de destacar algumas e prestar-lhes o meu mais profundo agradecimento, pois sem elas este trabalho não poderia ter sido realizado.

Agradeço:

- À Prof. Beatriz Oliveira, responsável do Serviço de Bromatologia e minha orientadora, por me ter disponibilizado todas as condições necessárias à realização da minha investigação e pelo apoio académico e pessoal constante;
- À Prof. Susana Casal, também responsável pela orientação deste trabalho, pela dedicação e empenho que sempre teve em me ajudar a resolver os inúmeros problemas que surgiram;
- Ao Prof. Rui Alves, docente do Instituto Politécnico de Viana, pelo grande auxílio no tratamento estatístico dos resultados analíticos;
- Ao iBeSa pela bolsa de investigação concedida e em especial ao Eng. Machado Cruz, responsável do mesmo instituto, pela colaboração no fornecimento das amostras de estudo e pelos preciosos contactos fornecidos;
- Ao Eng. Isménio Azevedo, consultor da Unicer, pela possibilidade que me deu em entrar em algumas instituições e ter acesso a alguns equipamentos especiais (torrador e moinho de café verde);
- A toda a equipa do Bogani Café do Cais de Gaia e em especial à menina Anabela Pinto, pela simpatia com que me receberam e pela orientação que me deram na utilização do torrador de café;
- À Sanzala, especialmente à Dr<sup>a</sup> Susana Neto, pela permissão de utilização do seu moinho de café verde;
- À Bicafé, na pessoa da Eng<sup>a</sup> Graça Pontífice, pela cedência de utilização do fotómetro de infravermelhos (IV) para café torrado;

- 
- A toda a equipa do Serviço de Bromatologia, e também aos alunos que no mesmo laboratório conheci e com quem convivi durante este período, dentro dos quais gostaria de destacar: Lúcia Santos, Lúcia Maia, Cristina Soares, Sara Cunha, Mayra Silva e Alexandra Soares.

E porque os últimos são os primeiros, não posso também deixar de agradecer aos meus pais, à minha irmã e ao meu namorado Renato, por todo o apoio que me deram para seguir em frente neste desafio e pela compreensão que tiveram em todos aqueles momentos em que preteri do convívio com eles em função do meu mestrado.

---

### **“Mezinhas do café”**

*Voz do povo não se deve calar  
Diz a sabedoria secular:  
O café, “in natura”, ou infusão,  
Serve para curar dores, lesão.  
Muita vez, não precisa de farmácia  
O bom apreciador da rubiácea.  
Em verdade, café e preconceito  
Estão longe de ser um par perfeito.  
Café faz conviver na mesma tenda  
A ciência oficial unida à lenda.  
A pesquisa científica comprova  
O que já foi contado em prosa e trova.  
Para minorar mau gosto da azia  
Vamos lembrar o que vovó fazia:  
Mascava dois grãosinhos de café  
E o mesmo também faz vovô Mané.  
E o menino, com corte que sangrava.  
Sabia que a vovó do Pedro Nava  
la café em pó por na ferida?  
Sangramento estancava em seguida.  
Dor de ouvido? Bastava uma gotinha  
Lá dentro e acabava a dorzinha.*

*Dor de cabeça que não pára nunca?  
Folhinhas de café postas na nuca.  
Café com mel, na tosse renitente,  
Minora o mal, mesmo o mais  
resistente.  
Quase queríamos passar adiante,  
Mas café também vale por purgante,  
Usado, à vezes, como laxativo  
Unido a óleo de rícino activo.  
Não falemos do café acachaçado:  
Há coisa melhor para resfriado.  
E outro valor mais alto se alevanta:  
Café é bom parceiro da garganta.  
Consta que alguns tenores e sopranos  
Mantiveram a voz em altos planos  
Com esta receita singular:  
Café com manteiga faz solfejar.  
Tomar café sem açúcar aplaca  
O mal-estar causado por ressaca.  
Curandeiro? Ninguém lhe faz favor  
Ao chamar o café de Senhor Doutor!*

**Edison Nequete e Mané do Café**

---

# Índice

RESUMO.....	I
ABSTRACT .....	III
TRABALHOS DESENVOLVIDOS NO DECURSO DA PREPARAÇÃO DESTA DISSERTAÇÃO:.....	V
OBJECTIVOS .....	VI
AGRADECIMENTOS.....	VII
ÍNDICE.....	X
ABREVIATURAS.....	XII
<b>PARTE TEÓRICA.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
A. O CAFÉ.....	3
1. CLASSIFICAÇÃO E ORIGEM .....	3
2. TECNOLOGIA DO CAFÉ .....	4
3. TORRA.....	6
B. AS B-CARBOLINAS, NORARMANA E HARMANA .....	11
1. FONTES.....	11
2. ESTRUTURA QUÍMICA E FORMAÇÃO .....	13
3. EFEITOS FISIOLÓGICOS .....	15
3.1. HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	15
3.2. DIABETES.....	15
3.3. CANCRO E SIDA .....	16
3.4. PARASIToses.....	20
3.5. DOENÇAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC) .....	20
3.5.1. ACÇÃO TRANQUILIZANTE E ANTI-DEPRESSIVA .....	20
3.5.2. DOENÇAS DE ADIÇÃO .....	21
3.5.3. DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS:.....	22
DOENÇA DE PARKINSON (PREVENÇÃO E PROMOÇÃO).....	22
4. METODOLOGIAS ANALÍTICAS DESCRITAS NA AVALIAÇÃO DAS B-CARBOLINAS, NORARMANA E HARMANA, EM PRODUTOS VEGETAIS .....	26
<b>PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>28</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
1. REAGENTES E PADRÕES .....	29
2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	31
3. AMOSTRAS.....	32
4. METODOLOGIAS ANALÍTICAS.....	33
4.1. ANÁLISE DAS B-CARBOLINAS .....	33
4.1.1. EXTRACÇÃO .....	35
4.1.2. SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA .....	36
4.2. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE TORRA DAS AMOSTRAS.....	37
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
1. OPTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA DE QUANTIFICAÇÃO DAS B-CARBOLINAS .....	39
1.1. OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRACÇÃO .....	39
1.2. OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	43
1.3. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO .....	44

---

2. REVALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA DAS B-CARBOLINAS .....	46
2.1. LINEARIDADE E FAIXA LINEAR DINÂMICA OU DE APLICAÇÃO .....	46
2.2. PRECISÃO .....	48
2.3. EXACTIDÃO .....	49
2.4. LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO .....	49
3. CARACTERIZAÇÃO DO GRAU DE TORRA DAS AMOSTRAS .....	50
4. QUANTIFICAÇÃO DE NORARMANA E HARMANA NAS AMOSTRAS.....	53
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>85</b>

---

## Abreviaturas

AAH's	aminas aromáticas heterocíclicas
ADN	ácido desoxirribonucleico
AFB <sub>1</sub>	aflatoxina B <sub>1</sub>
AH's	aminas heterocíclicas
APNH	aminofenilnorarmana
BP	benzo[a]pireno
BZ	benzodiazepina
C.	género <i>Coffea</i>
C18	octadecilo
CE	"capillary electrophoresis" (electroforese capilar)
CZE	"capillary zone electrophoresis" (electroforese capilar de zona)
CO	monóxido de carbono
CV	coeficiente de variação
CYP ou P450	citocromo P450
DA	dopamina
ESI	"electrospray ionization"
FD	"fluorescence detection" (detecção por fluorescência)
GABA <sub>A</sub>	ácido $\gamma$ -aminobutírico tipo A
Glu-P-1	2-amino-6-metildipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol
GTP	guanosina trifosfato
HPLC	"high performance liquid chromatography" (cromatografia líquida de alta resolução)
5-HTP	5-hidroxitriptamina
iBeSa	Instituto de Bebidas e Saúde
IBS	"imidazoline binding sites" (receptores da imidazolina I <sub>1</sub> , I <sub>2</sub> ou I <sub>3</sub> )
ISO	International Standard Organization
IC <sub>50</sub>	"50% of maximal inhibitory concentration" (50% da concentração máxima inibitória)
IV	infravermelho
LC	"liquid chromatography" (cromatografia líquida)
MAO	monoaminaoxidase

---

MEKC	“micellar electrokinetic chromatography”
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
MPP <sup>+</sup>	catião 1-metil-4-fenil-tetraidropiridínio
MS	“mass spectrometry” (espectrometria de massa)
NO	óxido nítrico
ODS	octadecilsililo
ODSA	ácido octadecilsilílico
ORL	“organic roast loss” (perda de massa orgânica com a torra)
p.a.	pro-análise
PRS	“propylsulphonic acid silica” (sílica derivarizada com ácido propilsulfónico)
ROS	“reactive oxygen species” (espécies reativas de oxigénio)
RP	“reversed phase” (fase reversa)
SAM	S-adenosil-L-metionina
SCAA	Specialty Coffee Association of America
SCX	“strong cationic exchange” (troca catiónica forte)
SD	“standard deviation” (desvio padrão)
SIDA	síndrome de imunodeficiência adquirida
SIM	“single ion monitoring”
SNC	sistema nervoso central
SPE	extracção em fase sólida
TD	transducina
TH $\beta$ C's	“tetrahydro- $\beta$ -carbolines” (tetraidro- $\beta$ -carbolinas)
TH $\beta$ CA's	“tetrahydro- $\beta$ -carboline-carboxylic acids” (ácidos carboxílicos das tetraidro- $\beta$ -carbolinas)
THP1	“Human acute monocytic leukemia cell line” (linha celular humana de leucemia monocítica aguda)
Topo I	topoisomerase do ADN I
TR	tempo de retenção
UV-DAD	“ultraviolet photodiode array detection” (detecção por ultravioleta emitida por conjunto ordenado de fotodíodos)
VIH	vírus de imunodeficiência humana

---

---

## ***PARTE TEÓRICA***

## Introdução

O café é uma das bebidas mais populares do mundo, o que se deve essencialmente aos prazeres sensoriais experimentados durante o seu consumo. Estes estão intimamente ligados com a sua composição complexa, dependente não só da espécie e origem geográfica do café, mas também de toda a sua cadeia produtiva (desde a colheita da baga à extracção do café bebida) (Gray, 1998).

O consumo de café tem, contudo, suscitado um constante debate acerca dos possíveis riscos e/ou efeitos benéficos para a saúde dos consumidores, tendo sido alvo de numerosos estudos. A maior parte dos efeitos adversos descritos permanece por esclarecer. Em oposição, parecem surgir cada vez mais evidências de efeitos protectores do café bebida relativamente a várias doenças da actualidade, caso das doenças cardiovasculares, diabetes, cancro, doenças neurodegenerativas, entre outras. No entanto, pouco se conhece dos constituintes do café e dos mecanismos de acção que poderão estar implicados nestes efeitos (Gray, 1998; Corrao *et al.*, 2001; Ranheim & Halvorsen, 2005).

A associação entre consumo de café e certas doenças neurodegenerativas, nomeadamente a doença de Parkinson, está a ser actualmente alvo de diversos estudos. Estes apontam para um possível efeito neuroprotector de alguns dos compostos presentes no café, nomeadamente de duas  $\beta$ -carbolicinas - norarmana e harmana. Estas foram detectadas, muito recentemente, em quantidades elevadas no café torrado, mas são também frequentemente descritas noutras espécies vegetais em quantidades mais reduzidas, associadas a efeitos neuroprotectores, inclusivé à prevenção de doença de Parkinson. Estes compostos poderão vir a ser parcialmente responsabilizados por tal efeito (Gray, 1998; Herraiz, 2002; Martyn & Gale, 2003). O teor de norarmana e harmana parece aumentar nas matrizes sujeitas a processamento térmico, sendo, por isso, de esperar teores mais elevados nos cafés torrados comparativamente com os verdes. Estes aumentos parecem também ser condicionados pela temperatura de torra (Herraiz, 2002; Pfau & Skog, 2004).

## A. O Café

### 1. Classificação e Origem

O café é a semente do fruto do cafeeiro, uma árvore ou arbusto que pode atingir uma altura de 2,5-4,5 m (arábica) ou de 4,5-6,5 m (robusta), dependendo da espécie e das condições de cultivo. Taxonomicamente, o café pertence ao género *Coffea*, que, por sua vez, pertence à família *Rubiaceae*. De 70 espécies descritas, somente 3 são cultivadas para fins comerciais, em vários países tropicais e subtropicais: *C. arabica* Lineu, *C. liberica* e *C. canephora* Pierre (Illy & Viani, 1995a; Vincze & Vatai, 2004). Destas 3 espécies apenas 2, *C. arabica* L. var. *typica* e *C. canephora* Pierre var. *robusta*, são economicamente importantes, sendo, por isso, as mais cultivadas e comercializadas internacionalmente (Charrier & Berthaud, 1985; Illy & Viani, 1995a). Comercialmente estas duas espécies são conhecidas simplesmente por café arábica e robusta. Os países da América Central e do Sul produzem principalmente café arábica, enquanto que os países africanos e do sudoeste asiático são os maiores produtores de café robusta. O Brasil, o maior produtor de arábica, tornou-se na década de 90 também o segundo maior produtor de robusta, a seguir à Indonésia (Illy & Viani, 1995a).

A espécie arábica resulta do cruzamento entre duas espécies selvagens de café, seguido de uma duplicação cromossômica espontânea. É uma espécie com características únicas dentro do género *Coffea*, já que é a única alotetraplóide e autogâmica, enquanto que as outras são diplóides e heterogâmicas. A autogamia permite a esta espécie manter mutações recessivas no interior da população. Esta característica tornou possível seleccionar as linhas genéticas mais interessantes, em termos agronómicos, bioquímicos e organolépticos, o que explica a sua posição como a mais valiosa das espécies cultivadas (Illy & Viani, 1995a).

O café bebida é obtido de grãos de *C. arabica typica* ou *C. canephora robusta* torrados ou mais frequentemente de misturas das duas espécies em proporções variadas. Dado o maior valor comercial do café arábica, as misturas mais ricas nesta espécie são conseqüentemente mais caras (Zambonin *et al.*, 2005).

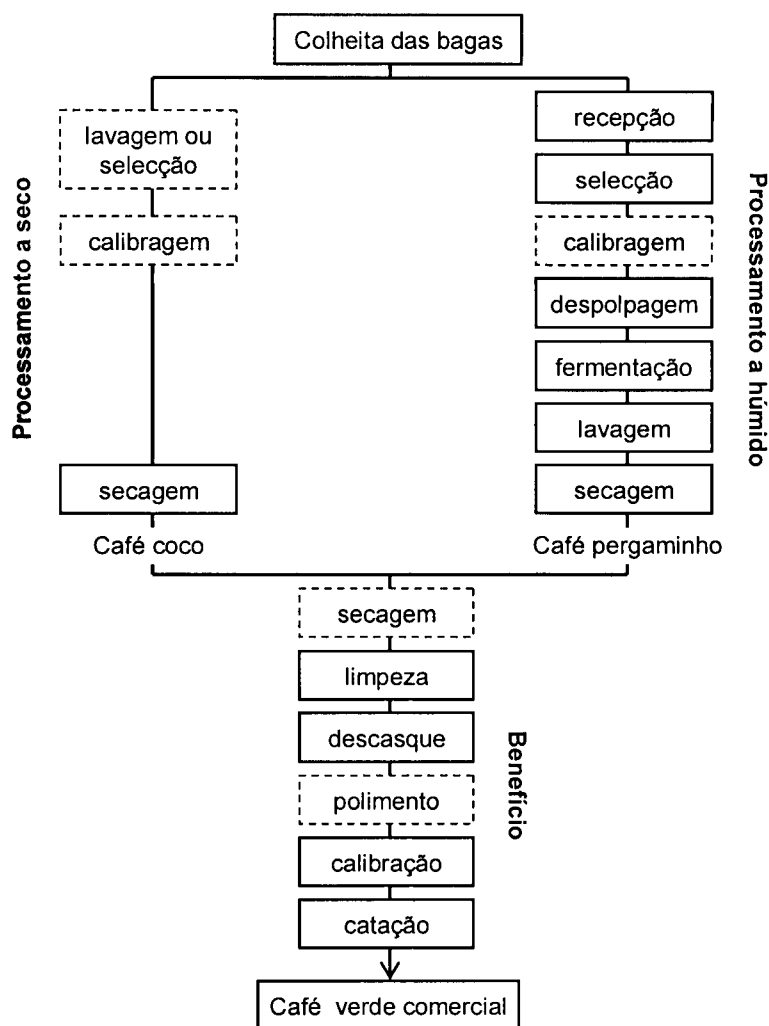
## 2. Tecnologia do café

“Tecnologia do café” é a designação vulgarmente utilizada para um conjunto de operações, mais ou menos complexas, levadas a cabo nos países produtores e que, no essencial, visam a obtenção do café verde comercial (Correia, 1995a; Casal, 2004). O café verde é, tal como definido na ISO 3509 (1989): “o termo comercial para a semente seca do cafeeiro”.

Embora, ao longo dos anos, cada país ou região tenha desenvolvido e aperfeiçoado o seu processo, a verdade é que todos os parâmetros em jogo se podem resumir a duas vias alternativas: a seca e a húmida (Correia, 1995a). O processamento pela via seca é usado geralmente no café robusta e o processamento pela via húmida nos arábica, havendo algumas excepções (Vincent, 1987; Correia, 1995a). Em qualquer dos casos a colheita é a primeira operação a executar, sendo necessário que, para isso, as bagas amadureçam na planta, ou seja, adquiram uma cor vermelha lustrosa. A colheita poderá ocorrer de duas formas. Uma delas é a colheita manual ou mecânica de todas as bagas, sendo efectuada numa só passagem pela plantação. Obtém-se assim bagas em diversos estados de maturação que serão posteriormente processadas a seco. O outro método, só praticado quando se utiliza o processamento a húmido, é a colheita manual selectiva, em que apenas são colhidas as bagas maduras, obrigando a diversas passagens intervaladas pela plantação (Correia, 1995a). As fases do processamento do café que se seguem à colheita são efectuadas ainda nos locais de produção do café e visam o transporte e a conservação do café verde.

Os factores que determinam o tipo de processamento a utilizar são, essencialmente, de ordem cultural (do país) ou económica (Illy & Viani, 1995b; Correia, 1995a).

Na figura 1 apresentam-se, de forma esquemática, os dois tipos de processamento referidos anteriormente, especificando-se as diferentes etapas que os compõem.



**Figura 1:** Vias de processamento do café verde

(Casal, 2004)

Quando chega aos países importadores, o café verde comercial ainda não está pronto a consumir. Tem de sofrer ainda outros tipos de processamentos – a descafeinação (etapa facultativa), a torra e a moagem.

### 3. Torra

A torra não é realizada nos países produtores, pelo facto do café depois de torrado perder rapidamente a qualidade, perda essa que ainda é mais acentuada se for moído. É, por isso, aconselhável que a importação se faça na forma de café verde e daí a justificação para que a indústria de torra de café se tenha instalado e desenvolvido fundamentalmente nos países importadores, que são os grandes consumidores.

A torra do café consiste em submeter as sementes do café a altas temperaturas (pirólise), durante um certo intervalo de tempo (Correia, 1995b). As condições em que ocorre (período de tempo, temperatura, pressão, injeção de água, etc.) devem ser controladas de forma rigorosa, pois influenciam fortemente as características do produto torrado (Clarke, 1987).

O tipo de torra de um café pode variar muito de país para país, de acordo com as preferências regionais, e dentro do próprio país, com o tipo de café a torrar, com o tipo de torrador e por vezes num mesmo torrador. Para caracterizar o tipo de torra de cada café, quanto à intensidade, são usualmente utilizados os termos “torra ligeira” (leve ou suave), “torra média” (moderada) e “torra intensa” (alta ou forte). Podem ainda ser consideradas as “torra muito ligeira” e “torra muito intensa”.

A torra de um café pode também ser caracterizada quanto ao grau, estando este directamente associado com a cor do grão torrado, em condições de torra normais. Na maioria das vezes, na indústria, o grau de torra é monitorizado de uma forma empírica, seguindo a experiência do operador de torra, através de colheita por sonda de amostras de café da câmara de torra e sua análise visual (Correia, 1995b; De Barros Melo, 2004). O exame visual durante a torra é realmente uma das formas de determinar em que ponto do processo a torra do café se encontra, mas que por si só apresenta algumas limitações. Quando complementado por alguns sinais audíveis (primeiro e segundo estalidos) e pelo desenvolvimento dos característicos aromas da torra, é bastante mais informativo.

No entanto, há que ter alguma cautela na determinação do grau de torra, pois alguns cafés são excepções à regra. Os cafés de Sumatra muitas vezes parecem que ter atingido o grau de torra cidade, correspondente a uma torra ligeira, quando de facto estão no segundo estalido da torra, fase que ocorre um pouco antes. Por outro lado, há ocasionalmente cafés que ultrapassam o grau de torra previsto, ou

seja, que parecem mais escuros do que realmente são, como é o caso de alguns cafés do Quénia e de Santa Helena (e alguns autores referem também os cafés do Brasil processados a seco). Os cafés processados a seco não torram com uma cor constante, sendo difícil estipular a cor média a obter para se determinar o grau de torra (Sweet Maria's Coffee, Inc., 2006).

O controlo da torra é determinante para a manutenção da qualidade e homogeneidade dos diferentes lotes de café ao longo do tempo, de forma a satisfazer o consumidor. Torna-se, então, necessário um grande rigor neste processo. Infelizmente não há uma maneira directa de monitorizar a torra, a não ser pelo termómetro do torrador que indica a temperatura da massa de grão durante o processo. Por isso, a *Specialty Coffee Association of America* (SCAA) e a empresa norte-americana Agtron criaram padrões, aceites internacionalmente, para a monitorização indirecta, fora do torrador, do grau de torra. O método baseia-se na quantificação da absorção de luz infravermelha pelo grão de café ou pelo café moído, utilizando uma escala de 0 a 100, dividida em intervalos de 10 valores, chamados número Agtron. Cada número Agtron corresponde a um intervalo de temperatura do grão; quanto mais alto for o grau de torra menor será esse número. Existem ainda outras escalas/padrões e equipamentos, mas esta é actualmente a mais popular. A Agtron também desenvolveu um fotómetro de infravermelhos (IV) específico para a determinação do grau de torra e criou 8 discos cobertos por tintas coloridas conforme os padrões definidos na escala. A SCAA, por sua vez, universalizou o controlo da torra através de comparações visuais usando quer esses discos coloridos quer a espectroscopia no infravermelho próximo. Actualmente existem já dispositivos electrónicos equivalentes (Correia, 1995b; De Barros Melo, 2004).

Outra forma de caracterizar o grau de torra consiste na avaliação da perda de massa orgânica durante a torra (ORL) (Clifford, 1985; Clarke, 1987; Correia, 1995b). Este método, sendo mais moroso, pois implica o conhecimento da humidade dos grãos verdes e torrados, fornece valores mais próximos da realidade, porque não está dependente das condições do equipamento de torra, nem do tempo de torra, parâmetro também utilizado por alguns autores. Embora seja inviável a utilização da ORL na indústria, este é o único método que permite comparar efectivamente duas torras em situações distintas, sendo o mais referenciado na literatura científica (Stennert & Maier, 1994).

Com base na percentagem de ORL são mais ou menos considerados os seguintes graus ou estilos de torra, com ligeiras variações entre autores: canela (13%), cidade ligeira (14%), cidade (15%), cidade total (15,5%), brasileira (16%), vienense (17%), francesa (18%), gelo (19%) e italiana (20%) (Spiller, 1998; Thorn, 1998). As torras são consideradas ligeiras quando apresentam ORL's iguais ou inferiores a 16%, médias quando os valores variam entre 16 e 17% e intensas para valores superiores a 17%, sendo que para valores de ORL superiores a 20% os grãos se encontram praticamente carbonizados (Spiller, 1998; Thorn, 1998). Nos EUA, por exemplo, os consumidores preferem café de torra ligeira, sendo consumido maioritariamente como café de filtro. Já nos países mediterrânicos, caracterizados pelo consumo predominantemente de café expresso, é imprescindível a utilização de um café com uma torra intensa ou muito intensa. Esta torra é caracterizada por uma exsudação de gordura para a camada exterior do grão, que confere à bebida características organolépticas (aroma, *flavour*) e físico-químicas (corpo, espuma) típicas num expresso. As torras ligeiras são consideradas mais apropriadas para os cafés de sabor delicado (Gonçalves, 2002).

Independentemente do já referido, os cafés arábica são normalmente torrados de uma forma mais ligeira, para se obter o máximo de desenvolvimento do seu aroma. Alguns arábicas tornam-se mesmo mais amargos quando são torrados a uma temperatura considerada demasiado elevada. Os robustas, especialmente os processados por via seca, são torrados de forma mais intensa, com o intuito de disfarçar o seu gosto terroso (Spiller, 1998). Convém referir, no entanto, que para as mesmas condições de torra, o café robusta fica mais torrado que o arábica devido às características do grão.

No que diz respeito à escolha da intensidade de torra mais adequada para o café de cada origem geográfica, sabe-se, por exemplo, que seria um desperdício torrar grãos etíopes, *Yauco*, *Selecto* ou *Kona* de forma intensa, pois perderiam as suas características individuais e sabor clássico, que os torna tão apreciados. Existem, no entanto, grãos de café que ganharão algo novo e interessante, em termos sensoriais, se forem submetidos a uma torra intensa; é o caso dos cafés mexicanos, que se tornam agradavelmente doces; os grãos *Antigua* guatemaltecos, que retêm a sua acidez e sabor frutado; os grãos Sumatra que perdem a sua acidez, mas que aumentam a tendência do café bebida para adquirir um "encorpamento" melado (Thorn, 1998).

Praticam-se, actualmente, de acordo com o processo de transferência de calor, três processos de torra: torra por condução/conductiva, torra por irradiação/radiante e torra por convecção/convectiva. Apesar de geralmente predominar apenas um dos tipos de torra em cada torrador, todos os restantes tipos podem coexistir em menor extensão (Illy & Viani, 1995b). Na torra por condução, os grãos de café contactam directamente com as superfícies metálicas aquecidas do torrador, sendo torrados da superfície para o interior (Illy & Viani, 1995b; Nebesny & Budryn, 2006). Na torra por irradiação, é utilizada uma fonte de radiação (infravermelhos, microondas, etc) para aquecimento das superfícies do torrador (Illy & Viani, 1995b). A torra por infravermelhos permite um aquecimento mais uniforme de todo o grão, levando a uma maior retenção de compostos aromáticos, embora não tenha ainda aplicação industrial (Casal, 2004). Na torra com microondas, o aquecimento efectua-se do interior para a superfície do grão (Nebesny & Budryn, 2006). Na torra por convecção, os grãos de café são torrados pelo contacto com gás de combustão/ar quente que circula em fluxo laminar ou turbulento (leito fluido), usualmente numa atmosfera com ar em excesso. A torra dá-se no sentido da superfície externa para o centro do grão. Neste tipo de processo, a temperatura externa atingida pelo grão é superior à obtida por radiação, sendo também mais elevada a degradação de alguns compostos, como os ácidos carboxílicos de 5-hidroxitriptamidas (Illy & Viani, 1995b; Nebesny & Budryn, 2002).

No início do século XX utilizava-se essencialmente a torra por condução. Com o decorrer dos anos, a torra por convecção aumentou progressivamente, com o consequente declínio da condução como processo de torra (Schwartzberg, 2002).

Nos sistemas tradicionais de torra por convecção, usualmente sistemas de rotação horizontal, as temperaturas da torra situam-se entre os 180°C e os 230°C, para tempos de torra de 12 a 15 minutos. Com os novos modelos de torradores de leito fluido, as temperaturas utilizadas aumentaram e o tempo de torra foi reduzido até cerca de 90 segundos. No entanto, tendo em conta o volume de café laborado e o grande investimento que este tipo de equipamentos implica, ainda se recorre aos sistemas clássicos na maioria dos países importadores.

Independentemente do processo escolhido, a torra pode ser dividida em três fases fundamentais:

- Na primeira fase, procede-se ao aquecimento dos grãos. Iniciam-se a perda de água livre, com uma conseqüente perda ligeira de massa, e as reacções de acastanhamento;
- Na segunda fase, acentua-se a desidratação, com a inerente perda de massa; dá-se o aumento de volume e iniciam-se as reacções pirolíticas exotérmicas, caso do escurecimento dos grãos e da formação de compostos aromáticos;
- Na terceira fase, acentuam-se as transformações físicas e químicas, à excepção da perda de água que, nesta fase, já deve ter atingido o teor mínimo; finaliza-se a torra com o arrefecimento dos grãos com ar ou água (Correia, 1995b; Dorfner *et al.*, 2004; Casal, 2004).

Comparativamente com o café torrado, o café verde não tem um sabor ou aroma agradável. O seu odor pode ser descrito como herbáceo (a feno) e terroso e o extracto obtido depois da sua moagem não tem o aroma característico do café. Contudo, possui a textura adequada e contém os ingredientes necessários para mais tarde, com o processo de torra, desenvolver as características ideais. Durante este processo térmico drástico, os grãos de café sofrem várias reacções físicas e químicas, que se reflectem, não só no aroma, mas também noutras alterações facilmente visualizáveis como a cor, a textura, a densidade e o tamanho (Dorfner *et al.*, 2004; Casal *et al.*, 2005).

A formação das  $\beta$ -carbolinas, norarmana e harmana, entre centenas ou mesmo milhares de compostos, é, na sua maior parte, o resultado de reacções químicas que ocorrem na torra do café e o seu teor vai estar muito provavelmente dependente de todos os factores intrínsecos à torra, como tempo, temperatura e processo de torra utilizados. Contudo, o teor daqueles compostos e seus precursores na matéria-prima também deverá ter alguma influência no teor final. Com este trabalho, conforme referido nos objectivos, pretende-se clarificar algumas das influências citadas, usando para isso amostras de diferentes origens geográficas e submetidas a diferentes temperaturas de torra.

## B. As $\beta$ -carbolinas, norarmana e harmana

### 1. Fontes

As  $\beta$ -carbolinas, norarmana e harmana, são simultaneamente alcalóides naturais (amplamente difundidos na natureza, especialmente no reino vegetal) e aminas aromáticas heterocíclicas (AAH's) (resultantes da pirólise de produtos vegetais ou animais).

As  $\beta$ -carbolinas são também conhecidas como alcalóides da harmala, visto terem sido isoladas e identificadas pela primeira vez na *Peganum harmala* L. (Zygophillaceae). Trata-se de uma planta medicinal, utilizada desde há muito pelas tribos amazónicas, na forma de bebida, inalável ou outra, pelas suas propriedades alucinogénicas. Esta família de alcalóides foi, assim, inicialmente muito estudada na área da psicofarmacologia, tendo o efeito psicotrópico sido atribuído a um dos seus derivados substituídos, a harmina (Picada *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 2000; Farzin & Mansouri, 2005). Outras espécies de plantas medicinais em que se pode encontrar este grupo de alcalóides indólicos e alguns outros, em teores bastante elevados, são: *Passiflora incarnata* L. (Passifloraceae) vulgo flor de maracujá, *Banisteriopsis* spp. e *Tetrapteris* spp. (Malpighiaceae), *Virola* spp. (Myristicaceae) e *Anadenanthera* spp. (Leguminosae) (Picada *et al.*, 1997; Soulimani *et al.*, 1997).

A norarmana e a harmana são também encontradas em plantas edíveis e seus produtos (trigo, arroz, milho, cevada, aveia, soja, cogumelos, uvas, ananás, banana, caju, amêndoa, noz, ...) e em bebidas derivadas, inclusivé alcoólicas (vinho, cerveja, whisky, brandy, ...), embora sempre em quantidades reduzidas, geralmente inferiores a 10 ng por grama de peso seco de planta ou por mililitro de bebida (Tsuchiya *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2004).

Desde a década de 70 que se fala na sua presença também em alimentos proteicos confeccionados, como peixe (0-200 ng/g de norarmana e 0-130 ng/g de harmana) e carne (0-30 ng/g de norarmana e 0-20 ng/g de harmana), concomitantemente com outras AAH's. Mais recentemente foram ainda detectadas em lençóis de água freáticos, em resíduos industriais, no fumo de cigarro, no café torrado, bem como no café bebida dele extraído (Gearhart *et al.*, 1997; Stawowy *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2000; Collins & Neafsey, 2002; Herraiz, 2000 e 2002;

Spijkerman *et al.*, 2002; Östergren *et al.*, 2004; Bonnet *et al.*, 2004; Farzin & Mansouri, 2005).

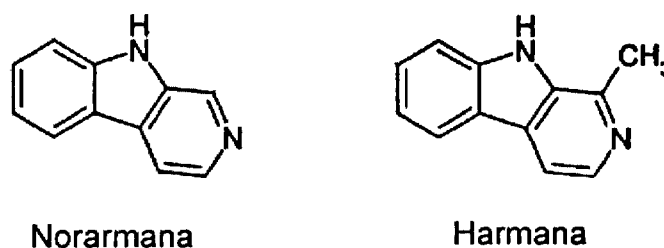
O Homem está, assim, continuamente exposto a estas  $\beta$ -carbolinas através das diversas fontes, com diferentes contribuições de cada uma delas para o total dessa exposição. Na generalidade, as fontes referidas contribuem com quantidades na ordem dos 4  $\mu\text{g}$  de norarmana/kg/dia e 1  $\mu\text{g}$  de harmana/kg/dia. O fumo do tabaco foi identificado como a maior fonte para o organismo humano, com valores de norarmana até 9  $\mu\text{g}$ /cigarro e de harmana até 3  $\mu\text{g}$ /cigarro. No café bebida foram detectados teores, até cerca de 165 ng/ml e 40 ng/ml para a norarmana e harmana, respectivamente, dependendo do tipo de extracção (Stawowy *et al.*, 1999; Herraiz, 2002; Pfau & Skog, 2004). Este facto coloca esta bebida como uma importante fonte de ingestão adicional destes compostos.

A norarmana e a harmana existem também como constituintes normais do organismo humano e dos outros mamíferos, resultado de síntese endógena, e acumulam-se em tecidos e fluidos corporais como o cérebro, o líquido cefalorraquidiano, o plasma, as plaquetas, o leite, a urina, o fígado, os rins e o globo ocular (Baum *et al.*, 1996; Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1997; Gearhart *et al.*, 1997; Boeira *et al.*, 2002; Collins, 2002). Esta síntese endógena parece contribuir com cerca de 50-100 ng/kg de peso/dia de norarmana e 20 ng/kg de peso/dia de harmana (Stawowy *et al.*, 1999; Herraiz, 2002; Pfau & Skog, 2004).

## 2. Estrutura Química e Formação

As  $\beta$ -carbolinas são aminas azo-heterocíclicas que fazem parte do grupo das AAH's. São aminas secundárias, ao contrário das restantes AAH's, que são primárias, o que lhes confere diferentes propriedades físico-químicas e fisiológicas.

As AAH's são geralmente divididas em dois grupos: aminas pirolíticas ou amino-imidazo-azoarenos (imidazo-quinolinas, imidazo-quinoxalinas e imidazo-piridinas) com características polares e aminocarbolinas (pirido-indóis e pirido-imidazóis) com características apolares (Fay *et al.*, 1997; Skog & Solyakov, 2002; Cárdenes *et al.*, 2004; Casal, 2004). As aminocarbolinas, grupo ao qual pertencem as  $\beta$ -carbolinas e onde se inserem por isso os compostos em estudo - norarmana e harmana (figura 2) -, para além da sua existência natural como alcalóides indólicos, podem ser produzidas pela pirólise de aminoácidos e proteínas. As aminocarbolinas piridoindólicas (piridoindóis), como a norarmana e a harmana, são formadas por aquecimento do triptofano, enquanto que as piridoimidazólicas (piridoimidazóis) resultam do aquecimento do ácido glutâmico (Chen & Chiu, 1998; Skog & Solyakov, 2002).

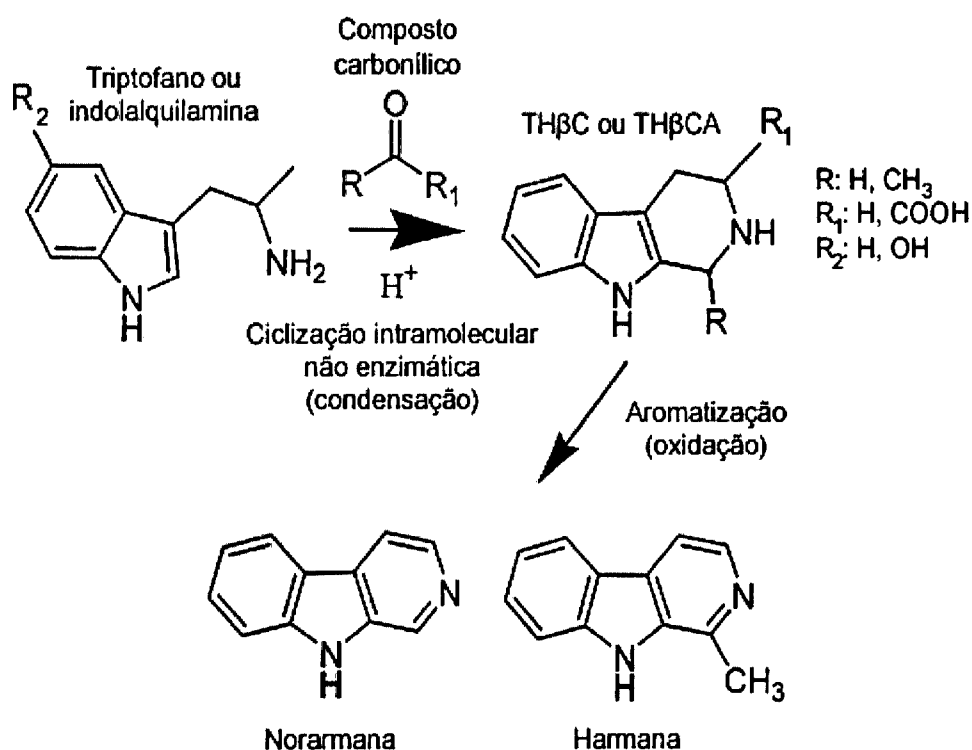


**Figura 2:** Estrutura química das  $\beta$ -carbolinas em estudo  
(Di Giorgio *et al.*, 2004)

As  $\beta$ -carbolinas que estão presentes no tabaco e em alimentos proteicos confeccionados parecem muito provavelmente ser formadas por pirólise do triptofano ou suas indolalquilaminas, como a triptamina e a 5-hidroxitriptamina (5-HTP), também designada serotonina (Rommelspacher *et al.*, 1991; Gearhart *et al.*, 1997; Picada *et al.*, 1997; Stawowy *et al.*, 1999; Uezono *et al.*, 2001; Herraiz, 2002; Spijkerman *et al.*, 2002; Bonnet *et al.*, 2004; Cárdenes *et al.*, 2004; Östergren *et al.*, 2004; Farzin & Mansouri, 2005). A formação destes compostos durante o aquecimento de alimentos tem sido estudada simultaneamente com outras AAH's e

ao que tudo indica é, tal como este grupo, condicionada pela temperatura e tempo utilizados no processo (Fay *et al.*, 1997; Totsuka *et al.*, 1999, Cárdenes *et al.*, 2004).

Nos mamíferos, a síntese endógena das  $\beta$ -carbolinas, norarmana e harmana, resulta de reacções de condensação, tal como nas plantas. Esta condensação, designada por reacção de Pictet-Splengler/Schopf-Bayerle (figura 3), dá-se entre o triptofano, indolalquilaminas derivadas ou neurotransmissores (catecolaminas) e compostos carbonílicos como aldeídos (ex: acetaldeído, formaldeído, ...) ou  $\alpha$ -cetoácidos (ex: ácido pirúvico). Nas plantas não intervêm neurotransmissores (Baum *et al.*, 1996; Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1997; Gearhart *et al.*, 1997; Boeira *et al.*, 2002; Collins, 2002; Dardonville & Rozas, 2004; Herraiz & Chaparro, 2005).



**Figura 3:** Reacção de Pictet-Splengler (Herraiz & Chaparro, 2005)

Os processamentos térmicos nos produtos vegetais, como é caso da torra do café, são os mais determinantes no aumento do teor de  $\beta$ -carbolinas. No entanto, existem outros processos que contribuem para esse aumento como o crescimento e modo de cultivo, a secagem, a fermentação e o armazenamento. O teor final de  $\beta$ -carbolinas obtido em cada um destes processos vai ser condicionado por factores já referidos, como o teor de precursores e a temperatura, mas também pelo pH e tempo (Tsuchiya *et al.*, 1999; Herraiz, 2002).

### 3. Efeitos Fisiológicos

As  $\beta$ -carbolinas são substâncias biologicamente activas, apresentando um largo espectro de efeitos farmacológicos e actividades biológicas, que incluem acções ao nível do sistema cardiovascular, sistema nervoso central, sistema imunológico, entre outros. Alguns desses efeitos, bem como mecanismos de acção específicos, descrevem-se em seguida, à luz dos conhecimentos actuais.

#### 3.1. Hipertensão arterial

A harmana, assim como outras  $\beta$ -carbolinas, demonstraram possuir uma acção hipotensora em ratas. Esta acção parece resultar da ligação aos receptores da imidazolina  $I_1$  ( $I_1$ -IBS), produzindo efeitos centrais ao nível da pressão arterial. Ocorrem também acções locais ao nível das células endoteliais dos vasos sanguíneos, que provocam a libertação de óxido nítrico (NO), e ao nível do músculo vascular liso, que provocam a inibição das contracções induzidas pela activação de receptores ligados aos canais de  $Ca^{2+}$  dependentes da voltagem, conduzindo assim a um efeito vasorrelaxante local, com conseqüente reflexo na pressão arterial (Musgrave & Badoer, 2000; Shi *et al.*, 2000 e 2001; Dardonville & Rozas, 2004).

#### 3.2. Diabetes

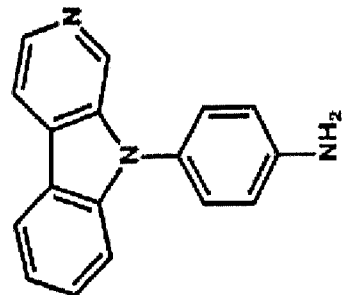
Algumas  $\beta$ -carbolinas, como é o caso da harmana, provocam um aumento da secreção normal de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas das ilhotas de Langerhans (Cooper *et al.*, 2003; Squires *et al.*, 2004). Pensa-se que estarão envolvidos pelo menos dois mecanismos distintos de libertação da insulina. Um deles envolverá a ligação aos receptores da imidazolina  $I_3$  ( $I_3$ -IBS), enquanto que o segundo corresponde à interacção com o receptor-1 da rianodina, provocando oscilações constantes do  $Ca^{2+}$  citosólico, as quais persistem mesmo depois da remoção da harmana, sendo a sua frequência dependente da concentração (Dardonville & Rozas, 2004; Squires *et al.*, 2004).

O potencial da harmana e de outras  $\beta$ -carbolinas no controlo da taxa de secreção da insulina pode ser um passo útil no desenvolvimento de novos secretagogos de insulina que funcionem como agentes terapêuticos na diabetes tipo 2 (Cooper *et al.*, 2003).

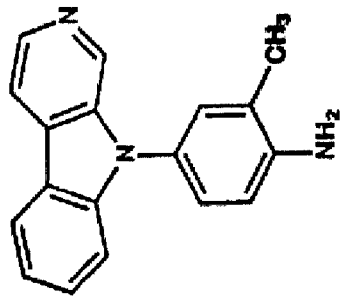
### 3.3. Cancro e SIDA

As  $\beta$ -carbolinas, norarmana e harmana, não possuem propriedades mutagénicas, ao contrário das  $\gamma$ -carbolinas e restantes aminas heterocíclicas. São comutagénicos, pois aumentam a formação de derivados mutagénicos na presença de certos compostos potencialmente mutagénicos (Funayama *et al.*, 1996; Fay *et al.*, 1997; Picada *et al.*, 1997; Boeira *et al.*, 2002; Cárdenes *et al.*, 2004). É o caso de aminas aromáticas, como a anilina, a difenilamina ou a *m*- e *o*-toluidina, ou seus derivados endógenos, como a kinurenina (metabolito do triptofano considerado derivado da anilina *in vivo*), que por reacção com a norarmana ou a harmana, produzem derivados aminofenil- $\beta$ -carbólicos (figura 4), os quais apresentam maior genotoxicidade do que as próprias aminas aromáticas. A anilina e a toluidina são essencialmente matérias industriais. No entanto, existem outras fontes de anilina como o cigarro, que é simultaneamente fonte de norarmana e harmana, como já referido, e alguns vegetais (Ohnishi *et al.*, 2001; Totsuka *et al.*, 1999, 2001 e 2004).

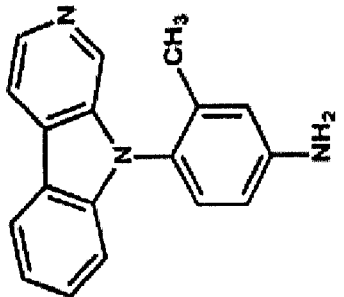
A norarmana pode reagir, por exemplo, com a anilina e originar compostos genotóxicos, como a aminofenilnorarmana (APNH), que no organismo humano é metabolicamente activada em N-OH-APNH e esta em N-acetoxi-APNH. Esses compostos conduzem à formação de aductos e espécies reactivas de oxigénio (ROS), que estão na origem dos danos oxidativos no ADN (figura 5) (Ohnishi *et al.*, 2001; Totsuka *et al.*, 2001).



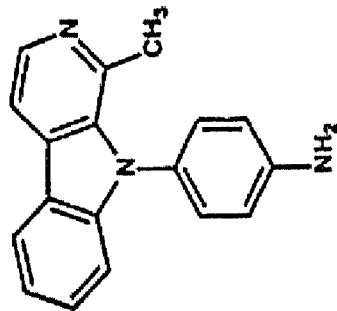
**Aminofenilammana (APNH)**  
**[9-(4'-aminofenil-9H-pirido[3,4-b]indol)]**



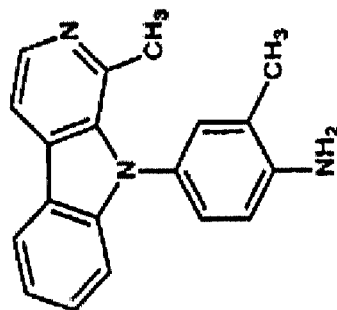
**Amino-3'-metilfenilammana (3'-AMPNH)**  
**[9-(4'-amino-3'-metilfenil-9H-pirido[3,4-b])]**



**Amino-2'-metilfenilammana (2'-AMPNH)**  
**[9-(4'-amino-2'-metilfenil-9H-pirido[3,4-b])]**



**Aminofenilammana (APH)**  
**[9-(4'-aminofenil-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol)]**



**Amino-3'-metilfenilammana (3'-AMPH)**  
**[9-(4'-amino-3'-metilfenil-1-metil-9H-pirido[3,4-b])]**

**Figura 4: Estrutura química dos derivados aminofenil-β-carbonílicos**  
 (Totsuka et al., 2004)

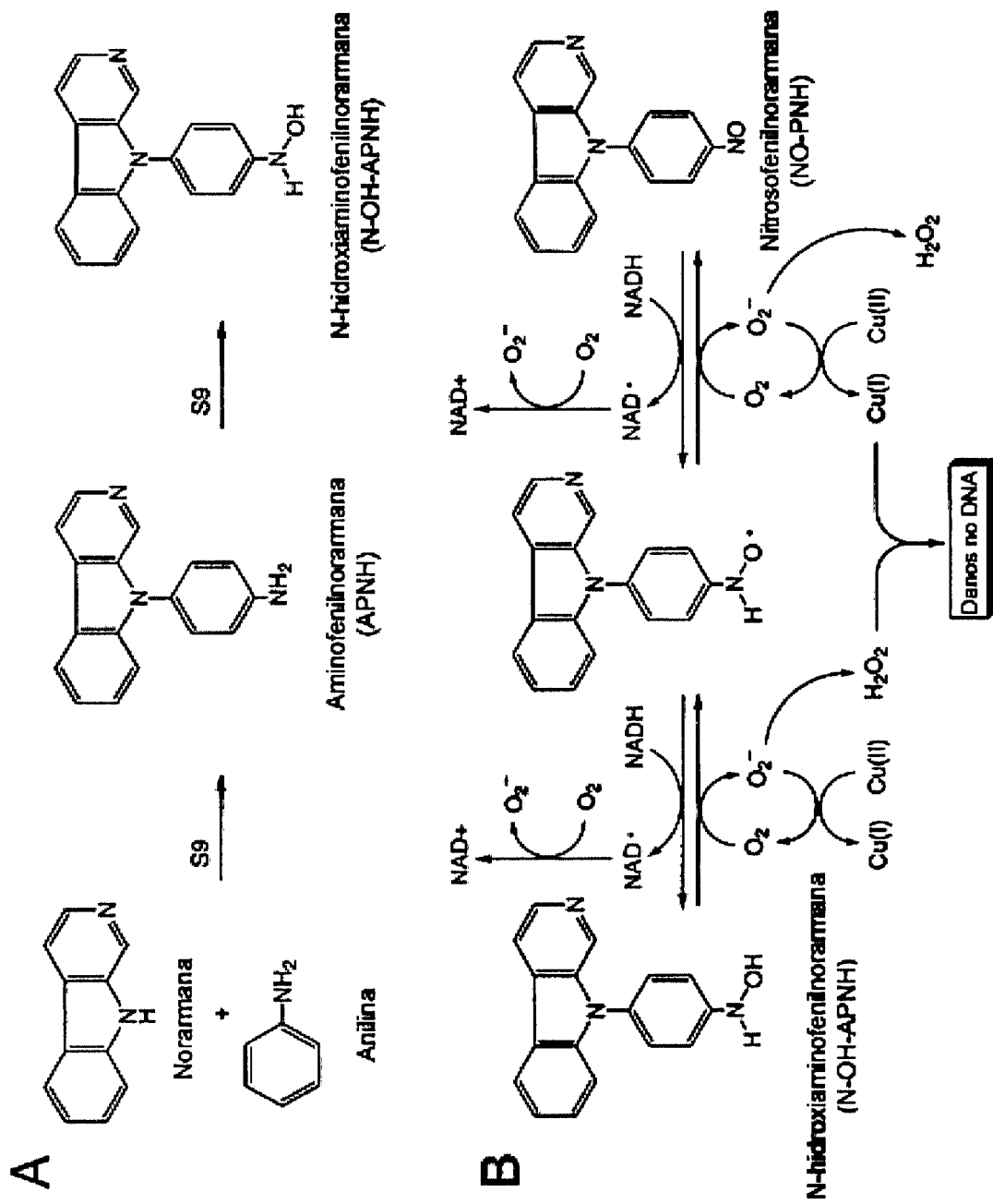


Figura 5: Reacção de formação do N-OH-APNH (A) e mecanismo proposto de agressão do ADN pelo N-OH-APNH (B)

(Ohnishi *et al.*, 2001)

Estas constatações têm encaminhado a investigação destas  $\beta$ -carbolinas também para o campo da genotoxicidade (Totsuka *et al.*, 1999).

Num estudo com ratos, verificou-se que a norarmana presente na fracção S9 do fígado reduziu a mutagenicidade de alguns compostos como a Glu-P-1 (2-amino-6-metildipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol) e outras AH's, a AFB<sub>1</sub> (aflatoxina B<sub>1</sub>), o BP (benzo[a]pireno) e algumas nitrosaminas. Mais especificamente, a norarmana parece ser responsável pela inibição da actividade das seguintes enzimas:

- Enzimas microssomais com actividade citocromo P450, especialmente P450 1A por ligação ao local de ligação do CO ou O<sub>2</sub> ao grupo heme do P450 (inibição competitiva);
- Topoisomerase de ADN I (topo I), que é marcador de intercalação do ADN.

A inibição do P450 ocorre para valores de IC<sub>50</sub> 5-440 vezes menor que a inibição da topo I, indicando que das duas acções genotóxicas da norarmana, a principal será a inibição do P450 (Nii, 2003).

A comutagenicidade da norarmana e harmana parece ser resultado de dois mecanismos de acção:

- Intercalação do ADN, impedindo a sua correcta replicação;
- Inibição da actividade enzimática nos processos de reparação do ADN e controlo do metabolismo de xenobióticos (Picada *et al.*, 1997; Boeira *et al.*, 2002; Nii, 2003).

Recentemente foi demonstrado que algumas  $\beta$ -carbolinas, como a harmana e seus derivados, e 1-aril- $\beta$ -carbolinas, obtidos por síntese laboratorial, apresentavam uma actividade anti-tumoral e anti-VIH significativa. A estrutura  $\beta$ -carbolina pode, por isso, vir a ser uma importante base no desenho e síntese de novos fármacos anti-tumorais e anti-VIH com actividade significativa e baixa toxicidade (Kusurkar *et al.*, 2003; Kusurkar & Goswami, 2004; Cao *et al.*, 2005).

### 3.4. Parasitoses

A harmana e outros derivados de  $\beta$ -carbolinas apresentam interessantes propriedades anti-parasitárias, de acordo com alguns estudos descritos na literatura. Num estudo laboratorial recente, em que foi testada a acção de culturas contínuas de duas estirpes do agente responsável pela malária (*Plasmodium falciparum*), em monócitos humanos da linha celular THP1, verificou-se que a harmana, assim como o seu derivado tetraidroarmana, possuíam actividade anti-malárica (Ancolio *et al.*, 2002). Num outro estudo, com macrófagos humanos constatou-se que a harmana e seus derivados harmina e harmalina apresentaram actividade anti-proliferativa contra parasitas do género *Leishmania* e, em particular, da espécie *Leishmania infantum*. Outros autores haviam também identificado anteriormente um efeito anti-proliferativo da harmana contra parasitas do género *Trypanosoma* (Di Giorgio *et al.*, 2004).

Estas descobertas revestem-se de especial importância, pois nem sempre o acesso à terapia medicamentosa é fácil, especialmente em países africanos, onde a malária é endémica. Assim, as fontes naturais podem constituir uma nova possibilidade no tratamento destas patologias (Ancolio *et al.*, 2002; Di Giorgio *et al.*, 2004).

### 3.5. Doenças do sistema nervoso central (SNC)

Algumas  $\beta$ -carbolinas como a harmana estimulam a actividade neuronal do *locus coeruleus* por ligação aos receptores da imidazolina  $I_1$  ( $I_1$ -IBS) e  $I_2$  ( $I_2$ -IBS). A alteração dos receptores da imidazolina  $I_2$  tem vindo a ser associada a várias patologias mentais como depressão, doenças neurodegenerativas e dependência de opióides (Dardonville & Rozas, 2004).

#### 3.5.1. Acção tranquilizante e anti-depressiva

São várias as  $\beta$ -carbolinas que apresentam elevada afinidade para o local de ligação da benzodiazepina (BZ) dos receptores  $GABA_A$ , actuando como agonistas, antagonistas, agonistas inversos (totais ou parciais) ou como uma mistura. De acordo com o modo específico de acção sobre os receptores, podem apresentar

acções psicotrópicas diferentes (Leppä *et al.*, 2005). Num estudo com ratos, foi demonstrado, por exemplo, que as  $\beta$ -carbolinas harmana e norarmana, ao ligarem-se àqueles receptores, funcionam como agonistas inversos, produzindo um efeito anti-depressivo (Farzin & Mansouri, 2005).

A harmana, assim como outras  $\beta$ -carbolinas (harmina, harmalina, harmol e harmalol) presentes na *Passiflora incarnata* L. (Passifloraceae) vulgo flor de maracujá, demonstraram também propriedades tranquilizantes em estudos com ratos (Picada *et al.*, 1997; Soulimani *et al.*, 1997). Num estudo epidemiológico com mulheres, realizado em 1996, verificou-se que o café prevenia o suicídio, o que poderá estar também relacionado com esta acção tranquilizante das  $\beta$ -carbolinas nele presentes (Kawachi *et al.*, 1996). Apesar de só recentemente se começarem a conhecer os compostos envolvidos, estas propriedades já tinham sido descobertas, facto pelo qual esta planta foi usada tradicionalmente nos E.U.A. e no Brasil no tratamento da ansiedade, nervosismo e nevralgias. No início do século XX, a flor do maracujá foi inclusivamente recomendada por fisiologistas americanos no tratamento da insónia e dos sintomas da menopausa (Picada *et al.*, 1997; Soulimani *et al.*, 1997).

### 3.5.2. Doenças de adição

Têm sido realizados diversos estudos epidemiológicos no sentido de verificar as implicações da norarmana e harmana em diversas doenças de adição (alcoolismo e toxicodependência), visto terem sido encontradas em elevados teores no organismo de indivíduos dependentes.

Stohler *et al.* (1995) e Spies *et al.* (1996) foram dois grupos que se dedicaram a este tema e demonstraram que as  $\beta$ -carbolinas referidas estavam elevadas em alcoólicos. O primeiro grupo suspeitou inclusivamente que os potenciais mediadores do processo patológico que conduz à dependência poderiam ser substâncias endógenas resultantes da interacção entre o álcool e possivelmente metabolitos opióides e neurotransmissores. No entanto, no estudo apresentado não ficou claro se a elevação das  $\beta$ -carbolinas era a causa ou a consequência do uso contínuo de opióides. Igualmente não clarificaram se elas eram responsáveis por distúrbios de estados afectivos que conduzem ao uso de diferentes substâncias aditivas. Mais tarde, foi constatado que alguns dos indivíduos que apresentam hábitos tabágicos

são simultaneamente alcoólicos. Tal facto pode ter constituído um factor confundidor, em estudos anteriores. No entanto, o teor mais elevado destes compostos nos fluidos biológicos dos indivíduos afectados parece, claramente, estar mais associado ao hábito tabágico, do que ao alcoolismo, dado ser o tabaco a maior fonte de exposição conhecida de  $\beta$ -carbolinas (Spijkerman *et al.*, 2002).

Posteriormente, verificou-se que as  $\beta$ -carbolinas, norarmana e harmana, presentes no tabaco são responsáveis pela inibição das duas isoenzimas da MAO (A e B). Esta inibição é responsável por efeitos comportamentais atribuídos ao tabagismo, além de ter um efeito protector dos neurónios dopaminérgicos, como veremos em seguida (Rommelspacher *et al.*, 2002; Herraiz & Chaparro, 2005 e 2006).

### **3.5.3. Doenças neurodegenerativas:**

#### **Doença de Parkinson (prevenção e promoção)**

Estudos epidemiológicos recentes apresentam o hábito tabágico como implicado numa forte redução do risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson. O hábito de consumir café também parece estar implicado, embora com menor efectividade (redução de risco de Parkinson de 60% pelo tabaco *versus* 30% pelo café) (Hernán *et al.*, 2002; Martyn & Gale, 2003). Este efeito neuroprotector parece inclusivamente ser dose-dependente (Tan *et al.*, 2003).

Embora vários artigos científicos apontem para que a cafeína no café e a nicotina no tabaco sejam os compostos envolvidos na prevenção da doença de Parkinson, estes não parecem ser os únicos, nem os mais importantes. Actualmente suspeita-se que os principais compostos responsáveis por esse efeito sejam as  $\beta$ -carbolinas, norarmana e harmana, quer no tabaco quer no café (Martyn & Gale, 2003; Pfau & Skog, 2004; Herraiz & Chaparro, 2006). Estes dois grupos de compostos apresentam mecanismos de acção diferentes na protecção contra a doença de Parkinson. A cafeína e a nicotina actuam como antagonistas dos receptores da adenosina  $A_{2A}$ , impedindo a acção da adenosina de supressão da transmissão dopaminérgica e reduzindo a neurotoxicidade dopaminérgica. As  $\beta$ -carbolinas identificadas no fumo do cigarro e em café bebida são potentes inibidores

reversíveis da MAO, quer do ratinho quer do Homem (Chen *et al.*, 2001; Brown, 2002; Ascherio *et al.*, 2004; Herraiz & Chaparro, 2005 e 2006).

A inibição da MAO é o principal mecanismo implicado na redução da progressão desta doença. A MAO é responsável, ao nível do cérebro, pela bioactivação de tóxicos e pela desaminação oxidativa de amins biogénicas ou neuroaminas, como é o caso da dopamina - o neurotransmissor mais afectado nos doentes de Parkinson. Esta enzima provoca, por ambos os mecanismos de acção, danos celulares oxidativos da via neuronal dopaminérgica nigrostriatal (Herraiz & Chaparro, 2006). Sabe-se que a norarmana atravessa a barreira cerebral e acumula-se no cérebro, apresentando propriedades inibidoras das isoformas A e B da MAO. Já a harmana, assim como outras  $\beta$ -carbolinas com um substituto metilo na posição 1, parecem inibir somente a isoforma A (Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1997; Herraiz & Chaparro, 2005 e 2006).

Os teores elevados destas duas  $\beta$ -carbolinas no fumo do tabaco e, em menor nível, no café bebida, bem como a sua diferente afinidade para ambas as isoformas da MAO, torna-as sérias candidatas na prevenção da doença de Parkinson.

Está também descrito que a norarmana e a harmana podem promover a doença de Parkinson. Por vezes, estas  $\beta$ -carbolinas sofrem metilação dos azotos piridilo (2N-) e/ou indol (9N-), pela enzima cerebral  $\beta$ -carbolina-N-metil-transferase dependente da S-adenosil-L-metionina (SAM), formando catiões N-metil- $\beta$ -carbolínicos (figura 6) (Collins & Neafsey, 2002; Gearhart *et al.*, 1997, 2000 e 2002; Nagatsu, 2002; Östergren, 2005).

Estes compostos parecem ter uma acção semelhante a outros tóxicos também promotores da doença de Parkinson, como o MPP<sup>+</sup>. Esta situação poderá dever-se à semelhança estrutural verificada, pois os dois compostos apenas diferem na ponte indólica central (figura 6) (Collins, 2002; Gearhart *et al.*, 1997, 2000 e 2002; Nagatsu, 2002). Tal como o MPTP tem de sofrer duas oxidações sequencias para ser bioactivado em MPP<sup>+</sup>, também as  $\beta$ -carbolinas têm de sofrer duas metilações (Collins, 2002). Em estudos *in vitro* comprovou-se que os catiões dimetilados das  $\beta$ -carbolinas são inclusivamente mais efectivos na inibição respiratória das mitocôndrias que o MPP<sup>+</sup> e são neurotoxinas dopaminérgicas relativamente potentes, ainda que menos selectivas do que aquele tóxico (Collins, 2002; Collins & Neafsey, 2002; Östergren *et al.*, 2004 e 2005).

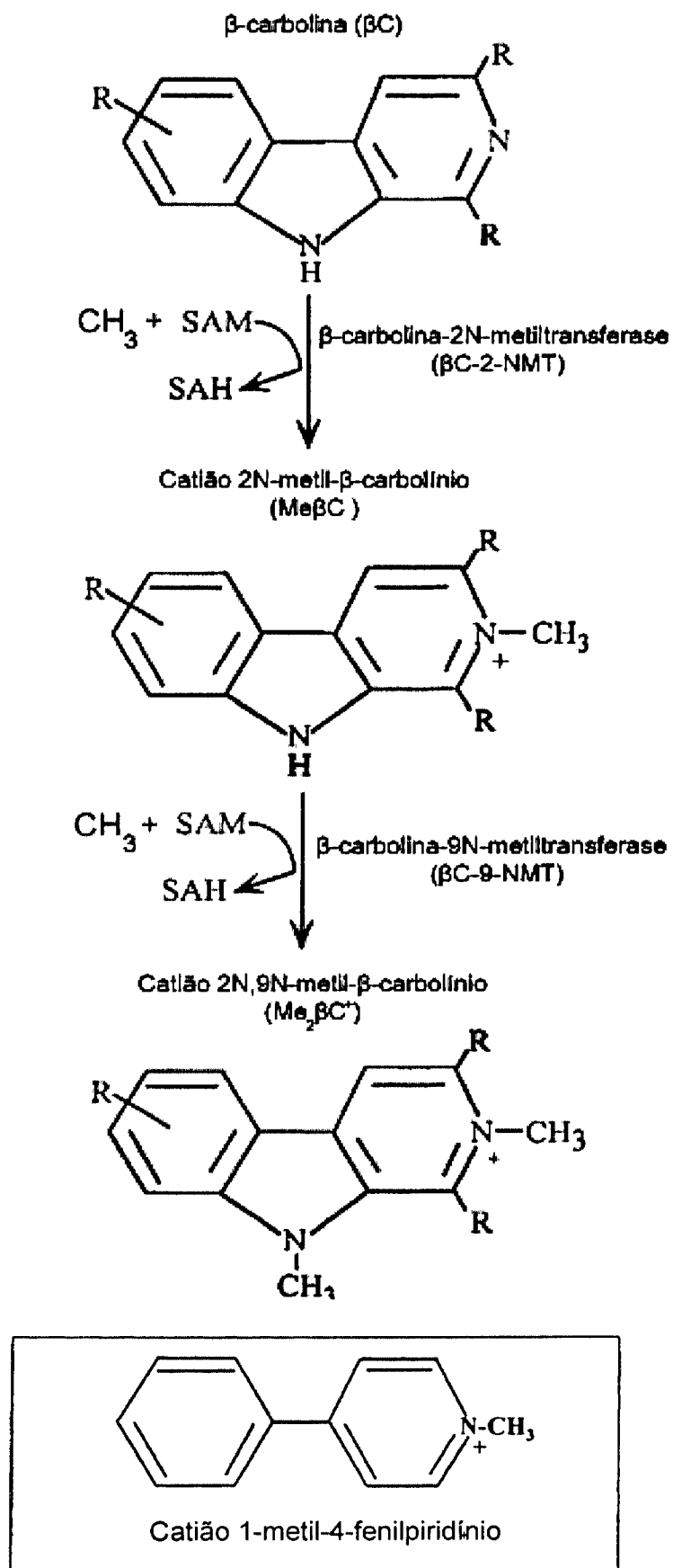


Figura 6: Bioativação das  $\beta$ -carbolinas em 2,9 N-metil-derivados  
(Gearhart *et al.*, 2002)

Na substância *nigra* do córtex cerebral, em especial em doentes com Parkinson, o teor e a actividade da *N*-metiltransferase são normalmente mais elevados. As concentrações dos catiões 2*N*- e 2,9-*N*-metil- $\beta$ -carbolínios e dos seus precursores, norarmana e harmana, encontram-se igualmente elevadas neste local e no líquido cefalorraquidiano. A presença destes compostos na substância *nigra* do córtex cerebral deve-se ao facto da norarmana e harmana se ligarem ao componente lipídico da neuromelanina dos neurónios pigmentados. A melanina contém um número elevado de resíduos livres de ácido carboxílico, que são responsáveis pelas propriedades de troca de catiões observadas, constituindo local de ligação iónica.

A afinidade de vários compostos para a neuromelanina é usualmente considerada uma forma de protecção. No entanto, a libertação progressiva de tóxicos acumulados, como as  $\beta$ -carbolinas, leva ao seu aumento no citosol. As metilações convertem as  $\beta$ -carbolinas em tóxicos mitocondriais potentes, capazes de inibir a NADH-coenzima Q redutase do complexo I da cadeia respiratória. A formação contínua destes metabolitos nos neurónios pigmentados pode afectar o funcionamento mitocondrial de forma irreversível e a sobrevivência da célula, promovendo a neurodegeneração do sistema *nigrostriatal*, especialmente nos indivíduos mais susceptíveis, e conduzindo à doença de Parkinson (Gearhart *et al.*, 1997, 2000 e 2002; Nagatsu, 2002; Östergren *et al.*, 2004 e 2005).

#### **4. Metodologias analíticas descritas na avaliação das $\beta$ -carbolinas, norarmana e harmana, em produtos vegetais**

As  $\beta$ -carbolinas, norarmana e harmana, têm sido determinadas em diferentes matrizes, incluindo alimentos confeccionados, extractos de plantas e frutos, bebidas e matrizes biológicas como a urina, plasma e tecidos (Pfau & Skog, 2004).

A determinação dos teores de  $\beta$ -carbolinas em alimentos é extremamente importante sob o ponto de vista de saúde, mas também o poderá vir a ser em termos de controlo de qualidade e autenticidade de produtos.

Frequentemente as  $\beta$ -carbolinas são analisadas juntamente com AAH's, já que pertencem ao mesmo grupo químico, não sendo, no entanto, as metodologias utilizadas específicas para elas. Desde que se detectou a presença de  $\beta$ -carbolinas em alimentos, têm sido desenvolvidas técnicas de purificação do tipo líquido-líquido e/ou sólido-líquido (colunas de SPE tipo C18, PRS ou benzenossulfónicas), seguidas de técnicas de separação e identificação como CE e/ou HPLC, com recurso a detectores FD, UV-DAD e MS (Knize *et al.*, 1992). A tabela 1 resume algumas técnicas para a determinação das  $\beta$ -carbolinas, norarmana e harmana, em produtos vegetais e misturas padrão.

**Tabela 1:** Metodologias analíticas descritas na avaliação das  $\beta$ -carbolinas, norarmana e harmana, em produtos vegetais e misturas padrão

<b>Autores</b>	<b>Matriz</b>	<b>Compostos detectados</b>	<b>Extracção</b>	<b>Separação cromatográfica e detecção</b>
Adachi <i>et al.</i> , 1991	Bebidas alcoólicas, vinagres, misos e molhos de soja	Norarmana e harmana	Coluna de SCX de PRS	RP-HPLC-FD HPLC-MS
Cheng & Mitchelson, 1997	Mistura padrão de 6 $\beta$ -carbolinas	Norarmana, harmana, harmina, harmalina, harmol e harmalol		MEKC-UV-DAD
Unger <i>et al.</i> , 1997	Mistura padrão de 6 $\beta$ -carbolinas	Norarmana, harmana, harmina, harmalina, harmol e harmalol		CE-UV CE-MS
Tsuchiya <i>et al.</i> , 1999	Plantas medicinais e frutos secos e frescos	Norarmana, tetraidronorarmana, harmana, tetraidroarmana, harmina, harmalina, harmol e harmalol		RP-HPLC-FD
Adachi <i>et al.</i> , 2000	Medicamento de L-triptofano	Norarmana e harmana	Coluna de terra de diatomáceas Coluna de SCX de PRS Coluna de C18	HPLC-UV-DAD LC-MS-ESI-SIM
Herraiz, 2002	Grãos de café e café bebida de diferentes modos de extracção	Norarmana e harmana	Coluna de SCX de PRS ou gel de sílica derivatizado com ácido benzenossulfónico	RP-HPLC-FD HPLC-MS
Stöckigt <i>et al.</i> , 2002	Culturas de células de plantas híbridas ( <i>Rauvolfia serpentina</i> e <i>Rhazya stricta</i> )	Norarmana, harmana, harmina, harmalina, harmol e harmalol		CZE

---

***PARTE EXPERIMENTAL***

A parte experimental desta dissertação consistiu na determinação do teor das  $\beta$ -carbolinas, norarmana e harmana, presente em cafés verdes e torrados, e na avaliação do grau de torra das amostras, quer por fotometria de IV quer por cálculo da ORL. Descrevem-se em seguida os passos dados para a executar e para atingir os objectivos do trabalho.

## Material e métodos

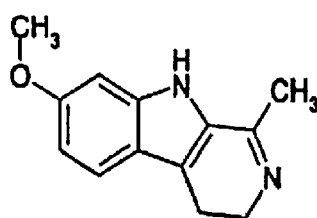
### 1. Reagentes e padrões

Na execução deste trabalho foram utilizados os seguintes reagentes:

- ácido clorídrico fumante (37%), ácido ascórbico, formato de sódio, metanol p.a. e hidrogenofosfato de potássio anidro p.a., da Merck (Alemanha);
- hidrocloreto de semicarbazida (99%), ácido trifluoroacético e acetonitrilo para HPLC (Chromasolv), da Sigma-Aldrich (Espanha);
- harmalina da Fluka (padrão interno), norarmana da Sigma e harmana da Aldrich (padrões externos).

Utilizaram-se dois eluentes: eluente A - solução aquosa de ácido trifluoroacético 0,025 M e formato de sódio 0,028 M (preparada por diluição de uma solução-mãe 6 M), a pH 2,7 - e eluente B - acetonitrilo. Ambos os eluentes foram filtrados, com filtro 0,45  $\mu$ m e desgaseificados (sistema de ultra-sons e vácuo), após preparação.

O padrão interno (harmalina) (figura 7) foi escolhido com base no trabalho de Tsuchiya *et al.* (1999). A harmalina pareceu possuir todas as características necessárias a um padrão interno, neste contexto. É um composto da classe das  $\beta$ -carbolinas, portanto similar aos compostos em estudo; tem tempo de retenção próximo da norarmana e harmana nas condições cromatográficas ensaiadas, separa-se devidamente dos demais compostos da matriz, não reage com os compostos em estudo nem outros da matriz e não foi detectada em nenhum dos frutos avaliados naquele trabalho, pelo que provavelmente não existiria no café. Esta situação foi confirmada no ensaio comparativo de extracção com e sem padrão interno adicionado.



Harmalina

**Figura 7:** Estrutura química do padrão interno  
(Di Giorgio *et al.*, 2004)

As soluções-mãe de padrões eram soluções aquosas e foram preparadas com uma concentração aproximada de 200 mg/L, no caso das soluções de norarmana e de harmana, e de cerca de 100 mg/L, no caso da solução de harmalina. O padrão norarmana necessitou de ser adicionado de cerca de 5 ml de acetonitrilo, para melhorar a sua solubilidade, e só depois se fez o volume total do balão com água.

A partir destas soluções-mãe prepararam-se 6 soluções padrão, através de diluições sucessivas, de forma a obter as concentrações necessárias à construção da curva de calibração e picos cromatográficos homogêneos e de altura adequada. Antes de se fazer o volume total do balão com água foi adicionado o padrão interno (equivalente a 8,6 µg, a partir de uma diluição da solução-mãe, já preparada). De referir que a curva de calibração foi sujeita à totalidade do protocolo extractivo, conforme será detalhado nos resultados.

A solução aquosa de ácido ascórbico foi preparada diariamente para evitar a sua degradação. Esta verifica-se mesmo na ausência de luz e a temperaturas de refrigeração.

A água utilizada na preparação das soluções de trabalho e do eluente aquoso foi ultrapura (desionizada no equipamento Seraldest LFM 20 da Seral).

## 2. Materiais e Equipamentos

Para as torras de café foi utilizado um torrador marca Probat Duett e modelo M, colocado à disposição pelo *Bogani Café*. Trata-se de um torrador de convecção de leito fluido e de baixa capacidade (700 a 1200 g). Para a moagem fina dos cafés usaram-se dois moinhos: um moinho marca Probat e modelo 55 LAM 00, para café verde, gentilmente cedido pela indústria de torrefacção Sanzala, e um moinho marca Krups e modelo GVX2, para café torrado, adquirido pelo serviço de Bromatologia.

Para a determinação da cor dos grãos torrados utilizou-se um fotómetro de IV, marca Probat Electronic e modelo Colorette 3, cedido pela indústria de torrefacção Bicafé.

Na determinação da humidade, por secagem, das amostras de café moído recorreu-se a uma estufa de circulação forçada de ar marca WTC Binder e modelo FD 240.

As determinações de massa foram realizadas numa balança analítica marca Mettler ® e modelo Toledo AG204.

Usaram-se micropipetas automáticas, da marca Jencons, modelo Sealpette, de 1000 e 200 µl de capacidade, com pontas descartáveis.

Para o aquecimento da solução de HCl 0,05 M foi utilizado um disco de agitação magnética, apenas na função de aquecimento.

Aquando da primeira fase da extracção, as amostras foram agitadas e homogeneizadas num vórtex da Heidolph ®, modelo Reax 2000 e centrifugadas numa centrífuga Heraeus Sepatech, modelo Labofuge Ae e numa centrífuga refrigerada marca Eppendorf, modelo S810 R.

Na extracção em fase sólida usaram-se colunas de troca catiónica forte (SCX), com 500 mg de sílica derivatizada com ácido propilsulfónico (PRS), Bond-Elut da Varian. Estas colunas foram acopladas a um extractor em fase sólida Visiprep™ da Supelco ®, com sistema de vácuo.

Na separação cromatográfica dos compostos extraídos foi usado um cromatógrafo, equipado com uma bomba perfusora modelo PU-1580, uma unidade quaternária de gradiente modelo LG-1580-04, um desgaseificador modelo LG-1580-54 e um injector automático modelo AS-950, com *loop* de 20 µl, todos marca Jasco. O sistema de detecção utilizado foi um detector de fluorescência marca Jasco, modelo FP-920.

A coluna cromatográfica que se demonstrou mais adequada para este trabalho foi uma coluna Teknokroma® Tracel Excel 120 ODSA (5 µm, 250 x 4 mm). Anteriormente foram utilizadas duas outras colunas - a coluna Phenomenex® C18, 110 A (5 µm, 150 x 4,6 mm) e a coluna TosoHaas TSK-gel® ODS-80 TM (5 µm, 250 x 4,6 mm), mas sem sucesso, conforme será discutido em Resultados e Discussão.

A recolha e tratamento de dados cromatográficos foi efectuada pelo programa informático Borwin™ PDA Controller Software (JMBS, France), versão 1.50 e o tratamento estatístico dos resultados das diferentes determinações foi efectuado pelos programas informáticos Microsoft® Excel 2002 (Microsoft Corporation, USA) e Statistica for Windows (Statsoft, Tulsa, OK).

### **3. Amostras**

#### **Amostras de café verde**

Foram gentilmente fornecidas pelo iBeSa 17 amostras de café verde em grão, embaladas em sacos plásticos (3 kg) e devidamente identificadas. As amostras pertenciam às espécies arábica e robusta e provinham de diferentes origens geográficas. Na espécie arábica foram analisados cafés das Honduras (4), Guatemala (2), Quênia (2) e Cerrado do Brasil (2); na espécie robusta cafés dos Camarões (1), Amboim de Angola (1), Vietname (1), Índia (1) e Uganda (3).

#### **Amostras de café torrado**

Visto que era objectivo deste trabalho avaliar a evolução do teor de β-carbolinas com a temperatura da torra, todas as amostras de café verde foram sujeitas a 3 temperaturas de torra diferentes (240°C, 260°C e 280°C), durante cerca de 4 min, de forma a obter diferentes graus de torra. Para o efeito, efectuaram-se torras por convecção, utilizando-se o torrador descrito anteriormente. As amostras, quer verdes quer torradas, foram então submetidas a moagem, em moinhos específicos e os cafés moídos foram utilizados na determinação dos diferentes parâmetros avaliados.

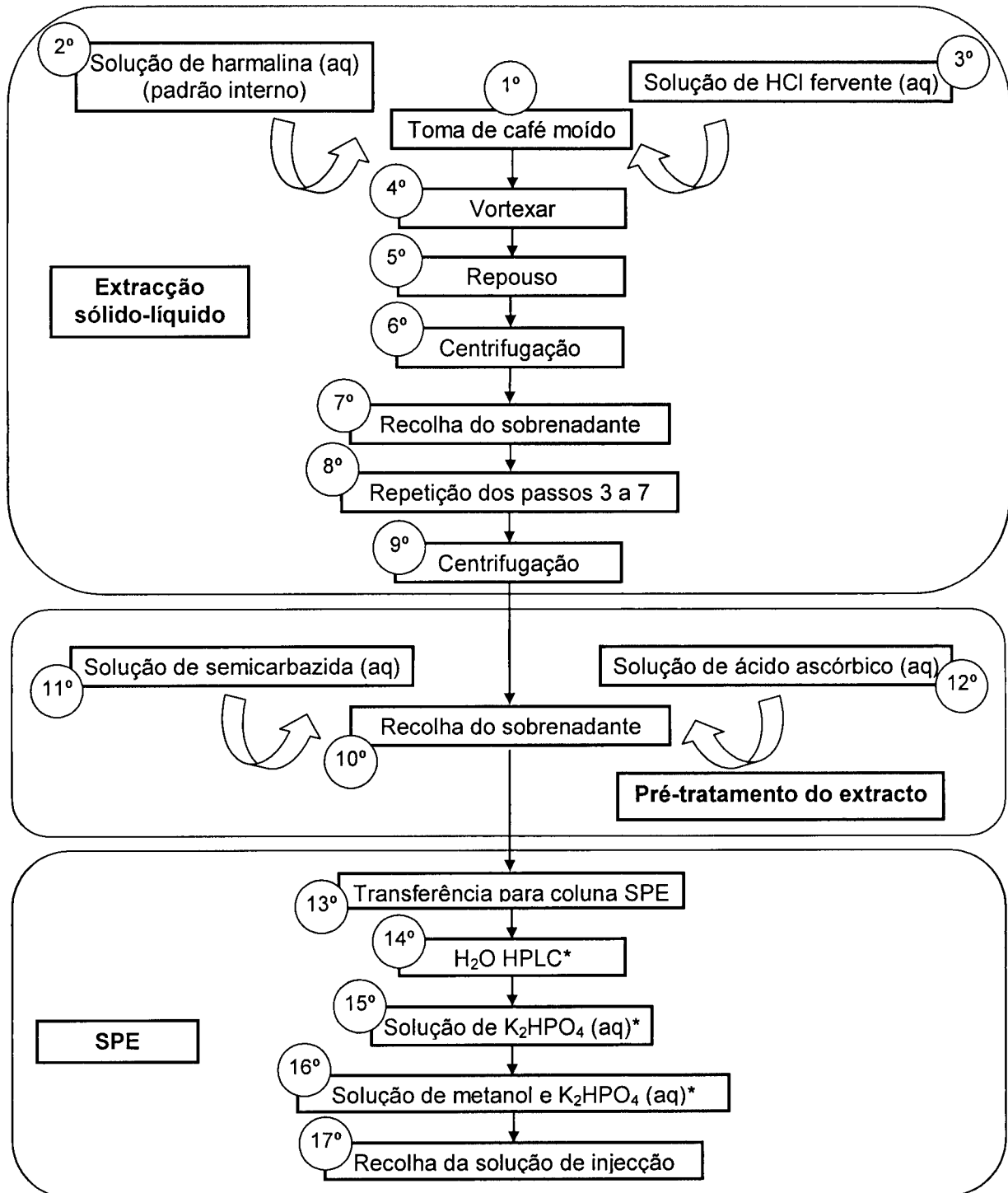
## 4. Metodologias analíticas

### 4.1. Análise das $\beta$ -carbolinas

A metodologia escolhida para a extracção, separação e detecção das  $\beta$ -carbolinas, norarmana e harmana, das amostras de cafés moídos (verdes e torrados a diferentes temperaturas), foi uma técnica acoplada de SPE-RP-HPLC-FD, adaptada de Herraiz (2002). O autor utilizou esta técnica no doseamento das mesmas  $\beta$ -carbolinas, em cafés bebida obtidos por diferentes processos de extracção. Esta técnica tinha já sido adaptada por Herraiz (2000) com base no método desenvolvido por Adachi *et al.* (1991). No presente trabalho, sofreu novamente algumas adaptações com o objectivo de melhorar a sua eficiência e adaptação à extracção total do café em grão e que obrigaram à sua revalidação.

Em resumo, a metodologia extractiva utilizada, com o objectivo de isolar os compostos de interesse, consistiu numa extracção ácida a quente do pó de café (verde ou torrado), seguida de um pré-tratamento da amostra com antioxidante e semicarbazida e de extracção da mesma em fase sólida (SPE). O resumo do processo poderá ser facilmente acompanhado na figura 8. Após recolha do extracto, contendo as duas  $\beta$ -carbolinas, procedeu-se à sua separação por RP-HPLC, com um detector de fluorescência (FD), visto estes compostos apresentarem características fluorescentes, e à sua identificação e quantificação com base em padrões.

Figura 8: Esquema resumo da metodologia analítica extractiva



\* com adição de solução de ácido ascórbico (aq)

### 4.1.1. Extração

Após preparação das amostras de cafés efectuou-se a extração em duplicado de todas elas, recorrendo numa primeira fase à extração sólido-líquido, para extração dos compostos a estudar da matriz café, e posteriormente à extração em fase sólida para purificação do extracto anterior e isolamento das  $\beta$ -carbolinas. Para facilidade de explicação da técnica usam-se os números correspondentes às etapas esquematizadas na figura 8.

#### I - Extração sólido/líquido

- 1º Pesar o café moído (toma de 400 mg para os torrados e de 750 mg para os verdes) para um tubo de plástico de 30 ml;
- 2º Adicionar 120  $\mu$ l de padrão interno (solução aquosa de harmalina 100 mg/L);
- 3º Adicionar 20 ml de solução aquosa de HCl 0,05 M aquecida à fervura;
- 4º Vortexar 30 s;
- 5º Deixar repousar 5 min;
- 6º Centrifugar 5 min, à velocidade de 5000 rpm;
- 7º Recolher o sobrenadante para um tubo de centrífuga de 45 ml;
- 8º Repetir os passos 3 a 7, recolhendo o sobrenadante para o mesmo tubo;
- 9º Centrifugar 15 min, à velocidade 15000 g e à temperatura de 0°C;

#### II - Pré-tratamento do extracto

- 10º Retirar 10 ml do sobrenadante da solução anterior;
- 11º Adicionar 0,5 ml de solução aquosa de semicarbazida a 10 mg/ml;

Esta solução foi adicionada com o objectivo de suprimir um problema que se verifica frequentemente na análise das  $\beta$ -carbolinas, a formação de artefactos resultantes da condensação entre as indolalquilaminas precursoras das  $\beta$ -carbolinas e os aldeídos. A semicarbazida vai ligar-se aos aldeídos existentes nas amostras e, possivelmente, nos reagentes.

- 12º Adicionar 0,5 ml de solução aquosa de ácido ascórbico 50 mg/ml;

A solução de ácido ascórbico teve como finalidade a protecção dos compostos em estudo contra a oxidação.

### III - Extração em fase sólida (SPE)

Nas etapas de extração que se seguem (III a e III b) usou-se uma coluna SPE (descrição em Materiais e equipamentos), previamente condicionada com 6 ml de metanol e 6 ml de solução aquosa de HCl 0,1 M.

#### III a - Adsorção das $\beta$ -carbolinas à coluna

13° Transferir o extracto para a coluna;

14° Lavar com 6 ml de água ultrapura com 0,5 ml de solução aquosa de ácido ascórbico a 50 mg/ml;

15° Lavar com 3 ml de solução aquosa de  $K_2HPO_4$  0,4 M, pH 9,1 com 0,5 ml de solução aquosa de ácido ascórbico 50 mg/ml;

#### III b - Desorção das $\beta$ -carbolinas da coluna

16° Eluição com 3 ml de solução aquosa de metanol e  $K_2HPO_4$  0,4 M, pH 9,1 (1:1) com 0,5 ml de solução aquosa de ácido ascórbico 50 mg/ml;

17° Recolha da solução para injeção em "vials" de 4 ml.

#### 4.1.2. Separação cromatográfica

Após várias tentativas, foi estabelecido o gradiente esquematizado na tabela 2, que permitiu uma separação efectiva dos compostos em estudo, num tempo total de 25 min:

**Tabela 2:** Gradiente de separação cromatográfica

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	95	5
15	70	30
17	70	30
20	30	70
23	95	5
25	95	5

O fluxo escolhido foi de 1ml/min, à temperatura ambiente (cerca de 22°C) e o volume de injeção de 20 µl de extracto para cada uma das amostras, tal como recomendado por Herraiz (2002).

Para a detecção das β-carbolinas utilizou-se um detector de fluorescência, visto que a presença de anéis aromáticos nos compostos em questão confere-lhes fluorescência, como anteriormente foi referido. A tabela 3 apresenta o programa de comprimentos de onda usados.

**Tabela 3:** Comprimentos de onda de excitação e de emissão

Tempo (min)	λ excitação (nm)	λ emissão (nm)
0	300	433
17,5	267	477
25	300	433

Este programa de comprimentos de onda permite a detecção simultânea das β-carbolinas em estudo, na primeira parte do programa, e a detecção do padrão interno (harmalina), após 17,5 min, ou seja, após a troca dos comprimentos de onda, visto apresentar também fluorescência mas para outros valores.

#### 4.2. Determinação do grau de torra das amostras

Para determinação do grau de torra das amostras recorreu-se inicialmente à avaliação da cor por fotometria de IV. Esta técnica permite prever o grau de torra em função de valores de reflectância da amostra. Para isso, coloca-se café moído numa placa de *Petri*, enchendo até ao topo e faz-se incidir sobre ele uma fonte monocromática de radiação infravermelha. Automaticamente é medida a reflectância da amostra e obtido um índice de cor numa escala de 0 a 200, apresentado num visor digital. Quanto maior for esse valor, menor será a intensidade de cor e o grau de torra da amostra. O uso de suportes de vidro, como é o caso da placa de *Petri*, é aconselhado para eliminar o problema de absorção e transmissão simultâneas, verificado em algumas amostras.

No entanto, como a informação obtida por esta técnica se revelou insuficiente para caracterizar o grau de torra das amostras, provavelmente pela multiplicidade de factores que incluem não só a razão tempo/temperatura utilizada no processo de torra, mas também as características dos próprios grãos e do instrumento utilizado, procedeu-se ao cálculo da chamada "organic roast loss" (ORL), uma medida de avaliação indirecta da cor através da perda de massa durante a torra, que serviu de complemento da informação anterior.

Para calcular a perda de massa orgânica ocorrida nas amostras determinou-se a variação do peso médio, em balança analítica, desde os grãos verdes até aos mais intensamente torrados e procedeu-se à determinação do teor de humidade de todos os cafés após moagem e libertação do dióxido de carbono, por secagem em estufa com circulação forçada de ar, a  $103\pm 2$  °C, até peso constante.

## Resultados e discussão

### 1. Optimização da metodologia analítica de quantificação das $\beta$ -carbolinas

#### 1.1. Optimização das condições de extracção

Dado que a metodologia analítica desenvolvida por Herraiz (2002) contemplava apenas a extracção de café bebida, foi necessário desenvolver um método extractivo adequado ao café em grão, quer verde quer torrado.

#### I - Extracção sólido/líquido:

Na fase de extracção inicial foram testados como extractores água ( $H_2O$ ) e ácido clorídrico (HCl), ambos a frio e a quente, segundo o esquema da tabela 4:

**Tabela 4:** Condições de extracção testadas

		1 extracção única (40 ml)		2 extracções consecutivas (20 ml+20 ml)	
		HCl	H <sub>2</sub> O	HCl	H <sub>2</sub> O
<b>A frio</b>	No momento	x		x	
	"Overnight"	x	x	x	
<b>A quente</b>	No momento	x		x	x
	"Overnight"	x	x	x	

A eficiência do processo extractivo foi, nesta fase, comparada em termos de áreas cromatográficas dos picos obtidos. A maior taxa de extracção dos compostos em estudo foi obtida com HCl a quente, por duas vezes consecutivas, no momento. Como não se verificaram alterações significativas comparativamente com o processo de duas extracções consecutivas, em que após segunda adição do extractor se mantinha a mistura em repouso "overnight", optou-se pela metodologia mais célere.

O passo da agitação em vórtex seguido de um período de maceração curto demonstrou contribuir para uma melhor eficiência na extracção.

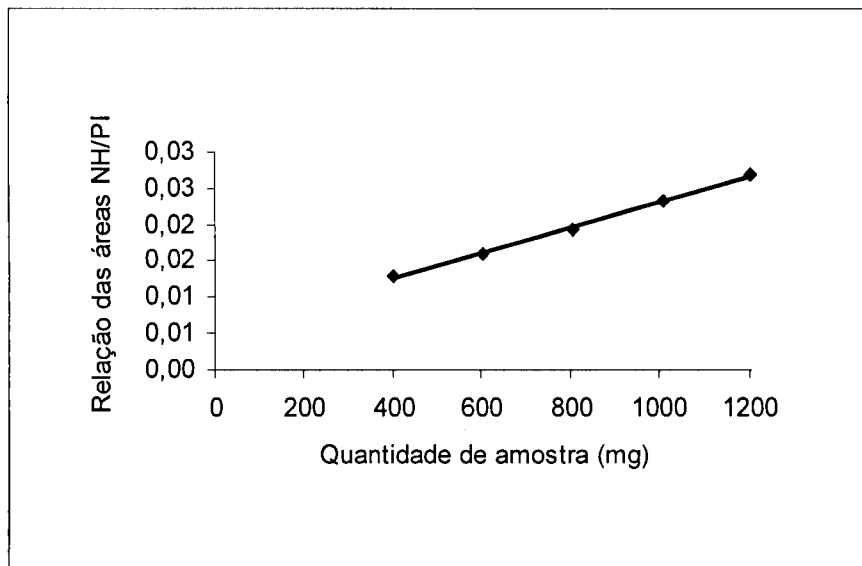
## II - Extracção em fase sólida:

### II a - Testes à capacidade máxima de carregamento da coluna SPE

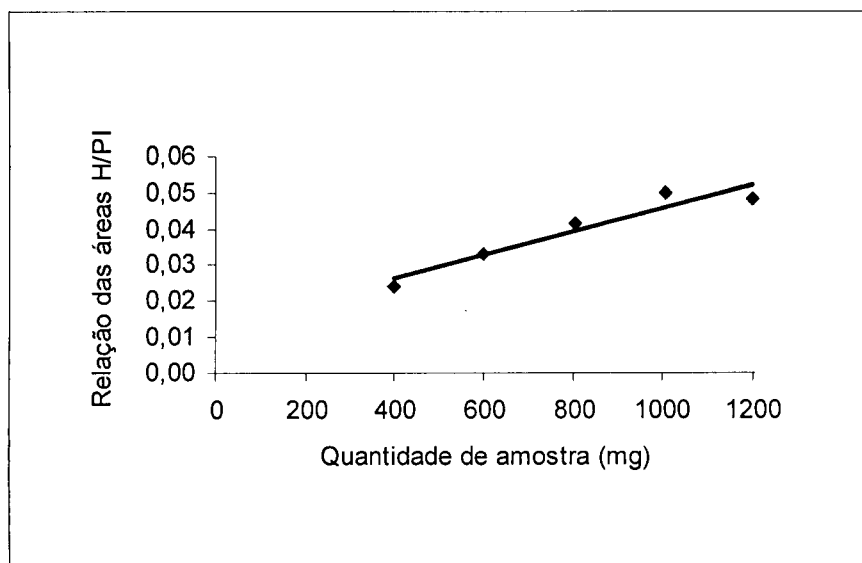
Foram efectuados testes à capacidade máxima de carregamento da coluna SPE com extractos de café, verde e torrado, devido às diferentes composições dos dois tipos de matriz (gráficos 1 a 4). Para o efeito utilizaram-se quantidades crescentes de extracto de uma amostra (robusta de torra a 260°C) e verificou-se a resposta em termos de área dos compostos e do padrão interno, após separação cromatográfica. Os resultados obtidos para o café verde encontram-se nos gráficos 1 e 2, para norarmana e harmana respectivamente, onde se testaram até carregamentos equivalentes ao extracto obtido com 1200 mg de amostra inicial. Para o café torrado, atendendo à maior riqueza nos compostos em estudo e outros com possível afinidade para a coluna, testou-se apenas até um máximo de 500 mg de amostra. Os resultados são apresentados nos gráficos 3 e 4, para os mesmos compostos.

No caso do café verde, a quantidade de amostra a utilizar para a extracção foi determinada pela resposta da harmana, pois a perda de linearidade com a utilização de quantidades crescentes de amostra surgiu mais cedo do que para a norarmana, como se pode verificar no gráfico 2. A perda de linearidade ocorreu cerca dos 800 mg de amostra, pelo que se optou por utilizar uma quantidade máxima ligeiramente inferior (750 mg). Em relação ao café torrado, os gráficos do teste para ambos os compostos demonstraram uma boa linearidade ( $r^2=0,9991$  e  $r^2=0,9848$ ) para todas as quantidades testadas, pelo que se poderia optar pela quantidade máxima testada (500 mg). No entanto, sabendo que a quantidade destes compostos pode estar muito aumentada nas torras mais intensas, optou-se por utilizar uma quantidade ligeiramente inferior (400 mg).

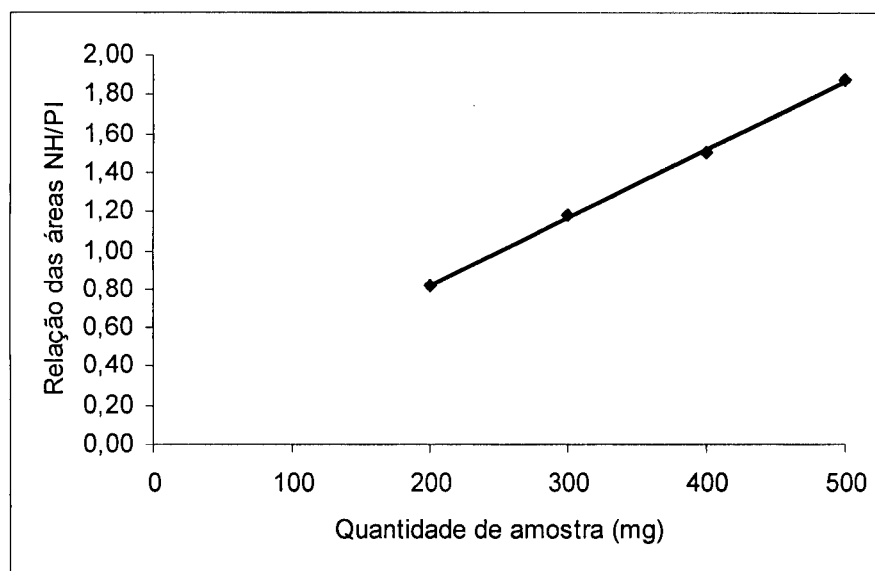
**Gráfico 1:** Capacidade de carregamento da coluna SPE com café verde para a norarmana.



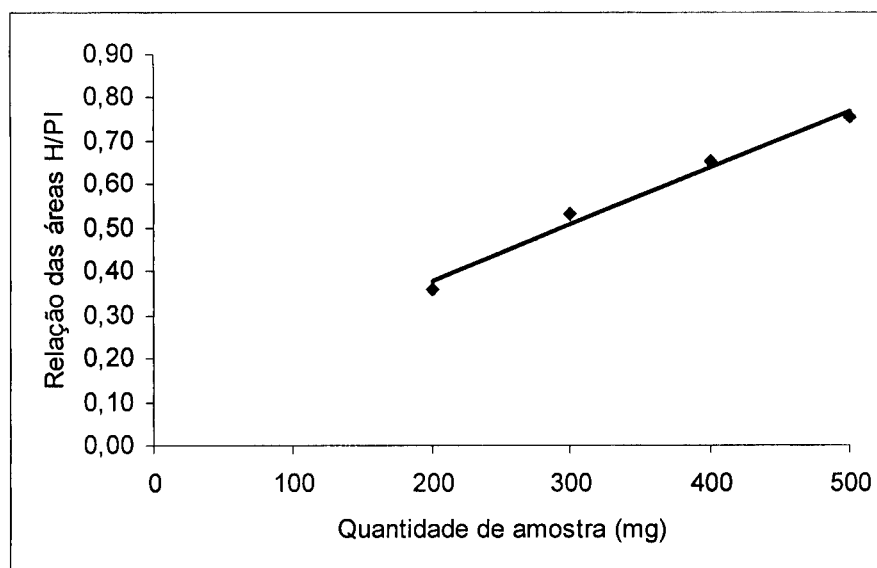
**Gráfico 2:** Capacidade de carregamento da coluna SPE com café verde para a harmana.



**Gráfico 3:** Capacidade de carregamento da coluna SPE com café torrado para a norarmana.



**Gráfico 4:** Capacidade de carregamento da coluna SPE com café torrado para a harmana.



## 1.2. Optimização das condições cromatográficas

Na primeira tentativa de separação cromatográfica usou-se uma coluna cromatográfica Phenomenex C18, 110 A (5  $\mu$ m, 150 x 4,6 mm) e dois eluentes, solução aquosa de fosfato de amónio, ajustada a pH 3 com ácido ortofosfórico (eluyente A) e 20% do anterior em acetonitrilo (eluyente B). O gradiente usado foi: aos 0 min 100% A, aos 8 min 68% A, aos 18 min 10% A e aos 20 min 0% A.

Apesar de ser descrita como a opção mais indicada (Herraiz, 2000 e 2002) não permitiu uma separação satisfatória dos compostos, desde a fase inicial, situação que se agravou com o tempo de utilização da coluna, afectando a precisão dos resultados. Tal facto parecia dever-se a alguma incompatibilidade do sistema de eluentes com a coluna, nomeadamente com o tampão fosfato. A funcionar, esta opção teria a vantagem de permitir uma separação mais rápida dos compostos (20 min), bem como o conseqüente menor consumo de eluentes.

Como as  $\beta$ -carbolinas pertencem ao grupo das AAH's, tal como foi referido, tentou-se adaptar um sistema de eluentes descrito para as AAH's à coluna Phenomenex C18, de forma a resolver o problema inicial (Gross & Gruter, 1992). Este sistema de eluentes era composto por uma solução de trietilamina 0,01 M, ajustada a pH 3,6 com ácido ortofosfórico (eluyente A) e por acetonitrilo (eluyente B), com a seguinte sequência de eluição: aos 0 min 95% A, aos 10 min 85% A, aos 20 min 75% A, aos 30 min 45% A, aos 30,1 min 30% A e aos 35 min 95% A. No entanto, esta tentativa também não teve sucesso, tendo ficado a suspeita não comprovada de que a coluna já estaria irremediavelmente irrecuperável pelo descrito no parágrafo anterior.

Continuando na mesma linha de raciocínio, optou-se por usar, além do sistema de eluentes descrito no parágrafo anterior, também um tipo de coluna frequentemente descrita para aquele grupo de compostos, ou seja, uma coluna TSK-gel ODS-80 TM (5  $\mu$ m, 250 x 4,6 mm) (TosoHaas, Japão). No entanto, também esta combinação foi infrutífera e a coluna mostrou sinais de deterioração em poucos dias.

Perante o referido, começou a pensar-se que a utilização como eluentes de soluções tampão com pH muito baixo (solução aquosa de fosfato de amónio e solução de trietilamina, no caso), embora descrita por alguns autores, poderia estar na origem dos problemas detectados nas colunas e que o próprio revestimento em

silica gel da coluna TosohHaas TSK-gel ODS-80 TM seria muito sensível, sofrendo rápida degradação.

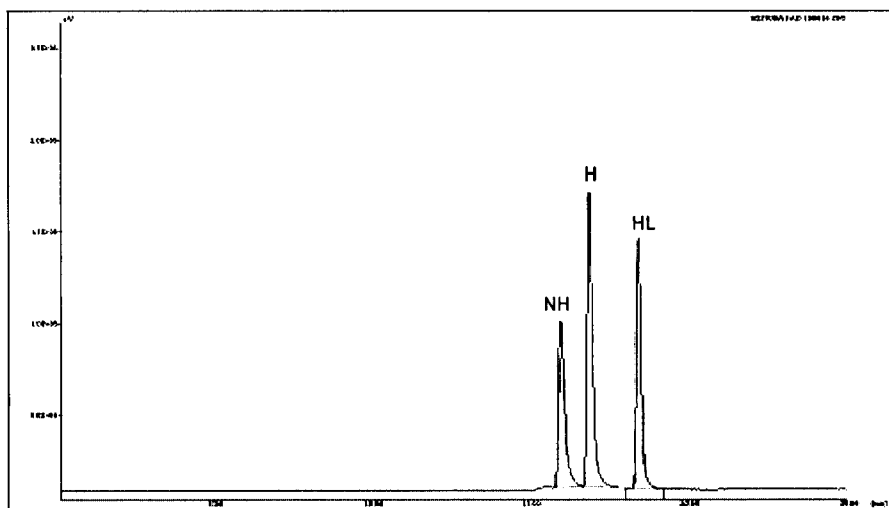
Abandonou-se então a coluna anterior e passou a testar-se uma coluna Tracel Excel 120 ODSA (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4 mm) (Teknokroma, Espanha). Trata-se de uma coluna de elevada resistência, inclusivamente a pH's muito baixos, tendo por base a experiência com este tipo de coluna, adquirida no laboratório onde foi desenvolvido este trabalho. Manteve-se o acetonitrilo (eluente B) e testou-se uma nova fase móvel aquosa, uma solução tampão de formato de sódio adicionada do modificador orgânico ácido trifluoroacético (eluente A), devidamente tamponada para o pH necessário à separação dos compostos, isto é, cerca de 3 (2,7 mais precisamente). De todas as colunas testadas e dos diferentes tipos de gradientes experimentados em cada uma delas, a conjugação que resultou na melhor resolução dos picos cromatográficos foi esta última.

De salientar ainda que os extractos injectados eram inicialmente conservados nos "vials" de recolha à temperatura de refrigeração ( $5^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). No entanto, verificou-se, após algumas injeções, que àquela temperatura ocorria degradação dos compostos isolados, mesmo na presença do antioxidante (solução de ácido ascórbico 50 mg/ml). Para a evitar, optou-se por injectar as amostras rapidamente, de preferência logo a seguir à extracção ou conservar à temperatura de congelação ( $-21^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) por alguns dias, soluções que se revelaram mais eficazes.

### 1.3. Identificação e quantificação

As  $\beta$ -carbolinas em estudo foram identificadas por comparação cromatográfica com padrões externos e com base nos seus tempos de retenção. A consulta bibliográfica e a injeção de uma mistura padrão, bem como dos padrões isolados permitiram conhecer a sequência de eluição de cada composto e o tempo de retenção (TR) característico. A sequência obtida foi, do primeiro para o último padrão, a seguinte: norarmana (TR: 15,9 min), harmana (TR: 16,8 min) e harmalina (TR: 18,4 min). De salientar, no entanto, que os tempos encontrados eram ligeiramente modificados pela temperatura ambiente da sala, embora as oscilações não fossem significativas a ponto de obrigarem ao controlo da temperatura da coluna.

A figura 9 apresenta um cromatograma de uma solução padrão de norarmana, harmana e harmalina nas condições de ensaio anteriormente descritas, sendo visível uma boa resolução dos 2 compostos em estudo e do padrão interno.



**Figura 9:** Cromatograma de uma solução de padrões  
[NH- padrão externo norarmana (100 µg/L)  
H- padrão externo harmana (100 µg/L)  
HL- padrão interno harmalina (860 µg/L)]

A quantificação das duas  $\beta$ -carbolinas foi efectuada pelo método do padrão interno, ou seja, foram preparadas soluções padrão de diferentes concentrações conhecidas dos compostos em estudo, às quais se adicionou a mesma quantidade conhecida de padrão interno, como descrito em Materiais e métodos. Após extracção pela metodologia analítica descrita acima, os padrões extraídos eram injectados, construindo-se com os resultados as curvas de calibração para a norarmana e para a harmana. Estas representam a concentração do composto em função da razão das áreas (área do composto/área do padrão interno) (gráficos 5 e 6).

Os extractos de café, adicionados também de uma mesma quantidade conhecida de padrão interno, foram então analisados no mesmo sistema cromatográfico. Foi calculada do mesmo modo a razão entre as áreas obtidas nos cromatogramas para cada uma das  $\beta$ -carbolinas e convertida na concentração correspondente em µg/L, através das curvas de calibração previamente construídas.

## 2. Revalidação da metodologia analítica das $\beta$ -carbolinas

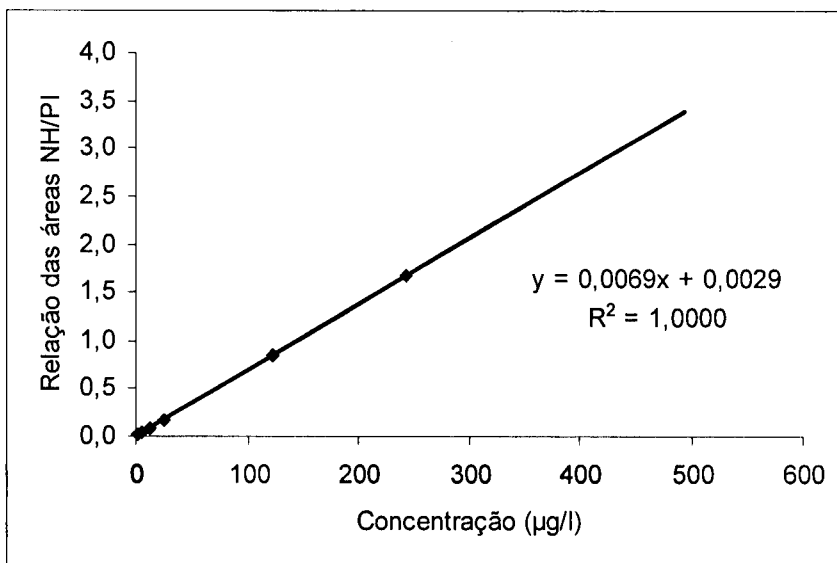
Uma vez que foram efectuadas algumas alterações à técnica de extracção descrita por Herraiz (2002) e foi utilizado um novo sistema cromatográfico, determinaram-se os vários parâmetros de desempenho analítico do método para proceder à sua revalidação (Ribani *et al.*, 2004).

### 2.1. Linearidade e faixa linear dinâmica ou de aplicação

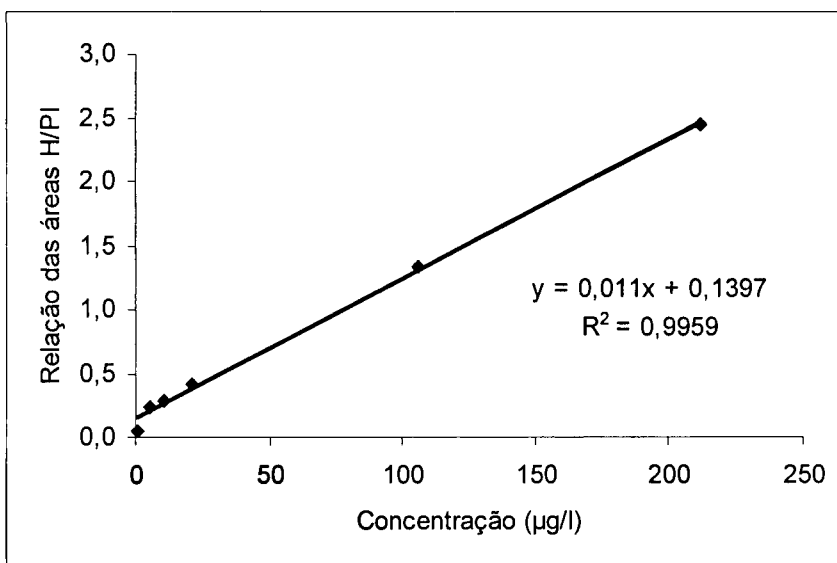
Tal como referido anteriormente, foram preparadas 6 soluções dos padrões de norarmana e harmana, de diferentes concentrações (aproximadamente 200, 100, 20, 10, 5 e 1  $\mu\text{g/L}$ ), adicionados de uma quantidade constante de harmalina. Todas as soluções foram sujeitas a extracção em coluna SPE, tal como se de uma amostra de café se tratasse, efectuou-se a sua injeção em duplicado e construíram-se as curvas de calibração (gráficos 5 e 6).

O estudo de linearidade foi efectuado pela análise do coeficiente de correlação da curva de calibração obtida pela injeção das soluções padrão, anteriormente descritas, que cobriam os valores encontrados em todas as amostras. O coeficiente de correlação apresentou um valor superior a 0,99 para ambas as  $\beta$ -carbolinas, o que evidencia uma boa correlação linear.

**Gráfico 5:** Curva de calibração da norarmana.



**Gráfico 6:** Curva de calibração da harmana.



## 2.2. Precisão

O cálculo da precisão instrumental foi efectuado com base na área média dos picos obtidos em três injeções consecutivas de uma mistura padrão, constituída pelos padrões externos e interno. Como se pode verificar pelos coeficientes de variação indicados na tabela 5, existe uma boa precisão instrumental associada ao método.

**Tabela 5:** Precisão instrumental

Composto	Área média	SD	CV (%)
Norarmana	2471174	12457	0,5
Harmana	3609306	11378	0,3
Harmalina	1477717	6450	0,4

A repetibilidade foi calculada com base na área média dos picos correspondentes a duas extracções simultâneas de uma mesma amostra de café torrado, injectadas em triplicado. Obtiveram-se desta forma resultados com baixo coeficiente de variação, o que demonstra uma boa repetibilidade do método (tabela 6).

**Tabela 6:** Repetibilidade

Composto	Teor médio (µg/g)	SD	CV (%)
Norarmana	2,84	0,03	1,0
Harmana	0,28	0,00	1,1

A metodologia descrita por Herraiz (2002), desenvolvida para a extracção directa de café bebida, apresentava em termos de coeficiente de variação uma repetibilidade (n=4) de 1,57% para a norarmana e 0,87% para a harmana. Após ser modificada no presente trabalho para permitir a extracção de café em grão, a repetibilidade manteve-se praticamente inalterada provando que o método extractivo desenvolvido é igualmente preciso para ambas a  $\beta$ -carbolinas (tabela 6).

### 2.3. Exactidão

De forma a verificar a exactidão do método efectuou-se o estudo de recuperação numa amostra de café torrado. Para isso, foram efectuados dois ensaios de recuperação, adicionando uma quantidade conhecida dos padrões externos (cerca de 20% da quantidade presente na amostra em teste) e uma quantidade fixa de padrão interno à amostra. Para efeitos de cálculo da taxa de recuperação considerou-se a quantidade adicionada dos padrões externos como 100%, sem somar a quantidade pré-existente na amostra.

Os resultados dos ensaios demonstraram que o método apresentava uma boa taxa de recuperação, como se pode verificar na tabela 7, onde se encontram sintetizados.

**Tabela 7:** Taxa de recuperação da norarmana e da harmana

Composto	Recuperação média (%)	SD	CV (%)
Norarmana	101,8	4,8	4,7
Harmana	109,4	0,2	0,2

Herraiz (2002) obteve uma recuperação de  $97,1\% \pm 1,07$  e de  $98,7\% \pm 0,88$ , para a norarmana e harmana, respectivamente. Logo, a recuperação obtida neste trabalho em comparação com a da metodologia descrita por aquele autor mostrou-se similar (tabela 7).

### 2.4. Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e quantificação para cada uma das  $\beta$ -carbolinas estudadas foram calculados como a concentração correspondente a três e dez vezes, respectivamente, o desvio padrão do ruído de fundo do cromatograma de uma amostra de café verde. Os valores obtidos para cada um dos compostos estão indicados na tabela 8.

**Tabela 8:** Limites de detecção e quantificação para a norarmana e harmana

Composto	Limite de detecção (µg/g)	Limite de quantificação (µg/g)
Norarmana	0,008	0,013
Harmana	0,004	0,007

Herraiz (2002) obteve valores menores que 0,5 µg/L de café bebida, para ambas as β-carbolinas, o que corresponde a uma variação aproximada entre os diferentes processos de extração de 0,004 (café expresso) a 0,020 µg/g (café filtro) de café em pó, ou seja, uma sensibilidade semelhante à encontrada neste trabalho.

Com base em todos os parâmetros usados na revalidação da metodologia utilizada neste trabalho, pode dizer-se que esta técnica, comparativamente à descrita por Herraiz (2002) para análise das mesmas β-carbolinas, não em grãos de café moídos mas em café bebida, apresentou uma melhor resolução dos picos cromatográficos (separação com *tailing* praticamente nulo) e precisão, e uma equivalência em termos de exactidão, sensibilidade e selectividade. O único senão foi o aumento do tempo necessário à separação cromatográfica dos compostos.

### 3. Caracterização do grau de torra das amostras

Conforme referido em Material e métodos, foi avaliada a cor por reflectância e calculada a ORL de todas as amostras. Estas determinações visaram caracterizar o seu grau de torra. Os resultados obtidos estão detalhados na tabela 9.

**Tabela 9:** Caracterização do grau de torra pela evolução da ORL e da reflectância com a temperatura de torra (a cinza ORL em %; a branco reflectância em unidades cor)

Espécies	Origens	Amostra	Verde	Torra 240°C	Torra 260°C	Torra 280°C
Arábica	Honduras	A	0,00	10,75	16,84	25,65
				152	125	75
		B	0,00	4,61	7,61	13,04
				187	145	72
		C	0,00	8,18	8,44	21,17
				170	113	61
	D	0,00	5,82	8,50	18,17	
			200	125	65	
	média			7	10	20
				177	127	68
	Guatemala	E	0,00	4,93	10,00	12,78
				182	94	74
		F	0,00	12,87	16,12	17,26
				194	129	93
	média			9	13	15
			188	112	84	
Quênia	G	0,00	11,82	12,28	12,57	
			165	108	107	
	H	0,00	5,98	7,31	12,45	
			167	121	65	
	média			9	10	13
			166	115	86	
Brasil	I	0,00	9,92	9,98	20,01	
			200	157	66	
	J	0,00	10,71	16,80	25,63	
			173	120	90	
média			10	13	23	
			187	139	78	
média espécie			9	11	18	
			179	124	77	
Robusta	Camarões	K	0,00	7,97	10,91	22,54
			197	133	60	
	Angola	L	0,00	11,16	13,26	16,87
			189	138	102	
	Vietname	M	0,00	12,03	13,14	19,36
			186	171	75	
	Índia	N	0,00	4,60	7,59	13,03
			187	143	93	
	Uganda	O	0,00	12,45	14,81	19,65
				200	107	78
		P	0,00	12,82	15,50	16,32
			177	131	65	
Q		0,00	8,77	10,87	12,48	
	194	174	88			
média			11	14	16	
			190	137	77	
média espécie			10	12	17	
			190	142	80	

Como seria de esperar a ORL aumenta com a temperatura da torra em todas as amostras e o valor da reflectância das amostras varia de forma inversa (é superior nas amostras menos torradas e inferior nas mais torradas).

Pode-se verificar ainda a pouca homogeneidade do grau de torra entre as diferentes amostras, inclusivamente nas que pertencem à mesma espécie e origem geográfica, quando sujeitas a torras à mesma temperatura. Este facto, poderá dever-se às características intrínsecas de cada grão, correlacionadas com a espécie, que determinam diferentes composições químicas e características físicas e diferentes alterações quando submetidas a iguais condições de torra. Na verdade, e conforme foi já referido na introdução, nas mesmas condições de torra, ou mesmo em torra simultânea, os grãos de café robusta apresentam-se sempre mais escuros, com um grau de torra efectivo superior.

Por outro lado, observou-se que o torrador utilizado nas torras experimentais não se comportava da mesma forma numa sequência de torras idênticas, necessitando de mais tempo para atingir a temperatura definida no início dos trabalhos. Com efeito, em mais do que uma situação, algumas torras foram repetidas, porque embora se pretendesse uma torra ligeira ou média, e a temperatura estivesse pré-definida para isso, o resultado final era uma torra mais intensa do que a desejada. Este tipo de situação é menos comum nas indústrias, porque utilizam torradores de maiores dimensões, com melhor calibração térmica e porque utilizam repetidamente o mesmo tipo de grãos. No caso descrito, as amostras tinham origens geográficas diferentes requerendo, idealmente, um ajuste inicial da máquina para cada amostra, o que seria inviável dada a baixa quantidade de café verde disponível de cada amostra.

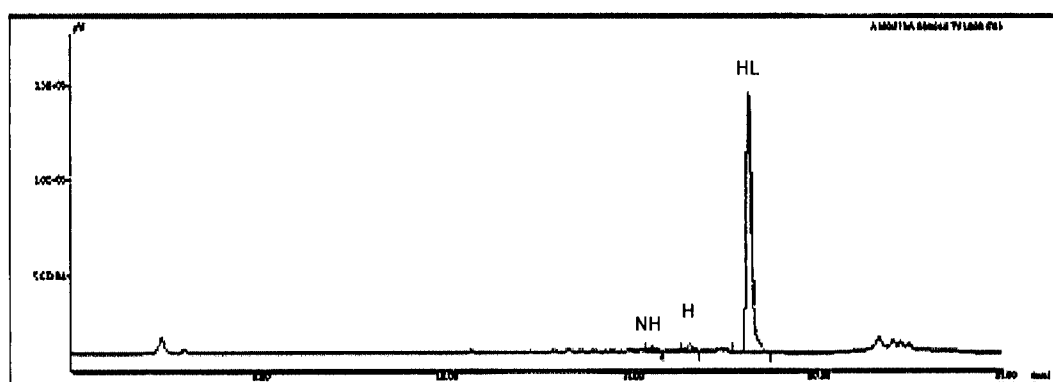
Pelo referido, verificou-se não ser fácil obter homogeneidade entre as amostras, em termos de formação de  $\beta$ -carbólinas e intensidade/grau de torra, mesmo quando de uma mesma origem geográfica se tratava, ainda que pertencessem a lotes diferentes. A determinação do grau de torra realmente obtido e a conversão dos teores quantificados das  $\beta$ -carbólinas para o grau de torra pretendido poderia obviar essa diferença, como será discutido adiante

Para se confirmar se a intensidade de torra obtida para cada amostra era a pretendida para a temperatura utilizada verificou-se visualmente a cor por comparação com a de outras amostras torradas à mesma temperatura.

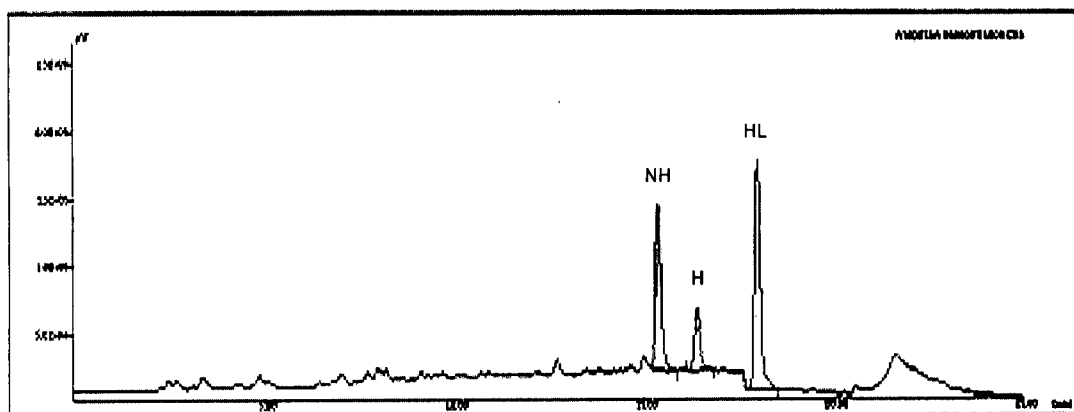
#### 4. Quantificação de norarmana e harmana nas amostras

Com o objectivo de conhecer os teores das  $\beta$ -carbolinas, norarmana e harmana, e a sua variação com a espécie, origem geográfica e temperatura de torra utilizada, foram avaliadas 68 amostras (17 amostras de café verde e 17 x 3 amostras de café torrado), extraídas em duplicado e injectadas em triplicado.

A título de exemplo são apresentados, em seguida, dois cromatogramas, um de uma amostra de café verde (figura 10) e outro de uma amostra de café torrado (figura 11), nos quais se identificam claramente os dois compostos em estudo (norarmana e harmana) e o padrão interno (harmalina).



**Figura 10:** Cromatograma de um extracto de uma amostra de café verde (NH-norarmana; H-harmana; HL-harmalina - PI)



**Figura 11:** Cromatograma de um extracto de uma amostra de café torrado (NH-norarmana; H-harmana; HL-harmalina - PI)

Os resultados obtidos, aplicando a técnica revalidada, descrita anteriormente, encontram-se compilados nas tabelas 10 a 12, na forma de média, desvio-padrão (SD) e coeficiente de variação (CV). Os teores individuais encontram-se detalhados em anexo.

Como se pode verificar, no café verde os valores das duas  $\beta$ -carbolinas, norarmana e harmana, são praticamente residuais e cerca de 2 a 10 vezes superiores ao limite de quantificação. O teor de norarmana e harmana determinado em todas as amostras torradas é bem mais elevado. Quer nos cafés verdes, quer nos torrados, os valores de norarmana são consideravelmente superiores na espécie robusta (tabela 10).

O teor de norarmana de ambas as espécies, assim como o teor de harmana da espécie robusta aumentou com a temperatura de torra, sendo a torra a 280°C a que apresentou o teor máximo. Já o teor de harmana dos cafés arábica teve um comportamento inverso, diminuindo à medida que aumentava a temperatura de torra (tabela 10). A única diferença estrutural entre os dois compostos é um grupo metilo que existe na harmana, podendo este facto justificar a diferença encontrada se durante a torra a norarmana se formar parcialmente por desmetilação da harmana e se essa velocidade de conversão fôr superior à da síntese de harmana a partir dos precursores. No caso do café robusta, esse efeito não é visível pela análise directa dos resultados, podendo no entanto ocorrer, mas a uma velocidade comparativamente inferior em relação à formação de harmana.

Mais especificamente em termos de teores, na torra a 280°C, o café arábica apresentou um valor de norarmana de  $3,26 \pm 0,79$   $\mu\text{g/g}$ , sendo cerca de 3 vezes superior na espécie robusta ( $10,72 \pm 3,38$   $\mu\text{g/g}$ ). Já a harmana está presente em teores bem mais baixos e para a mesma temperatura de torra apresentou valores na ordem dos  $0,44 \pm 0,12$   $\mu\text{g/g}$  e dos  $2,34 \pm 0,94$   $\mu\text{g/g}$ , respectivamente para as espécies arábica e robusta. Na espécie arábica o maior teor de harmana encontrado foi  $0,83 \pm 0,12$   $\mu\text{g/g}$  na torra a 240°C (tabela 10).

Considerando ambas as espécies (arábica e robusta) em conjunto, neste estudo foram encontrados em cafés verdes, valores médios de norarmana na ordem dos  $0,04 \pm 0,00$   $\mu\text{g/g}$  e de harmana na ordem dos  $0,05 \pm 0,01$   $\mu\text{g/g}$ . Em cafés torrados verificou-se uma variação entre  $3,87 \pm 1,24$  e  $6,99 \pm 2,08$   $\mu\text{g/g}$  de café para a norarmana e de  $1,20 \pm 0,36$  a  $1,39 \pm 0,53$   $\mu\text{g/g}$  de café para a harmana (tabela 10).

No estudo de Herraiz (2002) foram reportados valores de norarmana no café verde na ordem dos  $0,097 \pm 0,028 \mu\text{g/g}$  e na ordem dos  $1,11 \pm 0,43 \mu\text{g/g}$  no café torrado. Enquanto que para a harmana foram encontrados valores na ordem dos  $0,025 \pm 0,006 \mu\text{g/g}$  no café verde e na ordem dos  $0,28 \pm 0,09 \mu\text{g/g}$  no café torrado. Verifica-se então, que os valores encontrados neste estudo para o café verde foram em comparação com os obtidos por Herraiz (2002) cerca de 2 vezes inferiores para a norarmana e 2 vezes superiores para a harmana. No caso do café torrado, após ter sido sujeito a 3 diferentes temperaturas (240, 260 e 280°C), foram encontrados teores 3,5 a 6 vezes superiores para a norarmana e 4 a 5 vezes superiores para a harmana (tabela 10), o que se justifica pelo facto de aquele autor ter apenas analisado o café bebida e aqui se analisar o grão na sua totalidade.

Verifica-se também que os valores encontrados para o café torrado estão dentro do intervalo de valores descritos por Tuschlya *et al.* (1999) em outros frutos (caju, noz, amêndoa, ananás e banana). O autor determinou, no conjunto dos frutos (secos e frescos desidratados) analisados, um teor médio de norarmana de 0,55 a 6,79  $\mu\text{g/g}$  e de harmana de 0,33 a 11,9  $\mu\text{g/g}$ , expressos em peso seco. Quer os valores encontrados por Herraiz (2002), quer os encontrados neste estudo, para o café verde, situam-se abaixo dos limites inferiores dos intervalos encontrados por Tuschlya *et al.* (1999).

**Tabela 10:** Evolução do teor de norammana e harmana com a temperatura de torra em cafés arábica e robusta.

Espécies	β-carbolinas	Café verde				Café torrado a 240°C				Café torrado a 260°C				Café torrado a 280°C			
		Média (µg/g)	± SD	CV (%)		Média (µg/g)	± SD	CV (%)		Média (µg/g)	± SD	CV (%)		Média (µg/g)	± SD	CV (%)	
Arábica (n=10)	Norammana	0,03	± 0,00	4,6		2,43	± 0,77	31,6		2,61	± 0,17	6,7		3,26	± 0,79	24,1	
	Harmana	0,03	± 0,00	5,0		0,83	± 0,12	14,1		0,53	± 0,15	28,6		0,44	± 0,12	26,4	
Robusta (n=7)	Norammana	0,06	± 0,01	12,1		5,31	± 1,72	32,4		7,40	± 1,04	14,1		10,72	± 3,38	31,5	
	Harmana	0,07	± 0,02	27,5		1,57	± 0,61	38,7		1,93	± 0,64	32,9		2,34	± 0,94	40,0	
Média (n=17)	Norammana	0,04	± 0,00	8,3		3,87	± 1,24	32,0		5,01	± 0,61	10,4		6,99	± 2,08	27,8	
	Harmana	0,05	± 0,01	16,2		1,20	± 0,36	26,4		1,23	± 0,39	30,7		1,39	± 0,53	33,2	

**Tabela 11:** Evolução do teor de norarmana com a temperatura de torra em cafés de diferentes origens geográficas.

Espécies	Origens	Café verde			Café torrado a 240°C			Café torrado a 260°C			Café torrado a 280°C		
		Média (µg/g)	± SD	CV (%)	Média (µg/g)	± SD	CV (%)	Média (µg/g)	± SD	CV (%)	Média (µg/g)	± SD	CV (%)
Arábica	Honduras (n=4)	0,03	± 0,01	18,5	4,15	± 1,68	40,6	3,36	± 0,60	17,8	5,72	± 2,12	37,0
	Guatemala (n=2)	0,03	± 0,00	11,8	2,13	± 0,04	2,1	2,92	± 0,43	14,7	2,48	± 0,66	26,6
	Quênia (n=2)	0,03	± 0,00	17,4	1,60	± 0,08	4,8	1,83	± 0,36	19,9	2,23	± 1,08	48,6
	Brasil (n=2)	0,03	± 0,01	22,3	1,83	± 0,54	29,3	2,34	± 0,18	7,6	2,63	± 0,30	11,3
Robusta	Camarões (n=1)	0,05	± 0,00	3,0	5,27	± 0,06	1,1	6,59	± 0,12	1,9	7,98	± 0,17	2,1
	Angola (n=1)	0,06	± 0,00	0,9	6,18	± 0,09	1,5	6,60	± 0,03	0,4	7,49	± 0,49	6,6
	Vietname (n=1)	0,05	± 0,00	6,6	3,53	± 0,06	1,8	7,67	± 0,30	4,0	9,88	± 0,31	3,1
	Índia (n=1)	0,06	± 0,00	6,3	6,84	± 0,02	0,3	9,44	± 0,09	0,9	15,92	± 0,79	5,0
	Uganda (n=3)	0,06	± 0,01	15,7	5,11	± 2,38	46,6	7,17	± 0,65	9,1	11,25	± 3,30	29,4

**Tabela 12:** Evolução do teor de harmãna com a temperatura de torra em cafés de diferentes origens geográficas.

Espécies	Origens	Café verde			Café torrado a 240°C			Café torrado a 260°C			Café torrado a 280°C		
		Média (µg/g) ± SD	CV (%)		Média (µg/g) ± SD	CV (%)		Média (µg/g) ± SD	CV (%)		Média (µg/g) ± SD	CV (%)	
Arábica	Honduras (n=4)	0,03 ± 0,01	18,5		0,87 ± 0,32	36,3		0,63 ± 0,04	6,9		0,86 ± 0,30	34,7	
	Guatemala (n=2)	0,04 ± 0,01	21,5		0,87 ± 0,24	27,7		0,63 ± 0,08	12,7		0,34 ± 0,19	54,7	
	Quênia (n=2)	0,03 ± 0,01	19,9		0,80 ± 0,08	10,1		0,48 ± 0,34	72,1		0,27 ± 0,19	71,1	
	Brasil (n=2)	0,02 ± 0,01	39,5		0,79 ± 0,34	43,5		0,41 ± 0,01	1,9		0,29 ± 0,02	5,9	
Robusta	Camarões (n=1)	0,05 ± 0,00	1,1		1,76 ± 0,03	1,8		1,57 ± 0,03	1,7		1,73 ± 0,09	5,2	
	Angola (n=1)	0,10 ± 0,01	9,6		1,10 ± 0,03	2,8		0,82 ± 0,04	4,4		1,14 ± 0,08	7,4	
	Vietname (n=1)	0,06 ± 0,01	10,9		1,03 ± 0,11	10,6		2,40 ± 0,05	2,1		1,78 ± 0,05	2,7	
	Índia (n=1)	0,09 ± 0,00	4,5		2,29 ± 0,01	0,5		2,72 ± 0,11	3,9		3,75 ± 0,28	7,5	
	Uganda (n=3)	0,07 ± 0,00	6,9		1,62 ± 0,76	47,1		2,01 ± 0,32	15,7		2,66 ± 0,65	24,5	

Parece ser de salientar que as torras se encontram agrupadas pela temperatura de torra utilizada e não pelo seu efectivo grau de torra. Em alguns casos, ao cruzar estes dois parâmetros, verificou-se que o grau de torra calculado era característico de uma intensidade diferente (inferior ou superior) da que se esperava obter. Este facto deve-se à diferença de características intrínsecas (composição química e estrutura) dos grãos de diferentes espécies, origens geográficas ou mesmo de diferentes lotes, tal como referido no capítulo da Torra. No que respeita à espécie, por exemplo, o grão de café robusta é caracteristicamente de menores dimensões e tem um menor teor em gordura que o café arábica, dois factores que contribuem para que se apresente comparativamente mais torrado para os mesmos parâmetros de torra que o café arábica. De qualquer forma, o café robusta é usualmente vendido mais torrado que o café arábica já que este último pode perder os aromas característicos, que são a sua maior valia. Este motivo justifica os elevados desvios padrão entre as amostras.

Conforme já referido anteriormente, a formação das  $\beta$ -carbolinas, norarmana e harmana, durante a torra, dado que se utilizam temperaturas muito elevadas, poderá ocorrer por pirólise do triptofano ou das suas aminas biogénicas derivadas (triptamina e 5-hidroxitriptamina), presentes no café verde (Cirilo, 2003, Casal *et al.*, 2004). Apesar das duas espécies se caracterizarem por teores idênticos de aminoácidos livres no café verde, a realidade é que o café robusta apresenta praticamente o dobro da quantidade de triptofano (337,7 mg/kg de peso seco no robusta contra 178,8 mg/kg de peso seco no arábica) (Casal, 2003). Relativamente às duas aminas biogénicas também envolvidas na síntese dos compostos em estudo, embora elas tenham como precursor biossintético comum o triptofano, não há diferenças nos seus teores no grão de café verde nas duas espécies, sendo o seu comparativamente ao do precursor muito reduzido. Logo, parece possível concluir que será essencialmente o triptofano a origem da diferença de teores de  $\beta$ -carbolinas entre as duas espécies.

Verifica-se, portanto, que os teores de norarmana são sempre superiores aos de harmana (3 a 7 vezes superiores para os cafés arábica e 3 a 5 vezes superiores para os robusta). É também visível que esta diferença entre os teores das duas  $\beta$ -carbolinas em cada espécie aumenta progressivamente com a temperatura a que decorre a torra, sendo as maiores diferenças encontradas na torra a 280°C. É igualmente notório que a diferença entre os teores é superior nos cafés arábica, no

caso das torras a 260°C (na ordem de 5 vezes superior para os cafés arábica e 4 vezes superior para os robusta) e a 280°C (na ordem de 7 vezes superior para os cafés arábica e 5 vezes superior para os robusta). No caso da torra a 240°C, a diferença entre os teores é menos significativa, sendo ligeiramente superior nos cafés robusta (na ordem de 3,4 vezes superior para os cafés robusta e 2,9 vezes superior para os arábica) (tabela 10).

Relativamente à evolução dos teores de norarmana ao longo da torra (dos 240°C até aos 280°C), verifica-se um aumento crescente e contínuo em todas as origens geográficas de ambas as espécies, com exceção dos arábicas das Honduras e Guatemala, nos quais a evolução nem sempre se dá no mesmo sentido (tabela 11).

Analisando em pormenor o teor de norarmana determinado nos cafés torrados das diferentes origens geográficas de ambas as espécies (tabela 11), verifica-se que:

- Na espécie arábica, o café das Honduras é o que apresenta um teor superior de norarmana, seguido do Brasil, Guatemala, e por fim Quênia, na torra a 280°C. No caso dos cafés do Quênia e da Guatemala (torra a 280°C) o grau de torra final determinado, quer pelo cálculo da ORL (13% e 15%, respectivamente) quer por fotometria de IV (86 e 84 unidades cor, respectivamente), foi ligeiramente inferior aos restantes arábicas (tabela 9), o que poderá justificar os teores inferiores de  $\beta$ -carbólinas; o grau de torra, obtido por avaliação fotométrica, para o café das Honduras (68 unidades cor) é superior ao do Brasil (78 unidades cor), enquanto que por cálculo da ORL há uma troca de posição dos graus de torra entre os mesmos cafés (23 unidades cor para o café do Brasil e 20 unidades cor para o Honduras). De salientar que estes valores correspondem a médias por origem geográfica, com elevados desvios padrões conforme referido, e que individualmente se verifica sempre uma melhor correlação (anexo);
- Na espécie robusta, apenas o café da Índia se manteve na mesma posição em termos de teor ao longo da torra, apresentando o teor mais elevado em todas as temperaturas de torra (tabela 11). De salientar que o café desta origem geográfica, apesar de apresentar os maiores teores de norarmana em todas as torras, foi o que teve a menor ORL (tabela 9). Verifica-se ainda que o aumento do teor de norarmana não ocorre na mesma proporção nos cafés das diferentes origens geográficas. O maior incremento com a torra, comparando a evolução

ocorrida entre as torras a 240°C e a 280°C, verifica-se no café robusta do Vietname (os teores aumentam 2,8 vezes). Os cafés da Índia e Uganda têm, entre si, incrementos da mesma ordem de grandeza (2,3 e 2,2 vezes), bem como os cafés dos Camarões e Angola (1,2 e 1,1 vezes). Considerando-se os incrementos referidos verifica-se que o café de Angola é o que apresenta valores mais estáveis de norarmana, ao longo das diferentes temperaturas de torra, sendo portanto menos susceptível à temperatura, seguindo-se o café dos Camarões. Os cafés do Uganda e da Índia, embora apresentando teores diversos deste composto, têm mais susceptibilidade à temperatura do que os anteriores. O café do Vietname é de todos os cafés analisados o mais susceptível à torra.

Comparando os incrementos dos teores de norarmana e a susceptibilidade à temperatura dos cafés ao longo da torra, até aos 280°C, com os graus de torra obtidos pela análise fotométrica verifica-se que:

- O café de Angola era o menos torrado (102 unidades cor), o que poderá confirmar o menor incremento dos teores de norarmana;
- O café da Índia apresentou um grau de torra (93 unidades cor) próximo do café da Angola, apesar do incremento de norarmana ter sido metade do primeiro;
- A amostra proveniente dos Camarões é a que apresentou maior grau de torra (60 unidades cor), ainda que tenha demonstrado um incremento de norarmana equivalente ao café de Angola, o menos torrado;
- Os cafés do Uganda e Vietname apresentam graus de torra bastante similares (77 e 75 unidades cor, respectivamente), ainda que tenham demonstrado incrementos de norarmana diferentes.

Pelo referido parece possível inferir que os teores de  $\beta$ -carbolinas nos diferentes cafés não estão apenas dependentes do grau de torra.

Relativamente à evolução dos teores de harmana há um comportamento diferente entre as duas espécies de café em estudo. Verifica-se que nos cafés arábica os teores decrescem de forma progressiva e contínua com o aumento da temperatura a que decorre a torra, à excepção do café das Honduras que tem um comportamento completamente diferente das restantes amostras arábica. Neste caso (Honduras), os teores atingidos são semelhantes nas torras a 240°C e a 280°C e apenas ocorre um decréscimo na torra a 260°C (tabela 12).

Ao longo das 3 torras, os cafés arábica das Honduras e da Guatemala apresentam sempre os maiores valores de harmana e os cafés arábica do Quênia e do Brasil os menores. Na torra a 260°C, o teor dos dois pares aproxima-se e destacam-se claramente dois grupos: o grupo dos cafés das Honduras e da Guatemala com 0,63 µg/g e o grupo dos cafés do Quênia e do Brasil com uma média de 0,45 µg/g. No entanto, os teores médios destes cafés arábica de 4 origens diferentes eram similares na torra anterior (torra a 240°C), variando entre 0,79 e 0,87 µg/g. Na torra a 280°C, o café das Honduras passa a destacar-se dos das restantes origens, apresentando teores cerca de 3 vezes superiores aos teores dos restantes cafés.

Em oposição à generalidade dos arábicas, nos cafés robusta da Índia e do Uganda verifica-se um aumento crescente e contínuo do teor de harmana com a temperatura de torra, apresentando valores superiores nas torras a temperaturas mais elevadas, comportamento similar ao anteriormente verificado na evolução do teor de norarmana para as mesmas amostras. São estas as amostras mais ricas em ambos os compostos. Os cafés robusta dos Camarões e Angola têm um comportamento muito semelhante ao descrito para o café das Honduras, ou seja, na torra a 280°C os teores de harmana determinados são semelhantes aos obtidos a 240°C e na torra a 260°C o teor é mais baixo do que nas restantes torras. Já o café robusta do Vietname tem um comportamento atípico, comparativamente com o descrito em todos os robustas anteriores e arábicas, ou seja, é a única amostra em que há maior formação de harmana a 260°C (um incremento de 2,3 vezes comparativamente a 240°C), reduzindo os teores de forma acentuada na torra a 280°C.

Mais uma vez se verifica que não é apenas a temperatura de torra que influi no teor de β-carbolinas presentes nos grãos de café. Uma possível explicação será a diferente velocidade de formação da harmana, a partir dos precursores, e da sua conversão em norarmana. No caso do robusta do Vietname, até se atingir a torra a 280°C a velocidade de formação do harmana deverá ser superior à de conversão em norarmana, situação que possivelmente se inverterá assim que é atingida aquela temperatura. No caso dos robusta dos Camarões e Angola e arábica das Honduras, inicialmente, na torra a 240°C, a formação de harmana dar-se-á a uma velocidade maior do que a sua conversão em norarmana, situação que se reverterá na torra a 260°C e por fim, na torra a 280°C, será retomada a relação inicial. Na origem destas

diferentes velocidades poderão estar simplesmente diferentes teores de precursores, nomeadamente triptofano.

Para verificar as relações entre os teores das duas  $\beta$ -carbolinas e entre estas e a ORL, nas amostras arábica e robusta consideradas quer separadamente (duas amostras), quer como um conjunto (amostra única), e como complemento à análise anterior, foi ainda efectuado:

- (i) O estudo estatístico das correlações entre os diferentes pares possíveis de variáveis (tabelas 13, 14 e 15 e figuras correspondente 12, 13 e 14);
- (ii) O estudo da regressão da ORL (variável dependente) em ordem aos teores de  $\beta$ -carbolinas (variáveis independentes), através de testes t de *student* (tabelas 16, 17 e 18) e de testes F de Snédécór ou análises de variância à regressão (tabelas 19, 20 e 21) (Dagnelie, 1974; Pike, 1986).

O teste t de *student* consiste em avaliar se o coeficiente de regressão da ORL em relação às  $\beta$ -carbolinas, tal como obtido a partir das observações experimentais, é ou não significativamente diferente de zero - nulidade do coeficiente de regressão. A um coeficiente de regressão nulo corresponde uma impossibilidade de prever a ORL a partir dos teores de  $\beta$ -carbolinas. Se se verificar que esse coeficiente de regressão não é nulo, então deve concluir-se que existe uma relação entre as variáveis e que existe também a possibilidade de efectuar previsões da ORL, facto que poderá ser interessante numa perspectiva de controlo da qualidade da torra do café.

No caso de um coeficiente de regressão não nulo, então recorre-se à análise de variância e ao coeficiente de determinação, que comparam os valores previstos pela recta de regressão para a variável dependente com os valores realmente observados na prática, e pode-se avaliar a precisão da previsão efectuada através da regressão. De um modo geral, quanto mais significativo for o valor F de Snédécór e quanto mais perto da unidade for o valor  $R^2$ , maior é a precisão da previsão da ORL com ambas as  $\beta$ -carbolinas.

As análises efectuadas são todas lineares (tanto as correlações como as regressões), embora se possa especular que a relação entre estes parâmetros poderá não ser linear. Contudo, discutir possíveis não linearidades em face dos dados práticos existentes poderá conduzir a conclusões erradas, pois necessitar-se-ia que houvesse bastantes mais observações práticas e/ou muitas repetições para

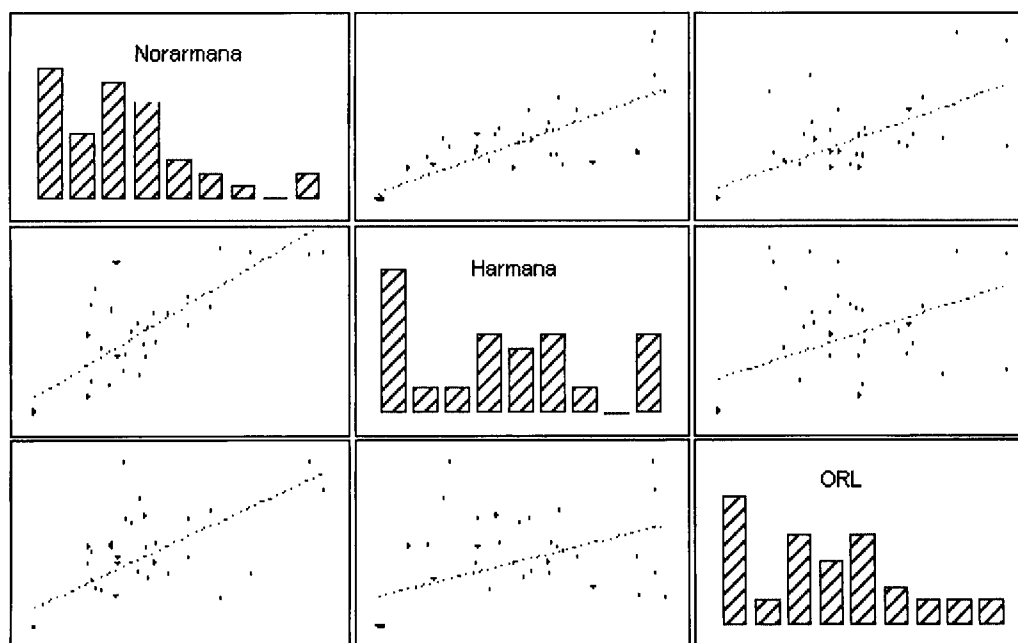
os dados existentes. Assim, neste trabalho optou-se por discutir apenas a linearidade das relações.

De uma forma geral, verificou-se que existe uma correlação entre a ORL e os níveis de  $\beta$ -carbolinas em cada uma das espécies de café consideradas separadamente. Essa relação consiste num aumento de norarmana e harmana com a ORL, quer na espécie arábica (tabela 13 e figura 12) quer na robusta (tabela 14 e figura 13). Esse aumento é mais notório no caso da norarmana (correlação norarmana: ORL de 0,72 para a espécie arábica e de 0,75 para a espécie robusta). Considerando todas as observações existentes (arábicas e robustas) como uma amostra única, verifica-se que a correlação diminui (tabela 15 e figura 14).

Como já foi evidenciado, os dados são muito variáveis, não só entre espécies (arábica e robusta), como dentro de cada espécie, e inclusivé dentro de diferentes amostras de uma mesma espécie e com a mesma origem geográfica. Tal pode dever-se ao facto de serem produtos vegetais com características intrínsecas próprias e sujeitos a diferentes modos de cultura, consoante o local onde são cultivados, entre outros factores. Para além disso, a torra é também responsável, pois podem ocorrer muito facilmente variações de temperatura durante este processo em equipamentos à escala piloto, como o utilizado neste trabalho experimental, e que não serão tão frequentes em torradores industriais. Na situação concreta, a principal dificuldade encontrada foi a de efectuar controlo da temperatura de torra, pois não existia um termómetro interno (sonda) que registasse a evolução da temperatura ao longo do processo e verificou-se que de torra para torra existiam aparentemente grandes variações da temperatura interna do torrador, para a mesma selecção de temperatura no termóstato.

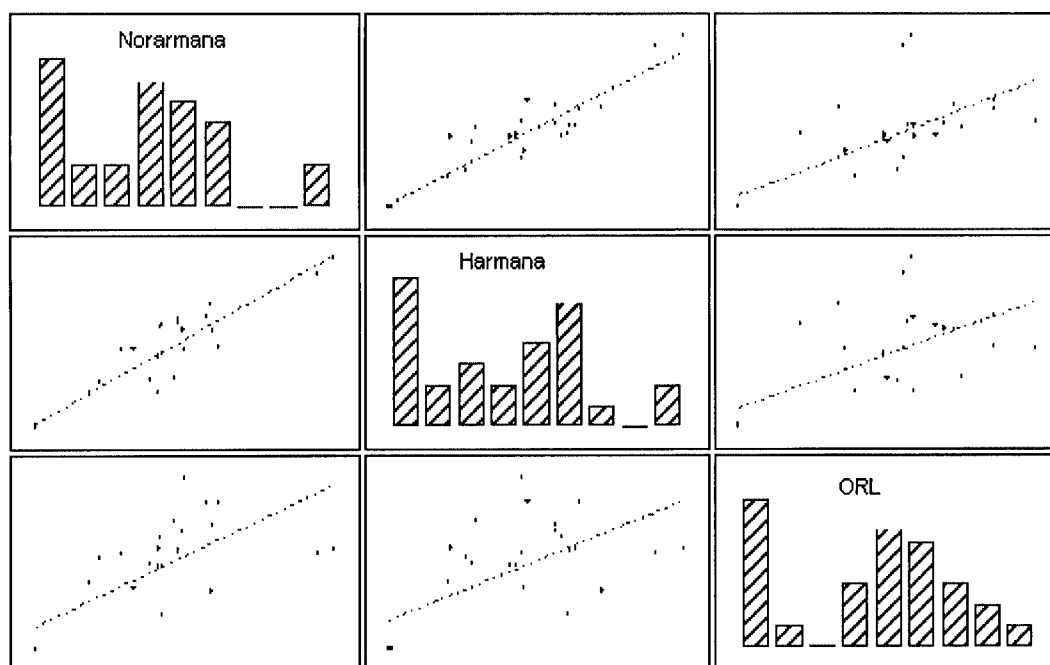
**Tabela 13 e figura 12:** Coeficientes de correlação entre os diferentes pares de variáveis para os cafés arábica

	Norarmana	Harmana	ORL
Norarmana	1,000000	0,807768	0,715398
Harmana	0,807768	1,000000	0,489978
ORL	0,715398	0,489978	1,000000



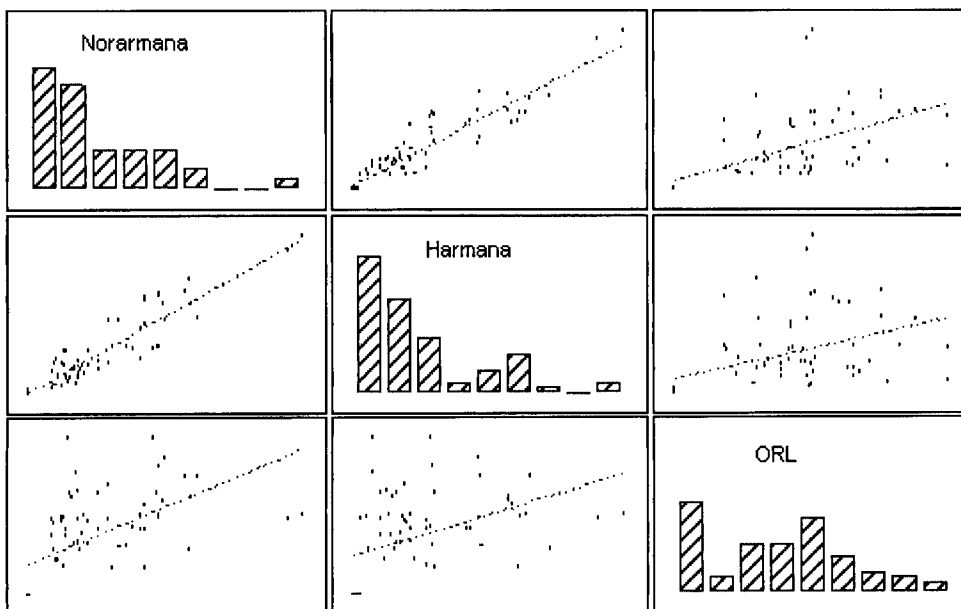
**Tabela 14 e figura 13:** Coeficientes de correlação entre os diferentes pares de variáveis para os cafés robusta

	Norarmana	Harmana	ORL
Norarmana	1,000000	0,936783	0,747770
Harmana	0,936783	1,000000	0,660021
ORL	0,747770	0,660021	1,000000



**Tabela 15 e figura 14:** Coeficientes de correlação entre os diferentes pares de variáveis para as 2 espécies de cafés consideradas em conjunto

	Norarmana	Harmana	ORL
Norarmana	1,000000	0,930984	0,597761
Harmana	0,930984	1,000000	0,447804
ORL	0,597761	0,447804	1,000000



No que diz respeito à correlação entre os teores de norarmana e harmana verifica-se que ela é elevada nos cafés robusta (tabela 14 e figura 13), mas menor nos arábica (tabela 13 e figura 12). No entanto, quando se analisa o conjunto das duas espécies, verifica-se que a correlação melhora substancialmente, o que se deve essencialmente ao aumento do número de cafés analisados e conseqüentemente de graus de liberdade (tabela 15 e figura 14). No entanto, verifica-se que o aumento da correlação entre as  $\beta$ -carbolinas ao associar as duas espécies é acompanhado por uma diminuição da capacidade de previsão do grau de torra, ou seja, o nível de significância diminui (tabelas 16, 17 e 18), assim como da diminuição da precisão dessa previsão, visto o valor de  $R^2$  também sofrer redução (tabelas 19, 20 e 21).

**Tabela 16:** Teste t de *student* à regressão da ORL em ordem às  $\beta$ -carbolinas para os cafés arábica

	$\beta$	Erro padrão de $\beta$	B	Erro padrão de B	t(38)	Nível de significância (p)
Norarmana	0,953060	0,196359	3,77709	0,778194	4,85366	0,000021
Harmana	-0,068107	0,196359	-1,33960	3,862197	-0,34685	0,730617

**Tabela 17:** Teste t de *student* à regressão da ORL em ordem às  $\beta$ -carbolinas para os cafés robusta

	$\beta$	Erro padrão de $\beta$	B	Erro padrão de B	t(38)	Nível de significância (p)
Norarmana	1,066799	0,380228	1,75241	0,624593	2,80568	0,009382
Harmana	-0,154421	0,380228	-1,01748	2,505338	-0,40613	0,687973

**Tabela 18:** Teste t de *student* à regressão da ORL em ordem às  $\beta$ -carbolinas para as 2 espécies de cafés

	$\beta$	Erro padrão de $\beta$	B	Erro padrão de B	t(38)	Nível de significância (p)
Norarmana	1,419732	0,258353	3,25557	0,592428	5,49531	0,000001
Harmana	-0,610412	0,258353	-5,81653	2,461812	-2,36270	0,021099

**Tabela 19:** Análise da variância da regressão para os cafés arábica

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	Nível de significância (p)
<b>Regressão</b>	4506,168	2	2253,084	72,64419	0,000000
<b>Residual</b>	1178,583	38	31,015		
<b>Total</b>	5684,750				

Resumo de regressão para a variável dependente (ORL):

$R = 0,89032378$ ;  $R^2 = 0,79267643$ ;  $R^2$  ajustado = 0,78176466

$F(2,38) = 72,644$ ;  $p < 0,00000$ ; Erro padrão do estimado = 5,5691

**Tabela 20:** Análise da variância da regressão para os cafés robusta

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	Nível de significância (p)
<b>Regressão</b>	3346,591	2	1673,296	68,01904	0,000000
<b>Residual</b>	639,610	26	24,600		
<b>Total</b>	3986,202				

Resumo de regressão para a variável dependente (ORL):

$R = 0,91626628$ ;  $R^2 = 0,83954390$ ;  $R^2$  ajustado = 0,82720113

$F(2,26) = 68,019$ ;  $p < 0,00000$ ; Erro padrão do estimado = 4,9599

**Tabela 21:** Análise da variância da regressão para as 2 espécies de cafés

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	Nível de significância (p)
<b>Regressão</b>	6890,639	2	3445,319	81,78615	0,000000
<b>Residual</b>	2780,313	66	42,126		
<b>Total</b>	9670,952				

Resumo de regressão para a variável dependente (ORL):

$R = 0,84410240$ ;  $R^2 = 0,71250886$ ;  $R^2$  ajustado = 0,70379701

$F(2,66) = 81,786$ ;  $p < 0,00000$ ; Erro padrão do estimado = 6,4905

Estes resultados indicam-nos que se se aumentar o número de cafés estudados dentro de cada espécie, será possível confirmar melhores correlações entre as  $\beta$ -carbolinas e também entre estas e o grau de torra, sendo eventualmente possível construir um bom modelo para a previsão do grau de torra em função dos níveis de  $\beta$ -carbolinas detectados, mantendo, obviamente, um modelo para cada espécie, o que será extremamente importante numa perspectiva de controlo de qualidade da torra. O aumento do número de observações poderá viabilizar o estabelecimento de modelos não lineares e com melhor capacidade de previsão.

## Conclusão

A metodologia utilizada neste trabalho, para a análise das  $\beta$ -carbolinas, norarmana e harmana, em café, foi adaptada de Herraiz (2002), de forma a permitir a análise de café em grão. Simultaneamente o sistema cromatográfico foi também alterado, o que levou a que toda a metodologia fosse revalidada, tendo-se demonstrado robusta e adequada à análise pretendida. O baixo limite de quantificação atingido permitiu quantificar com rigor as amostras de café verde, onde os teores são muito reduzidos.

Os teores encontrados no café verde são equivalentes aos descritos para outros vegetais, da ordem dos 0,04  $\mu\text{g/g}$  para as duas  $\beta$ -carbolinas. Os teores no café torrado são substancialmente superiores aos descritos na literatura, entre 3,87 e 6,99  $\mu\text{g/g}$  para a norarmana e 1,20 e 1,39  $\mu\text{g/g}$  para a harmana, o que se explica pelo facto de nesses trabalhos apenas terem sido avaliados os teores no café bebida, enquanto que no presente trabalho se procedeu a uma extracção exaustiva dos grãos com o objectivo de conhecer o teor total das  $\beta$ -carbolinas, independentemente do processo de extracção do café bebida.

Na generalidade, a espécie robusta, quer verde quer torrada a diferentes temperaturas, comparativamente com a arábica, apresenta sempre um teor muito superior de ambas as  $\beta$ -carbolinas. A origem desta diferença poderá estar no teor superior de triptofano na espécie robusta, conforme descrito na literatura.

No que respeita à relação dos teores de norarmana e harmana com o grau de torra, foi possível confirmar estatisticamente o aumento do teor de  $\beta$ -carbolinas, especialmente de norarmana, principalmente se consideradas as duas espécies de café separadas. Quando consideradas as duas espécies em conjunto, a correlação é inferior, assim como a capacidade de prever o grau de torra, mas a correlação entre os teores das duas  $\beta$ -carbolinas apresenta-se superior. Demonstrou-se assim a necessidade de aumentar o número de cafés estudados dentro de cada espécie, de forma a confirmar as correlações entre as  $\beta$ -carbolinas e também entre estas e o grau de torra.

As conclusões deste trabalho devem ser um ponto de partida para estudos futuros. Para que os resultados apresentados fossem mais consistentes seria também importante:

- Analisar amostras de mais origens geográficas;
- Efectuar torras devidamente controladas em todos os parâmetros (tempo, temperatura, pressão, ...) bem como uma maior gama de torras, utilizando para isso um de dois métodos: temperaturas de torra diferentes e um período tempo constante ou uma temperatura constante, variando apenas o tempo.
- Determinar a evolução dos teores de precursores, especialmente de triptofano, e também das tetraidro- $\beta$ -carbolinas (TH $\beta$ C's) e dos ácidos carboxílicos das tetraidro- $\beta$ -carbolinas (TH $\beta$ CA's), ao longo da torra;
- Avaliar as condições a que as amostras foram sujeitas em toda a cadeia desde do cultivo até à análise, nomeadamente o processamento a seco ou a húmido que pode influenciar os teores dos precursores;
- Avaliar as condições a que as amostras foram sujeitas em toda a cadeia desde do cultivo até ao momento da análise;
- De forma a avaliar a ingestão concreta por parte do consumidor, será também interessante determinar o teor de ambas as  $\beta$ -carbolinas em café bebida obtido a partir de grãos de diferentes origens geográficas, misturas, moagens e processos/condições de extracção (temperatura, tempo, quantidade de água).

---

**Bibliografia**

Adachi, J., Mizoi, Y., Naito, T., Yamamoto, K., Fujiwara, S., Ninomiya, I., Determination of  $\beta$ -carbolines in foodstuffs by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography*, 538, 331-339, **1991**.

Adachi, J., Asano, M., Ueno, Y., Tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acids and contaminants of L-tryptophan, *Journal of Chromatography A*, 881, 501-510, **2000**.

Ancolio, C., Azas, N., Mahiou, V., Ollivier, E., Di Giorgio, C., Keita, A., Timon-David, P., Balansard, G., Antimalarial activity of extracts and alkaloids isolated from six plants used in traditional medicine in Mali and São Tome, *Phytotherapy Research*, 16, 646-649, **2002**.

Ascherio, A., Weisskopf, M. G., O'Reilly, E. J., McCullough, M. L., Calle, E. E., Rodriguez, C., Thun, M. J., Coffee consumption, gender, and Parkinson's disease mortality in the cancer prevention study II cohort: the modifying effects of estrogen, *American Journal of Epidemiology*, 160(10), 977-984, **2004**.

Balón, M., Guardado, P., Muñoz, M. A., Carmona, C., A Spectroscopy Study of the Hydrogen Bonding and  $\pi$ - $\pi$  stacking interactions of Harmane with Quinoline, *Biospectroscopy*, 4, 185-195, **1998**.

Baum, S. S., Hill, R., Rommelspacher, H., Harman-induced changes of extracellular concentrations of neurotransmitters in the nucleus accumbens of rats, *European Journal of Pharmacology*, 314, 75-82, **1996**.

Boeira, J. M., Viana, A. F., Picada, J. N., Henriques, J. A. P., Genotoxic and recombinogenic activities of the two  $\beta$ -carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutation Research*, 500, 39-48, **2002**.

Bonnet, R., Pavlovic, S., Lehmann, J., Rommelspacher, H., The strong inhibition of triosephosphate isomerase by the natural  $\beta$ -carbolines may explain their neurotoxic actions, *Neuroscience*, 127, 443–453, **2004**.

Brown, I., Does caffeine protect against Parkinson's disease? A preliminary study, *Nutrition and Food Science*, 32 (6), 227-230, **2002**.

Cao, R., Chen, H., Peng, W., Ma, Y., Hou, X., Guan, H., Liu, X., Xu, A., Design, synthesis and in vivo antitumor activities of novel  $\beta$ -carboline derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 40, 991-1001, **2005**.

Cárdenes, L., Ayala, J. H., Afonso, A. M., González, V., Solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the analysis of heterocyclic aromatic amines, *Journal of Chromatography A*, 1030, 87-93, **2004**.

Casal, S. Alves, M.R., Mendes, E., Oliveira, M., Ferreira, M.A., Discrimination between arabica and robusta coffee species o the basis of their amino acid enantiomers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6495-6501, **2003**.

Casal, S., Compostos nitrogenados do café - desenvolvimento de metodologias analíticas e sua aplicação na discriminação de espécies e no controlo da intensidade da torra [Tese de doutoramento], Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 2004.

Casal, S., Mendes, E., Alves, M.R., Alves, R.C., Oliveira, M., Ferreira, M., Free and Conjugated biogenic amines in green and roasted coffee beans, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6188-6192, **2004**.

Casal, S., Mendes, E., Oliveira, M.B.P.P. & Ferreira, M.A., Roast effects on coffee amino acid enantiomers, *Food Chemistry*, 89, 333-340, **2005**.

Charrier, A. & Berthaud, J., Botanical Classification of Coffee, In: Clifford, M. N. & Willson, K. C. eds, *Coffee-Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*, London, New York e Sydney: Croom Helm, 13-47, **1985**.

---

Chen, B. H., Chiu, C. P., Analysis, Formation and Inhibition of Heterocyclic Amines in Food: An Overview, 6 (4), 625-636, **1998**.

Chen, J.-F., Xu, K., Petzer, J. P., Staal, R., Xu, Y.-H., Beilstein, M. *et al.*, Neuroprotection by caffeine and A<sub>2A</sub> adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease, *Journal of Neuroscience*, 21(10), RC143, **2001**.

Cheng, J. & Mitchelson, K. R., Improved separation of six harmaine alkaloids by high-performance capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 761, 297-305, **1997**.

Cirilo, M. P. G., Coelho, A. F. S., Araújo, C. M., Gonçalves, F. R. B., Nogueira, F. D., Glória, M. B. A., Profile and levels of bioactive amines in green and roasted coffee, *Food Chemistry*, 82 (3), 397-402, **2003**.

Clarke, R. J., Roasting and grinding, In: Clarke, R. J. & Macrae, R., eds., *Coffee Volume 2: Technology*, London: Elsevier Science Publishers, 73-107, **1987**.

Clifford, M. N., Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products, In: Clifford, M. N. & Willson, K. C. eds, *Coffee-Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*, London, New York e Sydney: Croom Helm, 305-374, **1985**.

Collins, M. A., Alkaloids, alcohol and Parkinson's disease, *Parkinsonism and Related Disorders*, 8, 417-422, **2002**.

Collins, M. A. & Neafsey, E. J., Potential neurotoxic "agents provocateurs" in Parkinson's disease, *Neurotoxicology and Teratology*, 24, 571-577, **2002**.

Cooper, E. J., Hudson, A. L., Parker, C. A., Morgan, N. G., Effects of the  $\beta$ -carbolines, harmaine and pinoline, on insuline secretion from isolated human islets of Langerhans, *European Journal of Pharmacology*, 482, 189-196, **2003**.

---

Corrao, G., Zambon, A., Bagnardi, V., D'Amicis, A., Klatsky, A., Collaborative Sidecir Group. Coffee, Caffeine, and the Risk of Liver Cirrhosis, *Annals of Epidemiology*, 11 (7), 458–465, **2001**.

Correia, A. M., Tecnologia de Campo, In: Correia, A. M. ed., *Manual da Tecnologia do Café*, Porto: Cultivar, 23-66, **1995a**.

Correia, A. M., Torra do Café, In: Correia, A. M. ed., *Manual da Tecnologia do Café*, Porto: Cultivar, 67-80, **1995b**.

Dagnelie, P., *Estatística - Teoria e métodos*, Volume 2, Mem Martins: Publicações Europa-América Lda, Biblioteca Universitária, 309-377, **1974**.

Dardonville, C. & Rozas, I., Imidazoline binding sites and their ligands: na overview of the different chemical structures, *Medical Research Reviews*, 24 (5), 639-661, **2004**.

De Barros Melo, W. L., CT 58: A importância da informação sobre o grau de torra do café e sua influência nas características organolépticas da bebida, *Embrapa Instrumentação Agropecuária*, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, São Paulo, 1ª edição, **2004**.

Di Giorgio, C., Delmas, F., Ollivier, E., Elias, R., Balansard, G., Timon-David, P., In vitro activity of the  $\beta$ -carboline alkaloids harmane, harmine and harmaline toward parasites of the species *Leishmania infantum*, *Experimental Parasitology*, 106, 67-74, **2004**.

Dorfner, R. Thomas Ferge, Chahan Yeretian, Antonius Kettrup, and Ralf Zimmermann, Laser Mass Spectrometry as On-Line Sensor for Industrial Process Analysis: Process Control of Coffee Roasting, *Annals of Neurology*, 76 (1), 1386-1402, **2004**.

---

Farzin, D. & Mansouri, N., Antidepressant-like effect of harmaline and other  $\beta$ -carbolines in the mouse forced swim test-article in press, *European Neuropsychopharmacology*, **2005**.

Fay, L. B., Ali, S., Gross, G. A., Determination of heterocyclic aromatic amines in food products: automation of the sample preparation method prior to HPLC and HPLC-MS quantification, *Mutation Research*, 376, 29-35, **1997**.

Funayama, Y., Nishio, K., Wakabayashi, K., Nagao, M., Shimoi, K., Ohira, T. *et al.*, Effects of  $\gamma$  and  $\beta$ -carboline derivatives on DNA topoisomerase activities, *Mutation Research*, 349, 183-191, **1996**.

Gearhart, D. A., Neafsey, E. J., Collins, M. A., Characterization of Brain  $\beta$ -carboline-2-N-Methyltransferase, An Enzyme That May Play a Role in Idiopathic Parkinson's Disease, *Neurochemical Research*, 22 (2), 113-121, **1997**.

Gearhart, D. A., Collins, M. A., Lee, J. M., Neafsey, E. J., Increased  $\beta$ -carboline 9 N-methyltransferase activity in the frontal cortex in Parkinson's disease, *Neurobiology of Disease*, 7, 201-211, **2000**.

Gearhart, D. A., Neafsey, E. J., Collins, M. A., Phenylethanolamine N-methyltransferase has  $\beta$ -carboline 2N-methyltransferase activity: hypothetical relevance to Parkinson's disease, *Neurochemistry International*, 40, 611-620, **2002**.

Gonçalves, R., A Chave da Qualidade, In: Gonçalves, R. ed., *Histórias com sentidos*, Lisboa: Terramar, 53-58, **2002**.

Gray, J., Caffeine, coffee and health, *Nutrition and Food Science*, 6, 314-319, **1998**.

Gross, G. A. & Gruter, A., Quantification of mutagenic/carcinogenic heterocyclic aromatic amines in food products, *Journal of Chromatography*, 592, 271-278, **1992**.

---

Hernán, M. A., Takkouche, B., Caamaño-Isorna, F., Gestal-Otero, J. J., A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease, *Annals of Neurology*, 52(3), 276-284, **2002**.

Herraiz, T., Analysis of the bioactive alkaloids tetrahydro- $\beta$ -carboline and  $\beta$ -carboline in food, *Journal of Chromatography A*, 881, 483-499, **2000**.

Herraiz, T., Identification and occurrence of the bioactive  $\beta$ -carbolines norharman and harman in coffee brews, *Food Additives and Contaminants*, 19 (8), 748-754, **2002**.

Herraiz, T. & Chaparro, C., Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke:  $\beta$ -carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 326, 378-386, **2005**.

Herraiz, T. & Chaparro, C., Human monoamine oxidase enzyme inhibition by coffee and  $\beta$ -carbolines norharman and harman isolated from coffee, *Life Sciences*, 78, 795 - 802, **2006**.

Illy, A. & Viani, R., The Plant, In: Illy, A. & Viani, R. eds., *Espresso Coffee-The Chemistry of Quality*, London: Academic Press, 9-38, **1995a**.

Illy, A. & Viani, R., The Raw Bean, In: Illy, A. & Viani, R. eds., *Espresso Coffee-The Chemistry of Quality*, London: Academic Press, 39-86, **1995b**.

ISO 3509, Coffee and its products – Vocabulary, **1989**.

Kawachi, I, Willett, W. C., Colditz, G.A., Stampfer, M. J., Speizer, F.E., A prospective study of coffee drinking and suicide in women, *Archives of Internal Medicine*, 156 (5), 521-525, **1996**.

Khan, S. I., Abourashed, E. A., Khan, I. A., Walker, L. A., Transport of harman alkaloids across caco-2 cell monolayers, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52 (4), 394-397, **2004**.

---

Knize, M. G., Felton, J. S., Gross, G. A., Chromatographic methods for the analysis of heterocyclic amine food mutagens/carcinogens, *Journal of Chromatography A*, 624 (1-2), 253-265, **1992**.

Kusurkar, R. S., Goswami, S. K., Vyas, S. M., Efficient one-pot synthesis of anti-HIV and anti-tumor compounds: harman and substituted harmans, *Tetrahedron Letters*, 44, 4761-4763, **2003**.

Kusurkar, R. S. & Goswami, S. K., Efficient one-pot synthesis of anti-HIV and anti-tumor  $\beta$ -carbolines, *Tetrahedron*, 60, 5315-5318, **2004**.

Leppä, E., Vekovischeva, O.Y., Lindén, A.-M., Wulff, P., Oberto, A., Wisden, W., Korpi, E.R., Agonistic effects of the  $\beta$ -carboline DMCM revealed in GABA<sub>A</sub> receptor  $\gamma$ 2 subunit F77I point-mutated mice, *Neuropharmacology*, 48, 469–478, **2005**.

Lichtenberg-Kraag, B., Klinker, J. F., Muhlbauer, E., Rommelspacher, H., The natural  $\beta$ -carbolines facilitate inositol phosphate accumulation by activating small G-proteins in human neuroblastoma cells (SH-SY5Y), *Neuropharmacology*, 36 (11/12), 1771-1778, **1997**.

Martyn, C. & Gale, C., Tobacco, coffee, and Parkinson's disease, *British Medical Journal*, 326, 561-562, **2003**.

Musgrave, I. F. & Badoer, E., Harmane produces hypotension following microinjection into the RVLM: possible role of I<sub>1</sub>-imidazole receptors, *British Journal of Pharmacology*, 129, 1057-1059, **2000**.

Nagatsu, T., Amine-related neurotoxins in Parkinson's disease Past, present and future, *Neurotoxicology and Teratology*, 24, 565-569, **2002**.

Nebesny, E. & Budryn, G., Effect of the roasting method on the content of 5-hydroxytryptamides of carboxylic acids in roasted coffee beans, *Nahrung/Food*, 46 (4), 279-282, **2002**.

---

Nebesny, E. & Budryn, G., Evaluation of sensory attributes of coffee brews from robusta coffee roasted under different conditions, *European Food Research and Technology*, in press, **2006**.

Nii, H., Possibility of the involvement of 9H-pyrido[3,4-b]indole(norharman) in carcinogenesis via inhibition of cytochrome P450-related activities and intercalation to DNA, *Mutation Research*, 541, 123-136, **2003**.

Ohnishi, S., Murata, M., Oikawa, S., Totsuka, Y., Takamura, T., Wakabayashi, K., Kawanishi, S., Oxidative DNA damage by an N-hydroxy metabolite of the mutagenic compound formed from norharman and aniline, *Mutation Research*, 494, 63-72, **2001**.

Östergren, A., Annas, A., Skog, K., Lindquist, N. G., Brittebo, E. B., Long term retention of neurotoxic  $\beta$ -carbolines in brain neuromelanin, *Journal of Neural Transmission*, 111(2), 141-157, **2004**.

Östergren, A. *et al.*, Norharman-induced motoric impairment in mice: neurodegeneration and glial activation in substantia nigra, *Journal of Neural Transmission*, in press, **2005**.

Östergren, A., Selective retention of  $\beta$ -carbolines and 7,12-dimetilbenz[a]anthracene in brain-Role of neuromelanin and cytochrome P450 for toxicity, Digital comprehensive summaries of uppsala dissertations from the faculty of pharmacy 17, Sweden, **2005**.

Pike, D. J., *A practical approach to regression*, Piggott, J.R. ed, London: Elsevier Applied Science Publishers LTD, 61-100, **1986**.

Pfau, W. Skog, K. Exposure to  $\beta$ -carbolines norharman and harman. *Journal of Chromatography B*, 802, 115-126, **2004**.

Picada, J. N., Da Silva, K. V. C. L., Erdtmann, B., Henriques, A. T., Henriques, J. A. P., Genotoxic effects of structurally related  $\beta$ -carboline alkaloids, *Mutation Research*, 379, 135-149, **1997**.

Ranheim, T. & Halvorsen, B., Coffee consumption and human health – beneficial or detrimental?– Mechanisms for effects of coffee consumption on different risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus – review, *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 274-284, **2005**.

Ribani, M., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., Jardim, I. C. S. F., Melo, L. F. C., Validação em métodos cromatográficos e electroforéticos, *Química Nova*, 27 (5), 771-780, **2004**.

Rommelspacher, H., May, T., Susilo, R.,  $\beta$ -carbolines and Tetrahydroisoquinolines: Detection and Function in Mammals, *Planta Medica*, 57 (1), s85-s92, **1991**.

Rommelspacher, H., Meier-Henco, M., Smolka, M., Kloft, C., The levels of norharman are high enough after smoking to affect monoaminoxidase B in platelets, *European Journal of Pharmacology*, 441, 115-125, **2002**.

Schwartzberg, H. G., Modeling bean heating during batch roasting of coffee beans, In: Welti-Chanes, J., Barbosa-Cánovas, G. V., Aguilera, J. M., eds., *Engineering and Food for the 21<sup>st</sup> century*, London e New York: CRC Press LLC, cap.52, **2002**.

Shi, C.-C., Chen, S.-Y., Wang, G.-J., Liao, J.-F., Chen, C.-F., Vasorelaxant effect of harman, *European Journal of Pharmacology*, 390, 319-325, **2000**.

Shi, C.-C., Liao, J.-F., Chen, C.-F., Comparative study on the vasorelaxant effects of three harmala alkaloids in vitro, *Japanese Journal of Pharmacology*, 85, 299-305, **2001**.

Skog, K. & Solyakov, A., Heterocyclic amines in poultry products: a literature review, *Food and Chemical Toxicology*, 40, 1213-1221, **2002**.

---

Soulimani, R., Younos, C., Jarmouni, S., Bousta, D., Misslin, R., Mortier, F., Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse, *Journal of Ethnopharmacology*, 11-20, **1997**.

Spies, C. D., Rommelspacher, H., Winkler, T., Müller, C., Brummer, G., Funk, T. *et al.*, Beta-carbolines in chronic alcoholics following trauma, *Addiction Biology*, 1, 93-103, **1996**.

Spiller, G. A., The coffee plant and its processing, In: Spiller, G. A. ed., *Caffeine*, CRC London e New York: Press LLC, cap. 5, **1998**.

Spijkerman, R., van den Eijnden, R., van de Mheen, D., Bongers, I., Fekkes, D., The impact of smoking and drinking on plasma levels of norharman, *European Neuropsychopharmacology*, 12, 61-71, **2002**.

Squires, P. E., Hills, C. E., Rogers, G. J., Garland, P., Farley, S. R., Morgan, N. G., The putative imidazoline receptor agonist, harmaline, promotes intracellular calcium mobilisation in pancreatic  $\beta$ -cells, *European Journal of Pharmacology*, 501, 31-39, **2004**.

Stawowy, P., Bonnet, R., Rommelspacher, H., The high-affinity binding of [ $^3$ H]norharman ([ $^3$ H] $\beta$ -carboline) to the ethanol-inducible cytochrome P450 2E1 in rat liver, *Biochemical Pharmacology*, 57, 511-520, **1999**.

Stennert, A. & Maier, H. G., Trigonelline in coffee II. Content of green, roasted and instant coffee, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 199, 198-200, **1994**.

Stöckigt, J., Sheludko, Y., Unger, M., Gerasimenko, I., Warzecha, H., Stöckigt, D., High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic-electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups, *Journal of Chromatography A*, 967, 85-113, **2002**.

---

Stohler, R., Rommelspacher, H., Ladewig, D., The role of beta-carbolines (harman/norharman) in heroin addicts, *European Psychiatry*, 10, 56-58, **1995**.

Sweet Maria's Coffee, Inc., A Rough Pictorial Guide to the Roast Process, Disponível em: <http://www.sweetmarias.com/roasted.pict-guide.html>, Acesso em: **06/05/2006**.

Tan, E.-K., Tan, C., Fook-Chong, S. M. C., Lum, S. Y., Chai, A., Chung, H. *et al.*, Dose-dependent protective effect of coffee, tea, and smoking in Parkinson's disease: a study in ethnic Chinese., *Journal of Neurological Sciences*, 216(1), 163-167, **2003**.

Thorn, J., A História do Café - A Torrefacção do Café, In: Thorn, J. ed., *O Guia do Café*, Portugal: Livros e Livros, 41-44, **1998**.

Totsuka, Y., Ushiyama, H., Ishihara, J., Sinha, R., Goto, S., Sugimura, T. *et al.*, Quantification of the co-mutagenic  $\beta$ -carbolines, norharman and harman, in cigarette smoke condensates and cooked foods, *Cancer Letters*, 143, 139-143, **1999**.

Totsuka, Y., Kawamori, T., Hisada, S., Mitsumori, K., Ishihara, J., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Testicular toxicity in F344 rats by aminophenylnorharman, formed by norharman with aniline, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 175, 169-175, **2001**.

Totsuka, Y., Takamura-Enya, T., Nishigaki, R., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Mutagens formed from beta-carbolines with aromatic amines, *Journal of Chromatography B*, 802, 135-141, **2004**.

Tuschiya, H., Hayashi, Sato, M., Shimizu, H., Linuma, M., Quantitative analysis of all Types of  $\beta$ -carboline alkaloids in Medicinal Plants and Dried Edible Plants by HPLC with Selective Fluorometric Detection, *Phytochemical Analysis*, 10, 247-253, **1999**.

Uezono, T., Maruyama, W., Matsubara, K., Naoi, M., Shimizu, K., Saito, O. *et al.*, Norharman, an indoleamine-derived  $\beta$ -carboline, but not Trp-P-2, a  $\gamma$ -carboline, induces apoptotic cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells, *Journal of Neural Transmission*, 108, 943-953, **2001**.

---

Unger, M., Stöckigt, D., Belder, D., Stöckigt, J., General approach for the analysis of various alkaloid classes using capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometric, *Journal of Chromatography A*, 767, 263-276, **1997**.

Vincent, J.-C., Green coffee processing, In: Clarke, R. J. & Macrae, R., eds., *Coffee Volume 2: Technology*, London: Elsevier Science Publishers, 1-33, **1987**.

Vincze, I. & Vatai, G., Application of nanofiltration for coffee extract concentration, *Desalination*, 162, 287-294, **2004**.

Zambonin, C.G., Balest, L., De Benedetto, G.E., Palmisano, F., Solid-phase microextraction-GC-MS and multivariate analysis for the characterization of roasted coffees, *Talanta*, 66 (1), 261-265, **2005**.

Zheng, W., Wang, S., Barnes, L. F., Guan, Y., Louis, E. D., Determination of harmaline and harmine in human blood using reversed-phase high performance liquid chromatography and fluorescence detection, *Analytical Biochemistry*, 279, 125-129, **2000**.

---

**ANEXOS**

Tabela 1: Evolução do teor de norarmana com a temperatura de torra em cada amostra de café.

Espécies	Origens	Amostras	Café verde			Café torrado a 240°C			Café torrado a 260°C			Café torrado a 280°C		
			Média (µg/g)	± SD	CV (%)	Média (µg/g)	± SD	CV (%)	Média (µg/g)	± SD	CV (%)	Média (µg/g)	± SD	CV (%)
Arábica	Honduras	A	0,04	± 0,00	5,30	4,11	± 0,06	1,38	4,11	± 0,05	1,29	7,28	± 0,20	2,73
		B	0,03	± 0,00	5,79	4,94	± 0,25	5,16	3,02	± 0,15	4,95	3,25	± 0,12	3,60
		C	0,03	± 0,00	9,05	5,72	± 0,20	3,52	3,57	± 0,30	8,44	7,66	± 0,04	0,47
	D	0,04	± 0,00	4,16	1,82	± 0,09	4,72	2,76	± 0,03	1,20	4,66	± 0,08	1,79	
	E	0,03	± 0,00	1,76	2,16	± 0,13	5,84	3,22	± 0,10	3,09	2,02	± 0,15	7,40	
	F	0,03	± 0,00	2,71	2,10	± 0,02	1,08	2,62	± 0,10	3,96	2,95	± 0,10	3,25	
Quênia	Guatêmala	G	0,03	± 0,00	7,82	1,55	± 0,06	4,03	2,09	± 0,13	6,14	1,46	± 0,07	4,76
		H	0,02	± 0,00	10,91	1,66	± 0,03	1,63	1,57	± 0,01	0,75	3,00	± 0,05	1,75
		I	0,02	± 0,00	9,17	1,45	± 0,02	1,47	2,21	± 0,06	2,58	2,84	± 0,03	0,98
Brasil	Camarões	J	0,03	± 0,00	8,53	2,21	± 0,12	5,27	2,47	± 0,19	7,63	2,42	± 0,22	9,05
		K	0,05	± 0,00	3,00	5,27	± 0,06	1,14	6,59	± 0,12	1,88	7,98	± 0,17	2,12
		L	0,06	± 0,00	0,94	6,18	± 0,09	1,50	6,60	± 0,03	0,43	7,49	± 0,49	6,57
Robusta	Vietname	M	0,05	± 0,00	6,64	3,53	± 0,06	1,79	7,67	± 0,30	3,96	9,88	± 0,31	3,13
		N	0,06	± 0,00	6,35	6,84	± 0,02	0,32	9,44	± 0,09	0,93	15,92	± 0,79	4,95
	Uganda	O	0,06	± 0,00	7,41	4,70	± 0,07	1,40	6,77	± 0,14	2,00	9,15	± 0,34	3,72
		P	0,05	± 0,00	1,39	7,67	± 0,11	1,45	7,92	± 0,09	1,12	9,55	± 0,17	1,73
	Q	0,06	± 0,01	9,35	2,96	± 0,01	0,32	6,82	± 0,34	4,95	15,06	± 0,18	1,22	

Tabela 2: Evolução do teor de harmana com a temperatura de torra em cada amostra de café.

Espécies	Origens	Amostras	Café verde			Café torrado a 240°C			Café torrado a 260°C			Café torrado a 280°C		
			Média (µg/g)	± SD	CV (%)	Média (µg/g)	± SD	CV (%)	Média (µg/g)	± SD	CV (%)	Média (µg/g)	± SD	CV (%)
Arábica	Honduras	A	0,03	± 0,00	4,51	0,80	± 0,02	1,91	0,61	± 0,04	7,23	1,09	± 0,05	4,71
		B	0,02	± 0,00	3,97	1,14	± 0,06	5,64	0,59	± 0,04	7,58	0,50	± 0,02	4,82
		C	0,02	± 0,00	5,64	1,10	± 0,06	5,50	0,69	± 0,06	8,03	1,11	± 0,01	0,67
		D	0,03	± 0,00	2,53	0,46	± 0,03	6,44	0,62	± 0,04	7,17	0,73	± 0,01	1,45
	E	0,03	± 0,00	2,53	1,04	± 0,06	5,66	0,69	± 0,02	3,02	0,21	± 0,02	7,39	
	F	0,04	± 0,00	2,99	0,70	± 0,07	9,51	0,57	± 0,00	0,54	0,48	± 0,01	1,61	
	G	0,04	± 0,00	4,73	0,74	± 0,01	0,71	0,72	± 0,01	1,03	0,13	± 0,01	9,91	
	H	0,03	± 0,00	7,89	0,86	± 0,02	2,61	0,23	± 0,02	7,62	0,41	± 0,02	5,26	
	I	0,02	± 0,00	5,72	0,55	± 0,02	3,10	0,40	± 0,03	6,48	0,28	± 0,00	1,07	
	J	0,03	± 0,00	4,55	1,03	± 0,10	9,85	0,41	± 0,01	2,56	0,30	± 0,03	11,44	
Robusta	Camarões	K	0,05	± 0,00	1,15	1,76	± 0,03	1,85	1,57	± 0,03	1,74	1,73	± 0,09	5,21
	Angola	L	0,10	± 0,01	9,64	1,10	± 0,03	2,79	0,82	± 0,04	4,41	1,14	± 0,08	7,44
		M	0,06	± 0,01	10,88	1,03	± 0,11	10,55	2,40	± 0,05	2,06	1,78	± 0,05	2,67
	Índia	N	0,09	± 0,00	4,46	2,29	± 0,01	0,50	2,72	± 0,11	3,88	3,75	± 0,28	7,54
		O	0,07	± 0,01	7,63	1,73	± 0,03	1,58	2,22	± 0,12	5,30	2,44	± 0,06	2,62
	Uganda	P	0,07	± 0,00	2,19	2,31	± 0,02	0,82	2,16	± 0,10	4,85	2,15	± 0,07	3,42
		Q	0,06	± 0,01	10,45	0,80	± 0,01	1,44	1,65	± 0,03	1,91	3,39	± 0,06	1,90