

DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE ACRILAMIDA EM ALIMENTOS

CRISTINA MARIA DIAS SOARES

Porto, 2006

DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE ACRILAMIDA EM ALIMENTOS

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

Cristina Maria Dias Soares

Licenciada em Química, ramo Científico, pela Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

FACULDADE DE FARMÁCIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 07/03/2007
Reg. 4800
Cota

FFM
SOA
4800

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

Aos meus pais

*"Nem tudo é dias de Sol,
E a chuva, quando falta muito, pede-se."*

Alberto Caeiro poema XXI

Agradecimentos

Ao Professor José de Oliveira Fernandes por me ter admitido como sua aluna, pela utilidade das suas recomendações, a sua disponibilidade e a sua simpatia. Estou grata por tudo, especialmente pela liberdade de acção que me permitiu, que foi decisiva para que este trabalho contribuisse para o meu desenvolvimento pessoal.

À Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e, em especial ao Serviço de Bromatologia, pela admissão como aluna do curso de Mestrado Europeu em Química Analítica Ambiental.

Ao Professor Doutor José Luís da Costa Lima, agradeço o apoio pedagógico e científico, que contribuiu de forma imprescindível para a realização da parte curricular deste Mestrado.

Ao Departamento de Química da Universidade das Ilhas Baleares, na pessoa do Professor Doutor Victor Cerdà, pela oportunidade que me foi dada de efectuar o bloco B deste mestrado, nessa instituição. Também gostaria de agradecer ao Doutor Rafel Forteza do mesmo Departamento e a todos os outros membros pela simpatia e amizade que ajudaram a suportar a distância com menos pesar.

À Liliana Sara pela companhia em Palma de Maiorca e pela amizade.

A todos os meus colegas do Departamento de Bromatologia pelo apoio e óptimo ambiente de trabalho.

À doutora Sara Crava do Departamento de Química Orgânica pelas suas sugestões e pela ajuda com o evaporador de fracções.

À minha família, muito especialmente aos meus pais, pelo seu apoio incondicional e por sempre me terem ensinado que ter tudo o que queremos depende de nós próprios.

Ao meu João, pela sua paciência e incentivo, e por todos os momentos em que prescindiu das suas actividades por mim. Obrigada e um KISS.

A todos os meus amigos, que mesmo os que estão longe, nunca deixaram de me apoiar. A todos: muito obrigada!, *merci beaucoup!*, *thank you very much!*, *grazie infinite!*, *muchas gracias!*.

Resumo

A descoberta de acrilamida em alimentos processados a altas temperaturas, nomeadamente fritos e assados, foi divulgada pela primeira vez por Tareke *et. al.* em 2002.

Os produtos à base de batata, os cereais, incluindo o pão e as bolachas, o café e os seus derivados são os alimentos que apresentam maior quantidade de acrilamida e que mais contribuem para a sua ingestão diária uma vez que são géneros alimentícios que fazem parte dos hábitos alimentares da população em geral.

O mais importante mecanismo de formação da acrilamida envolve a reacção a temperaturas elevadas entre açúcares redutores e o aminoácido asparagina, precursores abundantes nestes alimentos, através da reacção de Maillard. Actualmente, ainda não há formas eficazes para diminuir genericamente a quantidade de acrilamida que se forma durante o processamento dos alimentos, mas apenas aplicações isoladas para as diferentes matrizes alimentares.

Os métodos analíticos mais utilizados para a detecção e quantificação da acrilamida baseiam-se em GC-MS e LC-MS com ou sem derivatização da substância. A maioria dos métodos desenvolvidos são eficazes para analisar a generalidade dos alimentos mas apresentam problemas de sensibilidade e selectividade quando se aplicam a matrizes mais complexas nomeadamente café e cacau.

O objectivo do trabalho discutido nesta dissertação foi desenvolver um método adequado para quantificar acrilamida em café "expresso" e derivados de café. Para o efeito desenvolveu-se e optimizou-se um processo inovador de purificação das amostras, baseado no uso de duas colunas de extracção em fase sólida (SPE) com diferentes sorbentes, a que se seguiu a derivatização do composto por bromação e a análise por GC-MS no modo SIM (Single Ion Monitoring). O método foi aplicado a amostras de café torrado analisadas como "expresso", a amostras de café solúvel e a misturas de café com cereais e leite (*cappuccino*).

Os resultados obtidos revelam que o café "expresso", o café solúvel clássico, o café descafeinado e o *cappuccino* apresentam em média 0,62, 0,64, 0,88 e 0,45 µg de

acrilamida por chávena de 30 mL, respectivamente. As misturas de café com cereais apresentam 2,15 μg AA/chávena. Estes resultados demonstram que a presença de cereais nas misturas aumenta a quantidade de acrilamida observada.

O método descrito nesta dissertação é adequado para analisar acrilamida em amostras de café e sucedâneos, permitindo a correcta quantificação da substância sem os problemas usualmente associados a este tipo de matrizes.

Abstract

The occurrence of acrylamide in foodstuff, namely in certain baked and fried products such as potato crisps and French fries, was first reported by Tareke *et. al.* in 2002.

Seemingly, acrylamide is likely to be found in food products that have been subject to heating, with the exception of boiling, during the consecutive processing stages. The formation of acrylamide is related to the reaction between reducing sugars and aminoacids through the Maillard reaction.

Several monitoring studies have been carried out to determine the extension of acrylamide contamination most of which were focused on the analysis of French fries, potato chips, cereal based foods and coffee. Although the majority of the methods applied in this investigation exhibited adequate accuracy and reliability, they have shown as well evident limitations when dealing with more complex matrices such as cocoa and coffee samples.

The objective of this work was to develop a method to determine AA in several coffee products using GC-MS as analytical technique. The samples were purified by precipitation of polysaccharides with ethanol and proteins with Carrez solutions. A SPE cleaning with Multimode sorbents was used to purify the extracts, followed by the bromination of the acrylamide double bond. The samples were then analysed by GC-MS. The method was successfully applied to determine acrylamide in instant coffee, ground coffee, analysed as "espresso" and coffee blends with milk and sugar (soluble *cappuccino*) and with cereals.

The results obtained for "espresso", soluble coffee, soluble decaffeinated coffee and *cappuccino* were 0,62, 0,64, 0,88 and 0,45 μg of acrylamide per 30 mL cup, respectively. The cereals blends presented an average value of 2,15 μg acrylamide per 30 mL cup. These results showed clearly that the presence of cereal products in the coffee blends has a remarkable influence on the observable acrylamide levels

This dissertation describes a GC/MS method based on an improved sample preparation procedure that enables the correct quantification of AA in coffee extracts without the problems generally associated with that kind of samples. The high levels of sensitivity, and reproducibility achieved recommend it when dealing with this type of food matrices.

Índice Geral

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	III
Abstract.....	V
Índice Geral	VII
Índice de figuras	XI
Índice de tabelas	XV
Introdução. Objectivo do trabalho	XVII
Organização da dissertação	XXIII
PARTE TEÓRICA.....	1
<i>Capítulo 1 - A EVOLUÇÃO DA ALIMENTAÇÃO HUMANA: O PROCESSAMENTO DOS ALIMENTOS</i>	<i>3</i>
1.1- Introdução. História e evolução da alimentação	5
1.2- O processamento dos alimentos.....	8
1.2.1- Processamento dos alimentos pelo calor	8
1.3- Implicações do processamento pelo calor na segurança alimentar	9
<i>Capítulo 2 - A ACRILAMIDA: PROPRIEDADES, TOXICIDADE E EXPOSIÇÃO DOS CONSUMIDORES</i>	<i>13</i>
2.1- Introdução	15
2.2- Propriedades físico-químicas da acrilamida	17
2.3- Toxicidade da acrilamida.....	19
2.3.1- Absorção, distribuição e metabolismo da acrilamida.....	19
2.3.2- Genotoxicidade, carcinogenicidade e neurotoxicidade da acrilamida.....	22
2.4- Avaliação da exposição dos consumidores à acrilamida	23
<i>Capítulo 3 - A COMPOSIÇÃO QUÍMICA E O PROCESSAMENTO DOS ALIMENTOS.....</i>	<i>29</i>
3.1- Introdução	31
3.2- O café	31
3.2.1- Processamento do café	32
3.2.1.1- A torra do café.....	33
3.2.1.2- A preparação do café torrefacto.....	34

3.2.1.3- A moagem do café torrado	35
3.2.1.4- Preparação de café descafeinado	35
3.2.1.5- Preparação do café solúvel	36
3.2.1.6- Os sucedâneos do café.....	37
3.2.1.7- Café tratado	37
3.2.2- Os componentes químicos do café.....	37
3.2.3- Bebidas derivadas do café.....	40
3.3- O cacau.....	42
3.3.1- Colheita e processamento do cacau.....	42
3.3.2- Composição química do cacau	43
3.3.3- Produção de chocolate.....	44
3.4- Os cereais	45
3.4.1- Composição química dos cereais	46
3.4.2- Processamento dos cereais.....	47
3.5- Os vegetais.....	49
3.5.1- Composição química das batatas.....	49
3.5.2- Processamento das batatas. O processo de fritura	51
<i>Capítulo 4 – A FORMAÇÃO DA ACRILAMIDA EM ALIMENTOS.....</i>	<i>55</i>
4.1- Mecanismos de formação da acrilamida em alimentos	57
4.1.1- Formação de acrilamida a partir da reacção de Maillard.....	57
4.1.2- Formação da acrilamida a partir de outros mecanismos.....	62
4.1.2.1- A partir da acroleína.....	62
4.1.2.2- A partir do ácido acrílico	64
4.1.2.3- A partir da 3-aminopropionamida	66
4.1.2.4- A partir da despolimerização da poliacrilamida.....	66
4.2- Factores que afectam a formação da acrilamida em alimentos	67
4.2.1- A presença dos precursores: asparagina e açúcares redutores.....	67
4.2.2- Efeito da adição de agentes levedantes.....	69
4.2.3- O efeito da temperatura e do tempo total do processamento.....	72
4.2.4- Efeito do pH.....	78
4.2.5- Efeito da presença de água	79
4.2.6- Outros factores.....	80
4.3- Estratégias para reduzir a formação de acrilamida em alimentos	81

<i>Capítulo 5 - MÉTODOS ANALÍTICOS USADOS NA QUANTIFICAÇÃO DA ACRILAMIDA EM ALIMENTOS</i>	93
5.1- Introdução	95
5.2- Métodos de preparação das amostras para a análise de acrilamida	96
5.2.1- Homogeneização das amostras	96
5.2.2- Extracção da acrilamida das matrizes alimentares	97
5.2.3- Purificação dos extractos	99
5.3- A quantificação da acrilamida	104
5.3.1- Padrões internos usados na quantificação da acrilamida	104
5.3.2- Análise da acrilamida por GC-MS	105
5.3.2.1- GC-MS com derivatização da acrilamida	105
5.3.2.2- GC-MS sem derivatização da acrilamida	110
5.3.3- Análise da acrilamida por LC-MS/MS	111
5.3.3.1- LC-MS/MS sem derivatização	111
5.3.3.2- LC-MS/MS com derivatização	113
5.3.4- Outras técnicas analíticas usadas na determinação da acrilamida	113
5.3.5- Métodos oficiais validados para a determinação da acrilamida	115
PARTE EXPERIMENTAL	117
<i>Capítulo 6 - AMOSTRAS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS</i>	119
6.1- Amostras	121
6.2- Reagentes	122
6.2.1- Material para a Extracção em Fase Sólida (SPE)	123
6.2.2- Gases	123
6.3- Equipamento	123
6.3.1- Sistema de GC-MS	123
6.3.2- Outra aparelhagem	124
6.3.3- Consumíveis	125
<i>Capítulo 7 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</i>	127
7.1- Preparação das soluções reagentes	129
7.1.1- Preparação das soluções de padrões	129
7.1.2- Preparação das soluções de Carrez	129
7.1.3- Preparação da solução saturada de bromo	129

7.2- Preparação das amostras: batatas fritas e chocolate	129
7.2.1- Extracção da acrilamida das batatas fritas e do chocolate.....	130
7.2.2- Processo de derivatização das amostras	130
7.2.3- Preparação das soluções de calibração.....	131
7.3- Preparação das amostras: café e derivados.	131
7.3.1- Extracção da acrilamida das amostras de café e derivados	131
7.3.2- Processo de purificação das amostras de café.....	132
7.3.3- Processo de derivatização das amostras	132
7.4.4- Preparação das soluções de calibração.....	133
7.4- Condições operatórias do GC-MS.....	133
7.4.1- Cromatógrafo gasoso.....	133
7.4.2- Espectrómetro de massa.....	133
<i>Capítulo 8 - RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	<i>135</i>
8.1- Amostras de batatas fritas e de chocolate	137
8.1.1-Desenvolvimento do método analítico	137
8.1.2- Resultados e discussão: amostras de batatas fritas	138
8.1.3- Resultados e discussão: amostras de chocolate	141
8.2- Amostras de café e derivados.....	142
8.2.1-Desenvolvimento do método analítico	142
8.2.2- Validação do método.....	149
8.2.2.1- Selectividade.....	149
8.2.2.2- Linearidade.....	151
8.2.2.3- Precisão.....	152
8.2.2.4- Recuperação.....	152
8.2.2.5- Limite de detecção e de quantificação	153
8.2.2.6- Estabilidade dos padrões e das amostras	153
8.2.3- Resultados obtidos e discussão: amostras de café e sucedâneos.....	153
<i>Capítulo 9 – CONSIDERAÇÕES FINAIS</i>	<i>161</i>
<i>BIBLIOGRAFIA.....</i>	<i>167</i>

Índice de figuras

Figura 1.1- Produtos indesejáveis formados durante a preparação doméstica e industrial dos alimentos a altas temperaturas (Adaptado de: Studer <i>et. al.</i> , 2004)	12
Figura 2.1- Concentração de acrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) (média e intervalo) em alimentos comerciais e preparados no laboratório (Adaptado de: Tareke <i>et. al.</i> , 2002).....	16
Figura 2.2- Estrutura química da acrilamida	17
Figura 2.3- Possíveis vias metabólicas da acrilamida. (Adaptado de: Amrein, 2005).....	20
Figura 2.4- Activação metabólica da acrilamida para glicidamida e formação de aductos destes dois compostos com a molécula de hemoglobina por interacção com os resíduos N-terminais de valina. (Adaptado de: Pérez <i>et. al.</i> , 1999)	21
Figura 2.5- Alemanha, adolescentes (15-18 anos). (Adaptado de Dybing <i>et. al.</i> , 2005).....	24
Figura 2.6- Bélgica, adolescentes (13-18 anos). (Adaptado de Matthys <i>et. al.</i> , 2005)	24
Figura 2.7- Holanda, crianças (1-6 anos) (Adaptado de Konings <i>et. al.</i> , 2003)	25
Figura 2.8- Holanda, crianças e adolescentes (7-18 anos) (Adaptado de Konings <i>et. al.</i> , 2003)	25
Figura 2.9- Holanda, população em geral (1-97 anos) (Adaptado de Konings <i>et. al.</i> , 2003).....	25
Figura 2.10- Noruega, adultos mulheres (16-79 anos). (Adaptado de Dybing e Sanner, 2003)	26
Figura 2.11- Noruega, adultos homens (16-79 anos). (Adaptado de Dybing e Sanner, 2003)	26
Figura 2.12- Suécia, adultos (18-74 anos). (Adaptado de Svensson <i>et. al.</i> , 2003).....	26
Figura 3.1- Café Arábica. Adaptado de: http://www.osamayor.com/cafe/ , consultado em 2006/01/15.....	31
Figura 3.2- Café Robusta. Adaptado de: http://www.osamayor.com/cafe/ , consultado em 2006/01/15.....	31
Figura 3.3- Corte esquemático de uma baga de café (Adaptado de: http://www.laohamutuk.org/Bulletin/2002/Apr/bulletinv3n23a.html , consultado em 2006/01/15)	32
Figura 3.4- Aminoácidos presentes no café verde nas espécies Arábica e Robusta. (*: Diferença significativa). (Adaptado de: Murkovic e Derler, 2006)	39
Figura 3.5- Corte longitudinal de um grão de cereal. (Adaptado de: http://www.hawos.de/pages/engl/alles3.htm , consultado em 2006/09/20).....	46
Figura 3.6- Distribuição dos aminoácidos livres (% baseada na quantidade total de aminoácidos livres) em batatas (média de 124 amostras independentes). (Adaptado de: Taeymans <i>et. al.</i> , 2004).	50

Figura 3.7- Reações físicas e químicas que ocorrem durante a fritura. (Adaptado de: Warner, 2004)	52
Figura 4.1- Esquema geral da reacção de Maillard (Adaptado de: Nunes e Baptista, 2001).....	58
Figura 4.2- Mecanismo de formação da acrilamida após uma degradação de Strecker de um aminoácido na presença de compostos dicarbonilo durante a reacção de Maillard (Adaptado de: Mottram <i>et. al.</i> , 2002).	60
Figura 4.3- Mecanismo de formação de acrilamida em alimentos processados a altas temperaturas, envolvendo a descarboxilação do N-glicosido da asparagina (Adaptado de: Zyzak <i>et. al.</i> , 2003).....	61
Figura 4.4- Mecanismos alternativos de formação da acrilamida. (Adaptado de: Eriksson, 2005)	62
Figura 4.5- Mecanismo de formação da acrilamida a partir de aminoácidos e lípidos via acroleína (Adaptado de: Yasuhara <i>et. al.</i> , 2003)	63
Figura 4.6- Mecanismo de formação da acrilamida a partir da carnosina (Adaptado de: JIFSAN, 2004. Disponível em: http://www.jifsan.umd.edu/presentations/acry2004/acry_2004_wg1_report.pdf , consultado em 2006/04/16).....	65
Figura 4.7- Mecanismo de formação da acrilamida a partir da 3-aminopropionamida (3-APA). (Adaptado de: Granvogl <i>et. al.</i> , 2004)	66
Figura 4.8- Quantidade de acrilamida formada em pão de gengibre, produzido com diferentes quantidades de hidrogenocarbonato de amónia. Relação com a percentagem de características organolépticas apresentadas pelo produto final. (Adaptado de Amrein <i>et. al.</i> , 2004b)	70
Figura 4.9- Quantidade de acrilamida formada em pão de gengibre produzido com diferentes quantidades de agentes levedantes e relação com as características organolépticas do produto final* (Adaptado de: Amrein <i>et. al.</i> , 2004b)	71
Figura 4.10-- Influência da temperatura na formação de acrilamida em mg/ mol de asparagina. Sistema formado por uma solução com 0,1 mmol de asparagina e 0,1 mmol de glicose numa solução tampão fosfato 0,5 M a pH 5,5 e aquecida durante 20 minutos num tubo fechado. (Adaptado de: Mottram <i>et. al.</i> , 2002).....	72
Figura 4.11- Relação entre a quantidade de acrilamida formada em batatas fritas tipo francês e o aumento da temperatura e tempo de fritura. A seta vertical indica as condições normais de	

fritura das batatas em restaurantes: 175 °C durante 3'30". (Adaptado de: Gertz e Klostermann, 2002).	73
Figura 4.12- Dependência da formação de acrilamida com a temperatura de fritura. (Adaptado de: http://www.cfsan.fda.gov/~dms/acryjack/sld024.htm , consultado em 2006/04/16)	73
Figura 4.13- Efeito do tempo e da temperatura do forno na concentração de acrilamida na crosta do pão (Adaptado de Surdyk <i>et. al.</i> , 2004).....	74
Figura 4.14- Efeito do tempo e da temperatura do forno na concentração de acrilamida no miolo do pão. (Adaptado de: Surdyk <i>et. al.</i> , 2004).....	75
Figura 4.15- Concentração de acrilamida em grãos de café Robusta aquecidos num forno entre 220 e 260 °C durante 5 a 15 minutos. (Adaptado de: Bagdonaite e Murkovic, 2004)	75
Figura 4.16- Relação entre a quantidade de acrilamida e o tempo total de fritura em batatas que apresentam concentrações de açúcares redutores entre os 0,15 g/kg e 2,5 g/kg. (Adaptado de: Fiselier e Grob, 2005)	77
Figura 4.17- Dependência do pH na formação da acrilamida a partir de uma solução 0,5 mmol de asparagina e 0,5 mmol de glicose em 1 mL de solução tampão de fosfato com diferentes pH aquecidos a 150 °C durante 30 minutos (Adaptado de: Jung <i>et. al.</i> , 2003).....	78
Figura 5.1- Reacção de derivatização da acrilamida a 2,3-dibromopropionamida	106
Figura 5.2- Reacção de conversão da acrilamida a 2,3-dibromopropionamida e de seguida a 2-bromopropenamida. (Adaptado de: Rothweiller <i>et. al.</i> , 2003).....	107
Figura 5.3- Espectro de massa do derivado bromado da acrilamida, 2,3-dibromopropionamida.	108
Figura 5.4- Reacção de sililação da acrilamida a N,O-bis(trimetilsilil)acrilamida (BTMSA). (Adaptado de Lagalante e Felter, 2004)	109
Figura 5.5- Reacção de formação dos aductos de acrilamida-valina (Adaptado de: Pérez e Osterman-Golkar, 2003)	110
Figura 5.6- Esquema das reacções múltiplas que ocorrem no interior do LC-MS/MS. (Adaptado de: http://www.chem.agilent.com).....	112
Figura 8.1- Cromatograma de uma amostra de batatas fritas com uma concentração de 1370 µg/kg de acrilamida (AA) e 500 µg/kg de padrão interno (PI).....	137
Figura 8.2- Curva de calibração usada na quantificação de acrilamida em batatas fritas.....	138
Figura 8.3- Concentração média de acrilamida em batatas fritas. Relação entre a cor e a forma das batatas com a quantidade de acrilamida	140

Figura 8.4- Cromatograma de uma amostra de café submetida ao processo de análise desenvolvido para quantificar acrilamida em batatas fritas. (AA- acrilamida; PI- padrão interno).....	143
Figura 8.5- Amostra de café submetida a uma purificação com uma coluna de C ₁₈ . Os derivados da acrilamida (AA) e do padrão interno (PI), com tempo de retenção de aproximadamente 8,3 min apresentam um interferente.....	146
Figura 8.6- Cromatograma de uma amostra de café “expresso” com 104 µg/kg de acrilamida e adição de 1 µg de ¹³ C ₃ -acrilamida correspondente a uma concentração de 500 µg/kg acrilamida.....	147
Figura 8.7- Técnica de SPE utilizada neste trabalho (Adaptado de Argonaut, 2004).....	148
Figura 8.8- Sobreposição dos iões dos derivados da acrilamida e do padrão interno de uma solução padrão de acrilamida com concentração 1500 µg/kg.....	149
Figura 8.9- Sobreposição dos iões dos derivados da acrilamida e do padrão interno de uma amostra de um sucedâneo de café solúvel com a concentração de 685 µg/kg.....	150
Figura 8.10- Curva de calibração da acrilamida	151
Figura 8.11- Curva de calibração da acrilamida numa amostra de um derivado de café solúvel obtida através do método de adição de padrão.....	152
Figura 8.12- Concentração de acrilamida obtida para cafés torrados e moídos	155
Figura 8.13- Comparação entre a quantidade de acrilamida observada num “expresso” e obtida a partir da infusão prolongada do pó de café em água quente.	157
Figura 8.14- Concentração de acrilamida em derivados de café.....	158

Índice de tabelas

Tabela 3.1- Correlação entre o grau de torra e a duração total do processo. (Adaptado de: Gonzales, 2004).....	34
Tabela 3.2- Composição química de cafés Arábicas e Robustas verdes e torrados e de café solúvel em pó em % de matéria seca. (Adaptado de: Smith, 1985).....	38
Tabela 3.3- Parâmetros que definem um “expresso”. (Adaptado de: Illy e Viani, 1995; Barberá, 2005)	41
Tabela 3.4- Composição química de alguns produtos à base de chocolate (Adaptado de: Fryer e Pinschower, 2000; Belitz <i>et. al.</i> , 2004b).....	45
Tabela 3.5- Cuidados a ter para evitar a degradação do óleo de fritar (Adaptado de: Warner, 2004)	53
Tabela 4.1- Estratégias para reduzir a formação de acrilamida em alimentos via reacção de Maillard	86
Tabela 4.2- Estratégias para reduzir a formação de acrilamida em alimentos via acroleína	92
Tabela 6.1- Amostras de café e sucedâneos de café analisadas neste trabalho	121
Tabela 6.2- Reagentes usados na execução prática do trabalho	122
Tabela 6.3- Colunas de SPE	123
Tabela 8.1- Concentração de acrilamida em batatas fritas com diversos formatos	139
Tabela 8.2- Concentração de acrilamida em chocolates	141
Tabela 8.3- Recuperação da acrilamida em amostras fortificadas	153
Tabela 8.4- Concentração de acrilamida em café torrado e em derivados	154
Tabela 8.5- Comparação entre a concentração da acrilamida no café “expresso” e no pó de café	156

Introdução. Objectivo do trabalho

A existência de “perigos químicos”, naturalmente mobilizadores da atenção das populações, esteve quase sempre ligada a fenómenos relacionados com emissão de radiações nocivas, como a proximidade de centrais nucleares ou de incineradoras de lixo, e outros fenómenos de poluição ambiental como os relacionados com os resíduos de diversos tipos de indústrias. Durante muito tempo, os riscos associados ao consumo de alimentos não constituíram fonte de preocupação.

Todavia, no final do último século, alguns “sustos” alimentares ocorridos um pouco por todo o Mundo, com particular incidência na Europa, tais como a encefalopatia espongiforme bovina (BSE) e a crise das dioxinas na Bélgica em 1999 vieram modificar este cenário. Gradualmente, os consumidores foram perdendo a confiança na segurança dos alimentos, na qualidade das indústrias e na capacidade das autoridades públicas para regular e assegurar a segurança da cadeia alimentar.

Adicionalmente, a complexidade crescente dos sistemas de produção de alimentos - com modificações na forma de processamento e distribuição, o aumento da globalização do comércio, mudanças na composição dos alimentos e alterações nos hábitos alimentares - influencia as preocupações dos consumidores em relação à qualidade e segurança dos alimentos.

A descoberta por parte de investigadores suecos da presença de acrilamida em alimentos fritos e assados, em 2002, constituiu mais um sobressalto no capítulo da segurança alimentar, desta vez com repercussões exponenciadas pelo facto de estarem envolvidos alimentos de consumo generalizado, até então considerados pouco mais do que inofensivos do ponto de vista toxicológico. Subsequentemente, todas as informações disponíveis sobre a acrilamida foram revistas por agências internacionais como a WHO (World Health Organization), a FAO (Food and Agriculture Organization), o Comité Científico Alimentar da Comissão Europeia (SCF, Scientific Committee on Food, http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.html, consultado em 2006/07/15) e, em Fevereiro de 2005, pela JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, <ftp://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/jecfa64summary.pdf>, consultado em

2006/07/15). Antes do anúncio sueco, a análise da acrilamida em alimentos não era efectuada uma vez que nada fazia prever a sua ocorrência.

De acordo com a Organização Europeia de Consumidores (European Consumer's Organisation ou Bureau Européen des Unions de Consommateurs [BEUC], http://www.consensusworkshops.org/down/Final_Consensus_Workshops_Report.pdf, consultado em 2006/07/15), a cobertura da imprensa e as preocupações directas dos consumidores variaram consideravelmente ao longo da Europa. Enquanto em Itália e Espanha a questão da acrilamida não foi comentada e as reacções foram mínimas, na Suíça, Áustria, Bélgica, Países Nórdicos, Alemanha, Irlanda, Reino Unido, França e Holanda, houve uma reacção substancial da parte dos media, consumidores e organizações de consumidores. Em Portugal, a notícia foi divulgada sem grande alarmismo. Os cabeçalhos dos noticiários nas semanas após o anúncio da descoberta sueca foram: "OMS vai estudar eventual cancerígeno" (Público, 2002-05-26), "Alimentação: inquietação com acrilamida" (Diário de Notícias, 2002-06-29). De um modo geral, a imprensa portuguesa foi acompanhando a evolução do assunto divulgando as descobertas mais recentes: "Hidratos de carbono e as substâncias cancerígenas" (Médicos na Internet (MNI), 2003-1-23), "Substância presente nos alimentos fritos não tem relação com cancro" (Lusa, 2003-01-30), "Acrilamida na comida" (Proteste edição nº 232, Janeiro de 2003), "EU lança alerta sobre acrilamida na Internet" (Lusa, 2003/03/11), "Substância cancerígena detectada em 750 alimentos" (Jornal de Notícias, 2004-03-24), "FDA encontrou substância perigosa em centenas de produtos alimentares" (Público, 2004-03-24), "Não existe relação entre a acrilamida e o aumento de casos de cancro" (Jornal de Notícias, 2004-03-31). No entanto, o interesse pelo assunto aumentou quando a DECO (Defesa do Consumidor) decidiu analisar as batatas fritas que se vendem em Portugal: "Pacotes de batatas fritas com substâncias cancerígenas" (Jornal de Notícias, 2004-12-28), "Acrilamida nas batatas fritas: uma ligação indesejável" (Proteste, 254, Janeiro 2005). As indústrias portuguesas de batatas fritas reagiram rapidamente a esta notícia: "Produtores acusam a DECO de alarmismo" (Jornal de Notícias, 2004-12-29), "Produtores de batatas fritas criticam alarmismo" (Público, 2004-12-29).

Nos Estados Unidos, o interesse foi muito elevado e no Estado da Califórnia os

níveis máximos permitidos de acrilamida foram alterados de acordo com a Proposição 65 (<http://www.oehha.ca.gov/prop65/acrylamide.html>, consultado em 2006/07/15). Esta norma exige que o Governador da Califórnia reveja e republique, pelo menos uma vez por ano, a lista de compostos químicos reconhecidos como causadores de cancro ou de toxicidade reprodutiva. Quando um composto está nesta lista, é necessário que todos os produtos em que apareça tenham uma etiqueta de aviso ou o produtor sofrerá uma acção civil. O nível mínimo de acrilamida a exigir uma etiqueta de aviso era de 0,2 µg/pessoa/dia. Uma proposta mais recente pretende alterar este limite para 1,0 µg/pessoa/dia, o que obriga por exemplo, os produtores de batatas fritas a colocarem notas de avisos nas embalagens. As autoridades da Califórnia sugerem que os produtores coloquem um aviso do tipo: *"Warning: Baking, roasting, frying and toasting starchy foods forms acrylamide, a chemical known to the state of California to cause cancer"*¹, (<http://www.foodnavigator-usa.com/news/ng.asp?id=60365>, consultado em 2006/07/15). Na Figura 0.1 apresenta-se um exemplo deste tipo de rótulo.

No entanto os produtores começaram gradualmente a recusar-se a colocar o aviso nos pacotes de batatas fritas, o que levou o estado da Califórnia a processar alguns dos maiores produtores americanos de batatas (Lays, MacDonalds, Burger King, etc.).

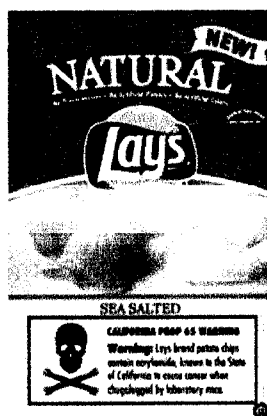


Figura 0.1- Pacote de batatas fritas com uma etiqueta de aviso de acrilamida. (Adaptado de:

<http://calorielab.com/news/2005/06/>; consultado em 2006/07/15)

¹ Aviso: Cozer, assar, fritar e torrar alimentos ricos em hidratos de carbono, leva à formação de acrilamida, uma substância química, reconhecida como causadora de cancro pelo Estado da Califórnia.

O facto de a acrilamida ter sido detectada em alguns alimentos induziu naturalmente à realização de diversos estudos na tentativa de se tentar descobrir a sua origem. Trata-se de uma substância que não existe naturalmente nos alimentos crus. Forma-se durante o processamento de determinado tipo de alimentos, a temperaturas superiores a 120 °C. Segundo os estudos mais recentes, a reacção entre certos açúcares (por exemplo: frutose e glicose) e um aminoácido específico (asparagina) presentes em grandes quantidades em alguns alimentos, é a principal responsável pela formação da acrilamida. Para além da presença dos precursores, a formação de acrilamida também depende da temperatura e do tempo total do processamento a que os alimentos são sujeitos.

As batatas e os cereais são os alimentos que, até agora, apresentam os níveis mais elevados de acrilamida uma vez que apresentam quantidades elevadas de açúcares redutores e de asparagina e são geralmente submetidas a processamentos cujas temperaturas excedem os 170 °C. Para além destes alimentos também se encontrou acrilamida em café torrado, cacau e outros alimentos torrados.

Os estudos feitos sobre a toxicidade da acrilamida revelaram que, em animais de laboratório, a acrilamida poderá exercer efeitos tóxicos no sistema nervoso e nos genes e, inclusive, ser indutor de cancro. Contudo, há grandes incertezas sobre o impacto da acrilamida na saúde pública, uma vez que, até ao momento, os estudos epidemiológicos efectuados têm sido inconclusivos, não se provando a ligação entre a acrilamida e o cancro. Para uma melhor avaliação do verdadeiro risco da acrilamida, será necessário aprofundar muito mais os estudos já efectuados. A FDA, a WHO, a EU e outros organismos declararam que até este momento não há indicações de que os consumidores necessitem de alterar os seus hábitos alimentares devido à descoberta da acrilamida. Todavia aconselham simultaneamente a prática de dietas equilibradas, com consumo de alimentos saudáveis, variados e de todos os grupos alimentares.

A determinação dos mecanismos de formação e a quantificação da acrilamida em alimentos dependem, em grande parte, dos métodos analíticos desenvolvidos. De um modo geral, a quantificação da acrilamida é efectuada por cromatografia gasosa ou líquida, acoplada a espectrometria de massa. Os diferentes métodos variam sobretudo

nas técnicas usadas na preparação das amostras: homogeneização, extracção da acrilamida da matriz, purificação dos extractos, derivatização, evaporação, centrifugação, etc.

Independentemente da técnica cromatográfica adoptada, o sucesso do método depende das etapas de extracção e purificação das amostras. Os procedimentos mais usados não são eficazes quando se aplicam a amostras de café, uma vez que não permitem eliminar interferentes que co-eluem com o analito dificultando ou até mesmo impedindo a sua quantificação.

Os métodos publicados até agora para determinar a presença de acrilamida em café e derivados baseiam-se principalmente em LC-MS/MS com variações nas técnicas de purificação empregues. Há, no entanto uma falta de metodologias sensíveis e selectivas baseadas em GC-MS.

O objectivo deste trabalho foi o de desenvolver um método baseado em GC-MS apropriado para a determinação de acrilamida em café e derivados. A base de partida foi um método previamente desenvolvido no Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e aplicado a amostras de batatas fritas e de produtos de cereais, mas que apresentava problemas de eficácia quando aplicado a amostras de café. A introdução de alterações, a nível do sistema de purificação dos extractos, discutidas neste trabalho, permitiu aplicá-lo com sucesso a 33 amostras de café que incluíam café torrado analisado como "expresso" e vários produtos solúveis desde café sóluvel até substitutos de café constituídos apenas por cereais torrados.

Organização da dissertação

A presente dissertação encontra-se organizada em duas partes: uma parte teórica e uma parte experimental.

A parte teórica está dividida em cinco capítulos. No primeiro capítulo faz-se um breve enquadramento do tema na actualidade. De seguida apresenta-se uma revisão das características físico-químicas e toxicológicas da acrilamida assim como uma avaliação da exposição dos consumidores a esta substância. No terceiro capítulo são descritas as propriedades dos alimentos caracterizados pela presença de acrilamida e os métodos de processamento a que tipicamente são sujeitos. No quarto capítulo faz-se uma revisão detalhada dos factores e mecanismos que induzem a formação de acrilamida nos alimentos e quais as propostas mais recentes para limitar a sua formação. No quinto capítulo faz-se uma revisão crítica das metodologias analíticas desenvolvidas ao longo dos últimos anos para a determinação de acrilamida em diferentes produtos alimentares.

A parte experimental compreende em primeiro lugar os aspectos de natureza experimental, sendo descritos os procedimentos adoptados na preparação das amostras e padrões, além do equipamento e material utilizados. Também se apresentam os parâmetros experimentais usados na determinação da acrilamida por GC-MS. Em segundo lugar, faz-se a descrição detalhada das diferentes etapas do desenvolvimento da metodologia adoptada. Em seguida são apresentados e discutidos os resultados obtidos nas diferentes matrizes alimentares analisadas. Por último, faz-se uma síntese dos principais resultados obtidos e algumas considerações finais.



PARTE TEÓRICA



Capítulo 1 - A EVOLUÇÃO DA ALIMENTAÇÃO HUMANA: O PROCESSAMENTO DOS ALIMENTOS

"O universo nada é sem vida e tudo o que vive se alimenta."

*Savarin
(1755-1826)*

1.1- Introdução. História e evolução da alimentação

O homem primitivo encontrou nos produtos que a Natureza espontaneamente lhe fornecia a base da sua alimentação. Limitando-se a colher ou a caçar, atravessou um período relativamente longo em que não havia agricultura e, por isso, as trocas de plantas ou as suas migrações seriam apenas as que resultariam do nomadismo das populações ou da acção das forças naturais (vento, água, animais, etc.).

À medida que os tempos passaram, os povos foram assimilando o milagre cíclico das culturas espontâneas e, conforme as circunstâncias, passaram a ter necessidade de encontrar, a partir de uma agricultura ainda primitiva, os alimentos de que precisavam, e cada vez em maior quantidade.

Como é evidente, os diferentes povos começaram a cultivar apenas as plantas locais que conheciam, passando assim a dispor das mesmas, primeiro em maior quantidade e, mais tarde, em melhor qualidade também.

O conjunto das plantas que cada povo conhecia foi-se sucessivamente enriquecendo com a chegada de outras, normalmente trazidas de locais distantes pelos povos invasores ou provindo de povos de outras paragens, que eram subjugados. Com o tempo, devido à facilidade de contacto e à abertura de vias de comunicação, as relações e as trocas comerciais entre os povos conheceram grande incremento.

No século XV as naus e caravelas das Descobertas foram os grandes veículos de profundas modificações nos hábitos alimentares dos povos do Velho Mundo. Nesta tarefa, os Portugueses e Espanhóis desempenharam um papel cuja importância está muito longe de ser devidamente reconhecida na sua globalidade e extensão, mais tarde continuada por outros povos colonizadores (Ingleses, Franceses, Holandeses, etc.). Todos estes povos foram portadores para as terras recém-conhecidas ou conquistadas de plantas de que habitualmente se serviam, a maioria das quais conseguiu adaptar-se às novas condições. Muitas plantas já então cultivadas ou utilizadas na Europa chegaram assim às Américas, ao Oriente e a África. Em contrapartida, a Europa recebeu as plantas provenientes destes continentes e muitas originárias do hemisfério ocidental, do continente africano e do americano chegaram por sua vez ao Oriente. Para se ter

uma ideia desta permuta podem citar-se alguns exemplos. São de origem americana o cacauieiro, que se conseguiu impor de forma tão marcada no continente africano, o milho, o tomate, a batata, o girassol, o ananás, o amendoim e a baunilha. Do Oriente temos os citrinos, introduzidos pelos portugueses inicialmente no Brasil e depois na África Ocidental Meridional. Da mesma proveniência é o coqueiro, introduzido pelos portugueses na costa ocidental africana, seguindo depois de Cabo Verde para o Brasil. Também do Oriente vieram as bananeiras, as mangas e ainda a cana sacarina, motor de alguns dos esforços da colonização que fizemos e de importância extraordinária na economia mundial. Planta tipicamente oriental é o chá, ou chazeiro, que tem a sua origem nas zonas entre a Índia e a China e que o povo deste último país celebrizou e quase todo o mundo aprecia actualmente. De terras do Oriente vieram as tão apreciadas especiarias, a base dos nossos Descobrimentos: o cravinho, a noz-moscada, a pimenta, a curcuma ou açafrão da Índia, o gengibre, a canela de Ceilão e as canelas da Índia e da China. Já a flora Africana se revelou mais pobre. De lá veio o rícino e os diversos caféeiros.

Nos dias de hoje, pode dizer-se que o Mundo não conhece fronteiras quanto ao intercâmbio de alimentos. E se nem sempre, por questões ecológicas ou outras, é possível a cultura local de plantas muito consumidas, a verdade é que elas chegam a todo o lado graças ao aperfeiçoamento da comercialização, à rapidez dos transportes, à racionalização das embalagens e às técnicas de conservação. Muitas plantas há que, na actualidade, embora resultantes de importação, desempenham um papel primordial na alimentação de vastos grupos populacionais e não raramente chegam a suplantam alguns alimentos de produção local.

Tendo em conta a situação actual, dificilmente se poderia compreender como os países ocidentais poderiam prescindir do chocolate, do café, do chá, das bananas, para falar apenas de alguns dos diversos produtos alimentares que, sendo embora importados, são consumidos em grande quantidade.

Conhecem-se hoje mais de 80 000 espécies vegetais comestíveis (Ferrão, 1984), algumas das quais com numerosíssimas variedades, que constituem um enorme potencial na luta contra a fome e na procura de novos alimentos, mas de todas estas

espécies não são cultivadas intensamente mais de que 150, e apenas cerca de uma vintena constituem o grande baluarte do homem contra a fome. Neste reduzido grupo incluem-se os cereais como o trigo, o arroz, o milho e o sorgo, tubérculos e raízes tuberculosas como a batata, a batata-doce, a mandioca e o inhame e certo número de leguminosas, ricas em proteínas, como o feijão, a fava, e a ervilha ou de proteaginosas como o amendoim e a soja.

Naturalmente, nem todos os países atingem, numa dada época, situações idênticas de desenvolvimento. Basta ver-se como, no momento actual, alguns países desenvolvidos se socorrem quotidianamente de processos muito aperfeiçoados e muito práticos para dispor de alimentos (conservados pelo frio, calor, enlatados, pré-cozinhados, desidratados, liofilizados) nos quais os constituintes fundamentais estão devidamente equilibrados, ao mesmo tempo que em países num estágio de desenvolvimento mais atrasado se continua a praticar um tipo de agricultura obsoleto, com base num sistema itinerante, e os habitantes se alimentam mal, quantitativa e sobretudo qualitativamente, revelando carências alimentares graves. Ainda existem grupos populacionais com uma alimentação quase exclusivamente baseada em amiláceos (banana, batata-doce, milho, inhame, arroz, etc.), que manifesta carências proteicas e vitamínicas graves, e outros onde a proteína é obtida a partir da fauna selvagem, cada vez mais escassa, ou de pequenos animais (lagartas vivas ou secas, torradas, cozidas ou moídas, gafanhotos, formigas, caracóis, ratos, etc.). Na realidade, ainda hoje se conhecem grupos humanos que, tendo aprendido por tradição milenária que as substâncias minerais são importantes para o crescimento, o desenvolvimento e a saúde, e tendo como base da sua alimentação produtos muitos pobres nestes constituintes, juntam aos alimentos, como se de sal se tratasse, pequenos tijolos de terra argilosa seca ao sol que se desfaz na água de confecção dos seus alimentos tradicionais ou simplesmente comem terra nos lambedouros como só animais o fazem por instinto (Ferrão, 1984).

1.2- O processamento dos alimentos

Tradicionalmente, as razões mais importantes para que os alimentos sejam processados prendem-se com a necessidade de os fazer durar o maior período de tempo possível sem que se deteriore e a de melhorar as suas características organolépticas. Actualmente, com o processamento, também se pretende muitas vezes adicionar valor nutricional, melhorar o aspecto final, facilitar o consumo e diminuir o tempo de preparação caseira dos alimentos.

O processamento deve ser efectuado em condições sanitárias adequadas e de forma a garantir perdas mínimas de nutrientes.

As técnicas de processamento de alimentos têm sofrido uma grande evolução ao longo dos tempos. Uma das técnicas mais primitivas tem a ver com a utilização do sal. Logo após a descoberta da agricultura o homem começou a utilizar o sal como forma de conservar os alimentos evitando que se tornassem perecíveis, sobretudo os mais ricos em proteínas (Cardoso, 2002). Actualmente as técnicas de processamento e de preservação dos alimentos incluem, entre outras, a utilização de calor ou trocas de calor, a preservação pelo frio, a evaporação ou desidratação, a adição de químicos e os processos fermentativos. Neste trabalho vão ser estudados fundamentalmente alimentos sujeitos a tratamentos pelo calor pois é nestes que se encontram níveis elevados de acrilamida. Por essa razão apenas esse método será discutido.

1.2.1- Processamento dos alimentos pelo calor

Exemplos de processamentos pelo calor incluem a pasteurização do leite, a confecção de produtos de pastelaria ou padaria, a torra de amendoins, cacau e café e a conservação de enlatados. Outros exemplos são as operações caseiras de preparação dos alimentos (cozinhar) que utilizam calor mais ou menos intenso como assar, cozer, fritar, grelhar, torrar, etc.

Os alimentos podem ser aquecidos ou cozinhados usando injeção directa de vapor quente, contacto directo com a chama, uso de torradeiras, fornos microondas, e

outros tipos de novas tecnologias. Estas técnicas permitem assar, fritar, cozer, concentrar nutrientes em alimentos, desidratar e encerrar embalagens (Smith, 2004). Qualquer que seja o método utilizado é essencial um controlo preciso da temperatura.

Do ponto de vista comercial, as razões básicas para se aquecerem os alimentos incluem:

- A destruição de microrganismos e a preservação dos alimentos: confecção de enlatados e a pasteurização do leite.
- A remoção da humidade e o desenvolvimento de aromas e paladares: torra de cereais prontos a comer, do café e do cacau.
- A inactivação de tóxicos naturais: processamento das refeições com soja.
- A melhoria dos atributos sensoriais dos alimentos tais como a cor, a textura, o paladar: preparação de batatas fritas estaladiças.
- A combinação de ingredientes de modo a fomentar o desenvolvimento de atributos únicos dos alimentos e dessa forma, atrair as preferências dos consumidores.

1.3- Implicações do processamento pelo calor na segurança alimentar

Nas últimas duas décadas, a presença nos alimentos de substâncias potencialmente perigosas tem constituído uma das grandes preocupações das entidades responsáveis pela Segurança Alimentar, pelas consequências que daí podem advir para a saúde pública tanto a curto como, em especial, a longo prazo (Rupp, 2003).

O processamento dos alimentos a temperaturas elevadas, apesar de todas as vantagens já discutidas anteriormente, pode igualmente ser responsável pela redução de alguns parâmetros de qualidade. Por um lado, pode levar a uma perda de constituintes nutricionalmente importantes. É, por exemplo, o caso da pasteurização, processo que apesar de efectuado a uma temperatura moderada (60-70 °C) pode originar grandes perdas a nível de vitaminas e de aminoácidos essenciais.

Por outro lado, e com consequências mais graves a nível toxicológico, podem formar-se compostos com características nocivas, resultantes da interacção entre

compostos dos alimentos entre si, entre estes e constituintes exógenos, como os aditivos ou o próprio meio reaccional (como o óleo de fritar) e entre as substâncias resultantes das interacções iniciais. Estas modificações podem ocorrer com ou sem a acção de agentes exteriores, como o oxigénio atmosférico (Deshpande, 2002).

Durante a preparação caseira dos alimentos, que normalmente tem lugar a temperaturas entre os 100-170 °C, uma das ocorrências mais importantes consiste na formação de muitos compostos não-pirolíticos tóxicos derivados de aminoácidos e proteínas. Em alguns alimentos pode ocorrer uma complexa série de reacções, que resultam na formação de pigmentos castanhos ou negros e que modificam outras propriedades organolépticas como o aroma e o paladar. No seu conjunto, estas reacções denominam-se por reacções de Maillard e iniciam-se a partir de reacções entre compostos carbonílicos, como os açúcares redutores, e compostos com um grupo amina como os aminoácidos (Olano e Martínez-Castro, 1996). Um dos efeitos fundamentais destas reacções consiste na diminuição drástica da qualidade nutricional das proteínas, particularmente por perda de aminoácidos fundamentais. A lisina, por exemplo, é um dos aminoácidos essenciais cujos produtos iniciais da reacção de Maillard são nutricionalmente aceitáveis, mas à medida que a temperatura aumenta e as reacções se sucedem a lisina deixa de estar disponível formando-se N-carboximetilisina (CML) que pode ser usada como um indicador da extensão da reacção. Este composto forma-se também, durante a pasteurização e esterilização do leite e durante a torra de cereais. Os seus efeitos na saúde ainda não estão devidamente estudados.

A pirólise de aminoácidos e de proteínas a temperaturas acima de 100 °C pode originar igualmente a formação de aminas aromáticas heterocíclicas (AAH's) geralmente abundantes na carne e no peixe. Estas substâncias podem gerar-se em grandes quantidades durante a fritura, mas também se formam durante a cozedura dos alimentos em água. Neste último caso a quantidade que se forma é usualmente 10 a 50 vezes inferior do que nos processos "a seco" (Deshpande, 2002).

As nitrosaminas são compostos que se podem formar durante a confecção a temperaturas elevadas de carnes e peixes "curados" com nitritos, precursores destas substâncias.

O 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) é um derivado do furano, produto da decomposição térmica dos açúcares e dos hidratos de carbono em meio ácido, que se forma durante a confecção dos alimentos, a esterilização térmica ou durante o armazenamento a altas temperaturas. Também se encontram derivados do furano em alguns alimentos submetidos a temperaturas bastante elevadas tais como o café.

O aquecimento em meio ácido de alimentos ricos em proteínas ou hidratos de carbono, a temperaturas superiores a 100 °C, pode levar também à formação de cloropropanóis sendo o 3-monocloropropenodiol (3-MCPD) o mais comum. Os efeitos destes compostos na saúde ainda não estão devidamente elucidados.

Quando os alimentos são sujeitos a temperaturas ainda mais altas (acima de 200-300 °C), são formados produtos pirogénicos que se sabem ser mutagénicos e carcinogénicos (Deshpande, 2002). O tipo e a quantidade de produtos pirolíticos que se formam dependem do tempo de aquecimento e da temperatura que os alimentos atingem, mas também de outros factores como o pH, a presença de oxigénio e de outros agentes oxidantes, a interacção com diversos ingredientes ou aditivos e a aplicação de agentes químicos ou de radiação (Sikorski, 2005).

Exemplos destes produtos tóxicos são os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH's), como por exemplo o 3,4-benzopireno, que se detecta em café torrado, carne e peixe assados e grelhados e em pedaços de pão queimados. Também se encontram em carnes e peixes fumados uma vez que se formam abundantemente durante a combustão da matéria orgânica usada como combustível nos fumeiros.

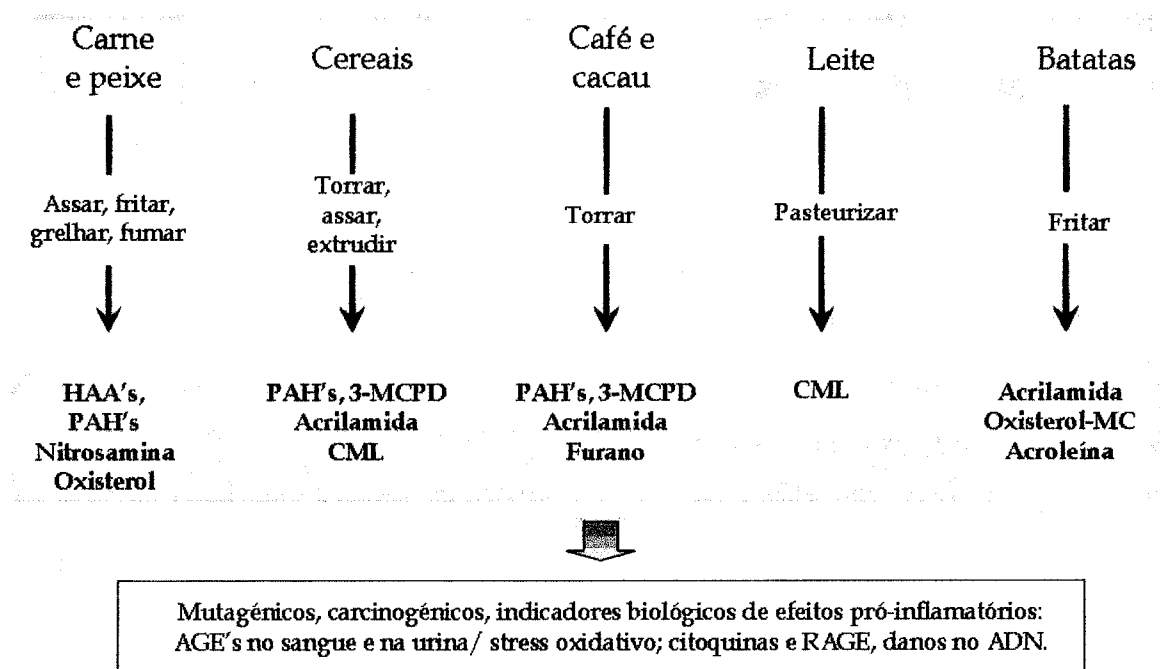
Nos alimentos ricos em lípidos, a principal reacção degradativa é a oxidação das gorduras que ocorre a altas temperaturas e na presença de oxigénio originando oxisteróis, compostos carcinogénicos e mutagénicos. Outro produto altamente tóxico que se forma durante o aquecimento dos óleos de fritura é a acroleína.

A descoberta mais recente é a da acrilamida que se forma em alimentos fritos, assados e torrados, ricos em açúcares redutores e asparagina (Rupp, 2003; Studer, 2004; Sikorski, 2005). A acrilamida é uma substância tóxica, que causa neurotoxicidade em humanos e demonstrou ser carcinogénica e genotóxica em animais de laboratório. Antes da descoberta da presença desta substância nos alimentos, a principal

preocupação relativa à mesma resultava da exposição ocupacional (Tritscher, 2004).

Nos próximos capítulos serão discutidos com mais detalhe os factores e mecanismos que levam à formação de acrilamida nos alimentos.

Na Figura 1.1 é apresentado um esquema dos principais grupos de alimentos e dos compostos potencialmente indesejáveis que se podem formar durante o tratamento térmico.



HAA's- Aminoácidos Aromáticos Heterocíclicos; PAH's- Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos; CML- Carboximetililina; MCPD- monocloropropanediol; MC- monómero cíclico; AGE's- Advanced Glycation End-products; RAGE- Receptor for Advanced Glycation End-products

Figura 1.1- Produtos indesejáveis formados durante a preparação doméstica e industrial dos alimentos a altas temperaturas (Adaptado de: Studer *et. al.*, 2004)

Capítulo 2 - A ACRILAMIDA: PROPRIEDADES, TOXICIDADE E EXPOSIÇÃO DOS CONSUMIDORES

"A dose faz o veneno"

*Paracelsus
(1493-1541)*

2.1- Introdução

A presença de acrilamida em alimentos foi uma descoberta inesperada, em consequência de um escândalo ambiental provocado pela construção do túnel de Hallandsås no sudoeste da Suécia. Construído no seio de um maciço rochoso, o túnel começou a ter problemas de infiltrações de água em 1997 (Lofsted e Boholm, 1999). Uma das soluções encontradas consistiu no uso de uma mistura líquida à base de acrilamida que endurecia em contacto com o ar, dando origem a um polímero à prova de água. No entanto, a maioria do líquido não solidificou e acabou por se misturar com a água da infiltração indo juntar-se a um rio adjacente. A acrilamida livre provocou a morte de peixes e a paralisia de vacas que beberam a água contaminada. Os trabalhadores do túnel, expostos durante dois meses à referida mistura, foram submetidos a análises ao sangue para procurar biomarcadores da acrilamida, tendo-se encontrado fragmentos de acrilamida ligados à hemoglobina. Surpreendentemente foram encontrados fragmentos idênticos no sangue dos indivíduos do grupo de controlo que não tinha sido sujeito a exposição ocupacional (Reynolds, 2002). Apesar dos aductos de acrilamida/hemoglobina aparecerem numa quantidade inferior à dos trabalhadores afectados, os resultados indicavam uma exposição à acrilamida, até então ignorada, da população em geral.

A acrilamida é um dos constituintes do fumo do tabaco que se forma quando este se queima, mas esse facto não explicava os aductos de acrilamida nos voluntários não fumadores. Os investigadores suecos, responsáveis pelo caso, decidiram então monitorizar, como possível fonte de aductos, outros processos que têm lugar a altas temperaturas, como certas formas de preparação de alimentos. Experiências efectuadas com ratinhos, alimentados à base de ração frita, permitiram verificar que o sangue dos animais apresentava aductos de acrilamida ao contrário de um grupo de controlo que apresentava apenas 10% da quantidade encontrada nos primeiros (Tareke *et. al.* 2000). Em consequência, os investigadores decidiram analisar a presença de acrilamida em diversos tipos de alimentos processados a altas temperaturas, nomeadamente carne, peixe, cereais e batatas, tendo verificado que era nas batatas que se encontrava uma

maior quantidade da substância (Tareke *et. al.*, 2002). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 2.1.

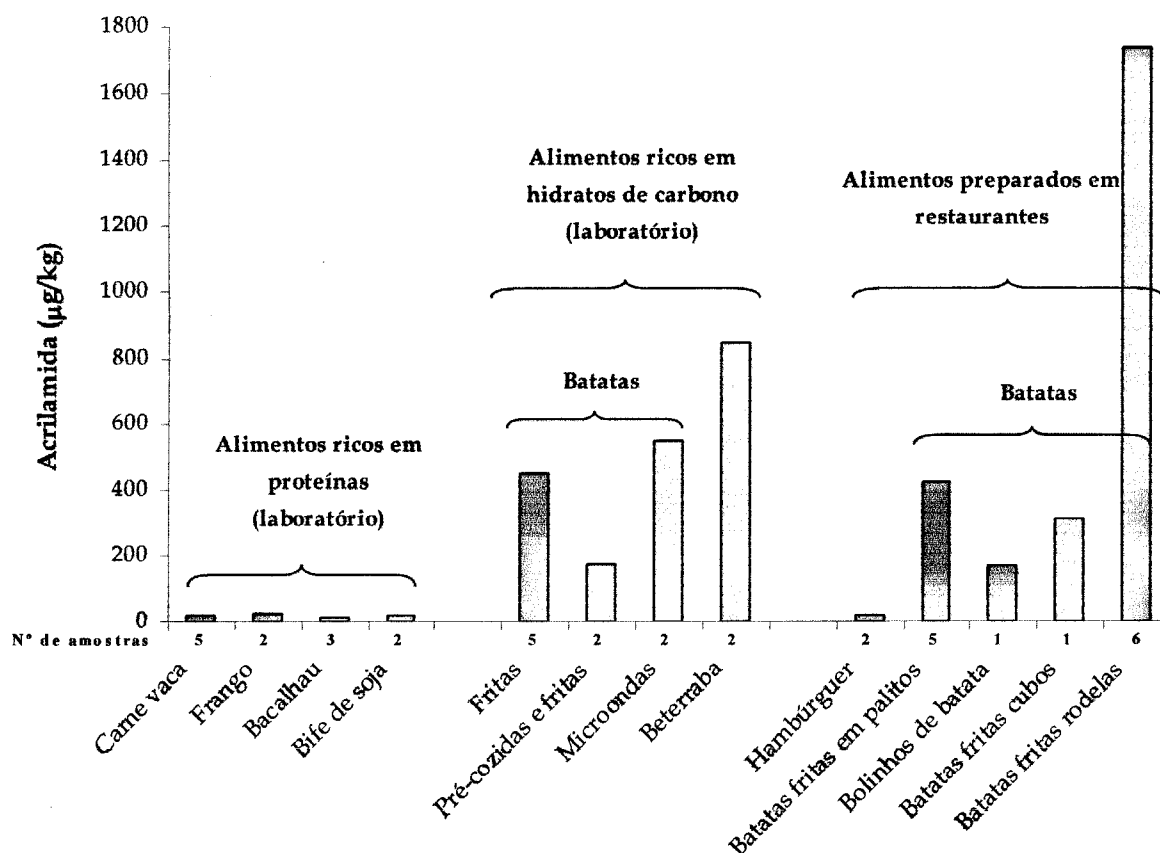


Figura 2.1- Concentração de acrilamida (µg/kg) (média e intervalo) em alimentos comerciais e preparados no laboratório (Adaptado de: Tareke *et. al.*, 2002)

Em Abril de 2002, a Administração Nacional da Alimentação Sueca anunciou numa conferência de imprensa alguns destes resultados, o que provocou o interesse imediato da comunidade científica internacional e o início de uma autêntica explosão de pesquisa científica nesta área (Raloff, 2002; Torbjörn, 2002).

Em 2003, a FDA publicou os seus próprios resultados que confirmavam os dados dos investigadores suecos. Em Portugal, os primeiros testes foram efectuados pela DECO que publicou os resultados na Proteste de Janeiro de 2005, na qual classificava

cerca de 20 marcas de batatas fritas existentes no mercado em boas, más ou medíocres de acordo com a quantidade de acrilamida encontrada (Proteste, 2005).

Os resultados obtidos por várias entidades foram revistos extensivamente por Taeymans *et. al.* (2004), Dybing *et. al.* (2005) e Zhang *et. al.* (2005a).

2.2- Propriedades físico-químicas da acrilamida

A acrilamida, cuja designação química oficial é 2-propenamida, corresponde a um composto de estrutura vinílica de origem sintética (Figura 2.2). A sua produção comercial começou em 1954, sendo o composto obtido a partir da hidratação do acetonitrilo pelo ácido sulfúrico monohidratado a 90 ou 100 °C. A partir da solução de sulfato resultante, a acrilamida é extraída pela neutralização com amónia e subsequente arrefecimento para isolar os monómeros cristalinos. Para suprimir a formação de subprodutos, podem ser adicionados sais de cobre à solução. Alternativamente, a acrilamida pode ser produzida através de uma conversão catalítica directa na qual uma solução aquosa de acetonitrilo é passada por uma camada fixa de cobre metálico a 200 °C.

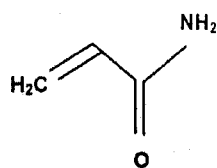


Figura 2.2- Estrutura química da acrilamida

Com a fórmula molecular C_3H_5NO e o peso molecular de 71,08, a acrilamida é um sólido branco, inodoro, cristalino à temperatura ambiente, podendo apresentar-se como uma solução aquosa a 40% (m/v). Polimeriza rápida e exotermicamente a temperaturas acima do seu ponto de fusão (81,0-84,5 °C), em soluções concentradas em meio ácido ou se exposta a radiação ultravioleta (Kazantsev e Shirshin, 2004). É altamente solúvel em água e em solventes orgânicos polares como o metanol, o etanol, o

éter dimetílico ou a acetona e insolúvel em benzeno e heptano (Eriksson, 2005). Sublima lentamente à temperatura ambiente (Girma *et. al.*, 2005).

Aproximadamente 90% da acrilamida produzida é usada na síntese de poliacrilamida, 9% é usada como intermediário químico (por exemplo na formação de *N*-butoxiacrilamida e *N*-metoxiacrilamida) e 1% para usos diversos. A poliacrilamida corresponde a um polímero usado sobretudo no processamento de papel ou pasta de celulose e no processamento de minerais. É também utilizado na indústria de cosméticos, na produção de alguns materiais para embalagem de alimentos, em produtos químicos de uso agrícola e na formulação de plásticos e de tintas. A poliacrilamida é, igualmente, usada para tratamento das águas residuais e para purificação de água potável, possuindo uma acção floculante. Trata-se do único polímero que remove adequadamente certo tipo de partículas da água (Ötles e Ötles, 2004). Outras aplicações incluem a estabilização de solos ou areias, como agente fixante para selar linhas e tampas de esgoto. É também usada em química analítica como suporte sólido para a separação de proteínas por electroforese (Friedman, 2003). A poliacrilamida, ao contrário da acrilamida, não é tóxica. Contudo, em cada uma das utilizações referidas, permanece sempre no produto final uma quantidade residual da acrilamida não polimerizada, o que poderá constituir um risco, principalmente no que diz respeito à água potável.

A acrilamida pode complexar com metais de transição que podem ser usados na produção de polímeros e copolímeros solúveis em água com muitas aplicações comerciais e científicas (Girma *et. al.*, 2005).

A libertação de acrilamida (monómero) no ambiente acontece em trabalhos subterrâneos (como no caso da sua utilização como vedante) ou através do ar. Uma vez no ar, a acrilamida reage para formar outros produtos químicos. Devido à sua incapacidade para se ligar ao solo, a acrilamida derramada à superfície pode mover-se através do solo e penetrar nos lençóis freáticos. Em alguns casos a acrilamida pode ser degradada por microorganismos presentes na água e no solo (Eriksson, 2005).

2.3- Toxicidade da acrilamida

A acrilamida foi classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro como sendo um provável carcinogénico para o homem, uma vez que há evidências suficientes de que é carcinogénico para os animais (IARC, 1999).

Ao longo dos últimos quarenta anos, a acrilamida tem sido alvo de vários estudos científicos que cobrem a sua toxicidade, o metabolismo, a cinética das suas reacções, o modo de acção e os efeitos nos humanos. Até à data o único efeito comprovado na saúde humana é a neurotoxicidade que resulta da exposição ocupacional a doses relativamente altas da substância. A exposição à acrilamida pode ocorrer no local de trabalho ou no ambiente após libertações para o ar, água, solo, ou água subterrânea, penetrando no organismo quer pela via respiratória, quer através do consumo de alimentos ou água contaminados. Também pode ser absorvida através do contacto com a pele. Outras fontes de exposição à acrilamida são os cosméticos, os materiais de empacotamento dos alimentos, o fumo do cigarro (activo e passivo), existindo também a possibilidade de uma possível formação endógena no corpo humano (Matthys *et. al.* 2005).

2.3.1- Absorção, distribuição e metabolismo da acrilamida

Os dados disponíveis sobre envenenamentos ou exposição ocupacional accidental mostram que a acrilamida é rapidamente absorvida através das vias oral, dérmica e inalatória (IARC, 1999; Sumner *et. al.*, 2003). Estudos feitos em diferentes espécies de animais de laboratório indicam que a acrilamida é distribuída rapidamente através do corpo independentemente da via de administração (CAST, 2006).

Uma das principais vias da biotransformação da acrilamida em animais de laboratório corresponde à conjugação com a glutathione, catalizada pela enzima hepática glutathione-S-transferase (GST) dando origem a N-acetil-S-(3-amino-3-oxopropil)cisteína. Uma segunda via metabólica é a oxidação catalisada pela enzima hepática citócromo P450, levando à formação da glicidamida, a qual, por sua vez, pode ser metabolizada

através da conjugação com a GST (Figura 2.3).

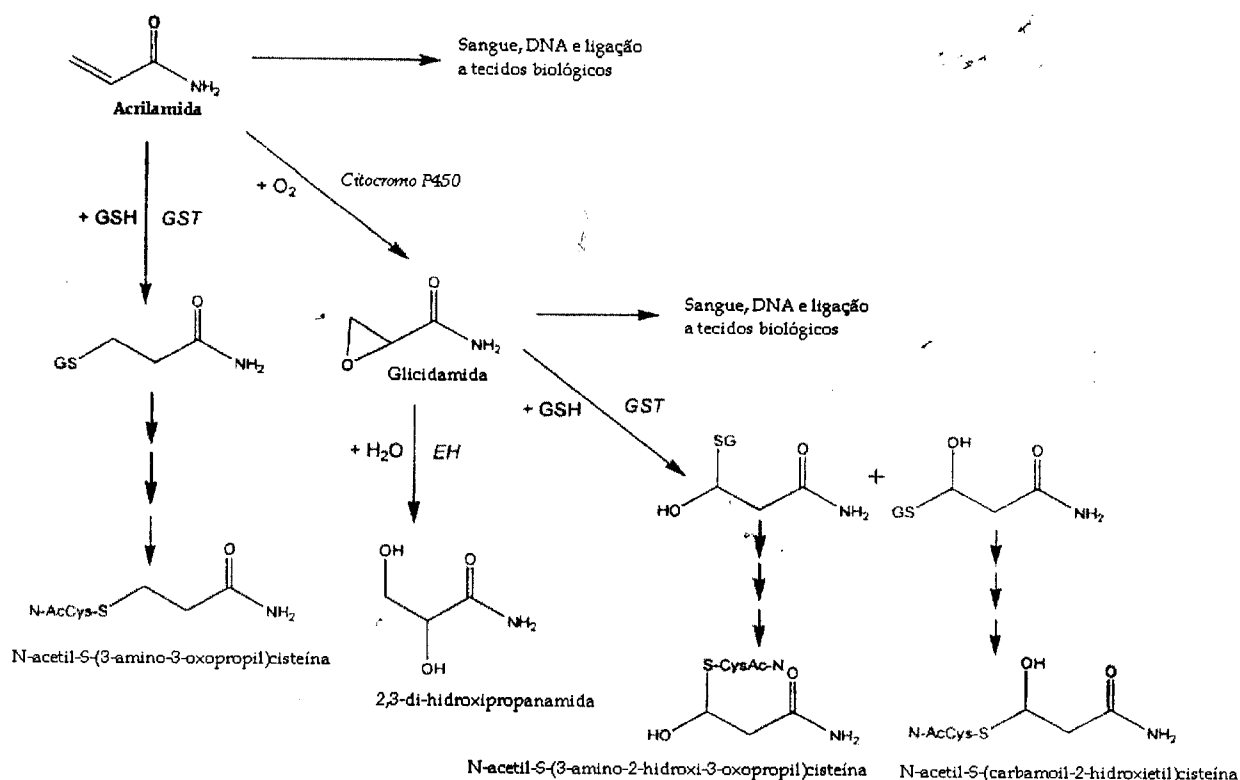


Figura 2.3- Possíveis vias metabólicas da acrilamida. (Adaptado de: Amrein, 2005)

No homem, a acrilamida parece ser metabolizada principalmente em glicidamida via citocromo P450. Tanto a acrilamida como a glicidamida formada reagem com os resíduos N-terminais da valina da molécula de hemoglobina (Figura 2.4). A ligação da glicidamida à hemoglobina forma aductos que servem como biomarcadores da exposição em humanos (Pérez *et. al.*, 1999). O consumo de acrilamida em alimentos reflecte-se na quantidade dos aductos da glicidamida com a hemoglobina (Hagmar *et. al.*, 2005).

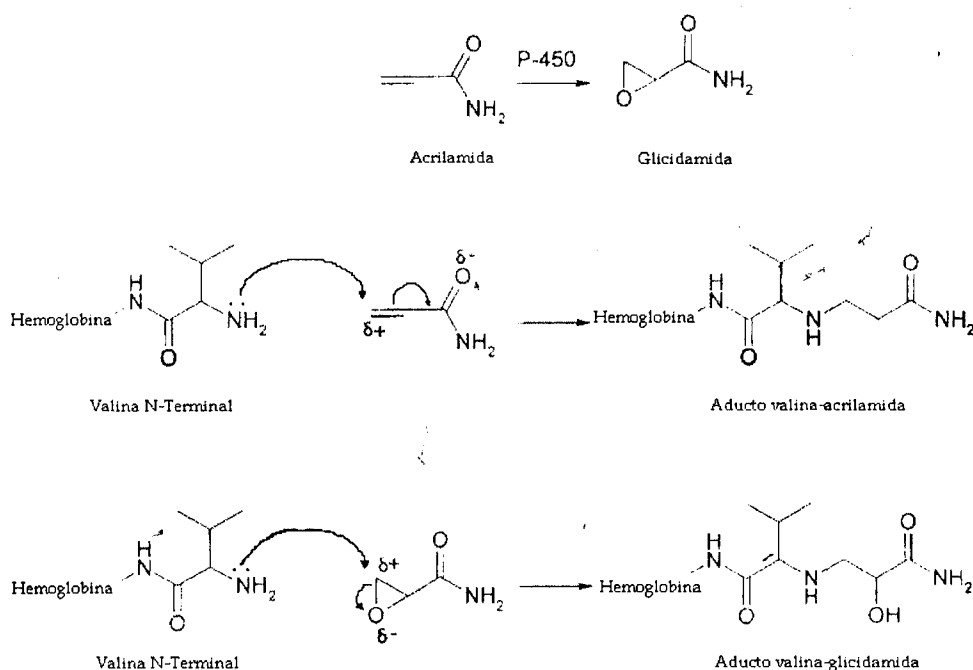


Figura 2.4- Activação metabólica da acrilamida para glicidamida e formação de aductos destes dois compostos com a molécula de hemoglobina por interacção com os resíduos N-terminais de valina.

(Adaptado de: Pérez *et. al.*, 1999)

Os aductos da acrilamida com a hemoglobina foram detectados em roedores, em humanos expostos ao composto e em fumadores (Dybing e Sanner, 2003).

Hagmar *et. al.* (2005) correlacionaram a ingestão de alimentos com o sexo dos consumidores e com hábitos tabágicos. Concluíram que os fumadores apresentavam uma maior percentagem de aductos de acrilamida com a hemoglobina do que os não fumadores. As mulheres fumadoras que consumiam alimentos com grandes quantidades de acrilamida apresentavam uma quantidade maior de aductos em relação às fumadoras que tinham outro tipo de dieta. No caso dos homens fumadores, os mesmos investigadores não encontraram qualquer correlação com os hábitos alimentares.

A acrilamida pode reagir com os outros ingredientes alimentares, principalmente proteínas, DNA e RNA, através da sua ligação dupla terminal extremamente reactiva. Schabacker *et. al.* (2004) concluíram que a acrilamida se pode ligar às proteínas alimentares sob as condições fisiológicas do intestino ou durante a preparação dos

alimentos a temperatura moderada (80 °C). Apesar do monómero acrilamida exibir uma alta biodisponibilidade, a forma ligada a proteínas não consegue atravessar a membrana celular intestinal por difusão. Todavia, as proteínas ligadas à acrilamida irão provavelmente sofrer o normal processo digestivo sendo o destino da acrilamida incerto. Por esse motivo, os autores concluíram que uma dieta rica em proteínas pode reduzir a absorção de acrilamida.

Os dados sobre a eliminação da acrilamida são escassos, especialmente em humanos, mas sabe-se que a excreção do composto puro é baixa e a excreção dos metabolitos, a glicidamida e a N-acetil-S-(3-amino-3-oxopropil)cisteína, ocorre predominantemente através da urina (Mucci *et. al.*, 2003a e 2003b; Sumner *et. al.*, 2003; Fennell *et. al.*, 2005).

2.3.2- Genotoxicidade, carcinogenicidade e neurotoxicidade da acrilamida

A acrilamida é uma potente neurotoxina que afecta tanto o sistema nervoso central como o periférico. A magnitude do efeito tóxico depende da duração da exposição e da dose total. A exposição de animais de laboratório e de humanos à acrilamida origina neurotoxicidade caracterizada por ataxia e fraqueza dos músculos esqueléticos. Os animais expostos também apresentam problemas associados a toxicidade reprodutiva e carcinogenicidade (Lopachin, 2004; Lopachin e Canady, 2004).

Em humanos, a glicidamida, metabolito da acrilamida, forma um epóxido reactivo com o DNA o que implica genotoxicidade. Os aductos da glicidamida com o DNA foram encontrados após a administração de acrilamida a roedores. A glicidamida é mais reactiva do que a acrilamida nas ligações ao DNA o que faz com que seja responsável por mais efeitos genotóxicos (Kirman *et. al.* 2003).

O mecanismo de indução de tumores pela acrilamida não é bem conhecido. Contudo, a acrilamida poder-se-á ligar aos resíduos de cisteína das proteínas. Desta forma, a sua reactividade com enzimas ou receptores induzirá, eventualmente, mudanças nas funções celulares e vias metabólicas, o que poderá significar um possível envolvimento na carcinogénese (Friedman, 2003; Dybing *et. al.*, 2005). Serão passíveis de

ocorrer, igualmente, mudanças na afinidade para o receptor da dopamina e alterações das hormonas estimulantes da tiróide, da prolactina e dos níveis de testosterona (Friedman, 2003).

Foram realizados vários estudos epidemiológicos para tentar estabelecer a relação entre o consumo de acrilamida e a incidência de cancro em diferentes órgãos. Mucci *et. al.* (2003a, 2003b, 2004 e 2006) não encontraram evidências de que a ingestão de acrilamida esteja associada com o desenvolvimento de cancro do cólon, do recto, da bexiga, dos rins ou do estômago. Pellucci *et. al.* (2006), por seu lado, concluíram que não há um risco acrescido de se desenvolver cancro da mama, ovários, bexiga, rins, próstata e do aparelho digestivo superior. Estes dados são consistentes com outros estudos onde se concluiu que a ingestão de acrilamida não está associada com um aumento do risco de contrair cancro (Tritscher, 2004; CAST, 2006). Apesar dos estudos epidemiológicos não encontrarem nenhuma correlação entre uma exposição elevada à acrilamida e um aumento do número de casos de cancro, ainda são necessários mais estudos para confirmar estes resultados.

Recentemente, Taubert *et. al.* (2006) descobriram que o sulfureto de dialilo inibe o citocromo P450, responsável pela metabolização da acrilamida em glicidamida. Este facto pode ser relevante para a saúde humana uma vez que o possível risco carcinogénico associado à acrilamida pode ser reduzido pela ingestão simultânea de alho, rico naquele composto (Yang *et. al.*, 2001).

A questão mais importante mantem-se: como avaliar a contribuição da acrilamida para o desenvolvimento do risco de cancro em humanos que têm diferentes antecedentes genéticos, que consomem diferentes variedades de alimentos e que diariamente são submetidos a diferentes condições ambientais?

2.4- Avaliação da exposição dos consumidores à acrilamida

A acrilamida encontra-se em muitos alimentos comuns, os quais no seu conjunto representam aproximadamente 40% do total de calorias ingerido (Tareke *et. al.*, 2002;

Petersen *et. al.*, 2003). A presença da substância é mais comum em alimentos vegetais, em particular batatas e produtos derivados de cereais que são cozinhados ou processados a altas temperaturas. Estudos de exposição identificaram estes alimentos como os que contribuem mais significativamente para a ingestão diária de acrilamida. A acrilamida não parece estar presente (ou apresenta-se em níveis não detectáveis) em alimentos crus.

As fontes de acrilamida variam de acordo com o país que se está a considerar, dependendo dos hábitos locais de consumo e dos métodos de processamento usados (Dybing *et. al.*, 2005). Em geral, os produtos como a batata frita e os cereais de pequeno-almoço são as fontes de ingestão de acrilamida mais significativas, mas o pão e o café também são fontes importantes, especialmente nos adultos. Para as crianças e adolescentes, as bolachas e biscoitos podem constituir uma fonte importante de acrilamida (CAST, 2006). Nas Figura 2.5 e Figura 2.6 são apresentadas, a título de exemplo, as contribuições de diferentes fontes de alimentos de acordo com os hábitos alimentares dos adolescentes da Alemanha (Dybing *et. al.*, 2005) e da Bélgica (Matthys *et. al.*, 2005).

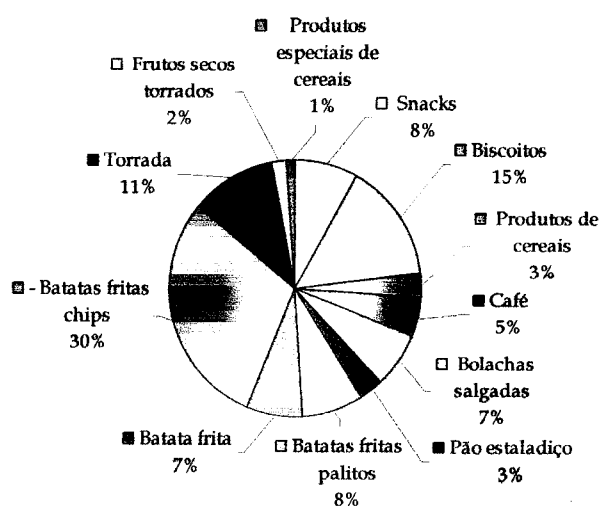


Figura 2.5- Alemanha, adolescentes (15-18 anos).
(Adaptado de Dybing *et. al.*, 2005)

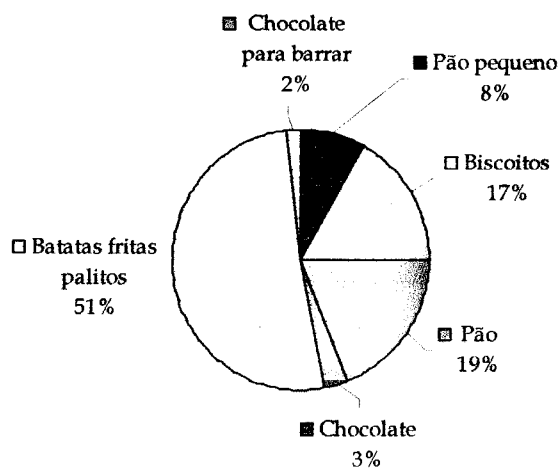


Figura 2.6- Bélgica, adolescentes (13-18 anos).
(Adaptado de Matthys *et. al.*, 2005)

Na Holanda, Konings *et. al.* (2003) relacionaram a quantidade de acrilamida com a faixa etária dos consumidores tendo concluído que no caso de crianças e adolescentes as batatas fritas de diferentes tipos são a principal fonte de acrilamida enquanto nos adultos, para além das batatas, o café passa a ser uma fonte importante (Figura 2.7, Figura 2.8 e Figura 2.9).

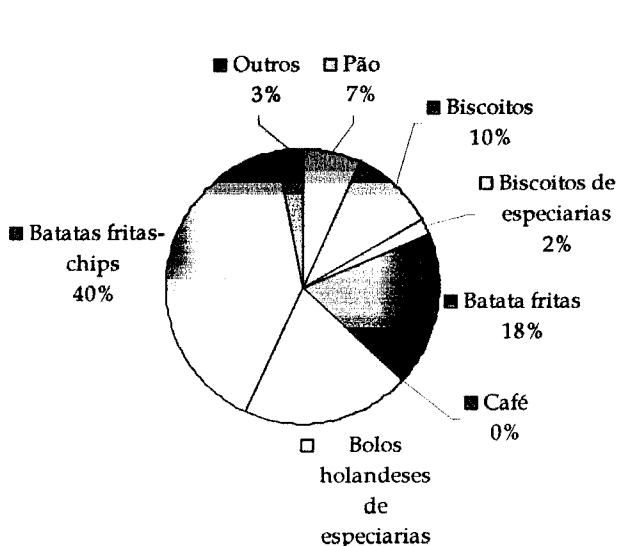


Figura 2.7- Holanda, crianças (1-6 anos) (Adaptado de Konings *et. al.*, 2003)

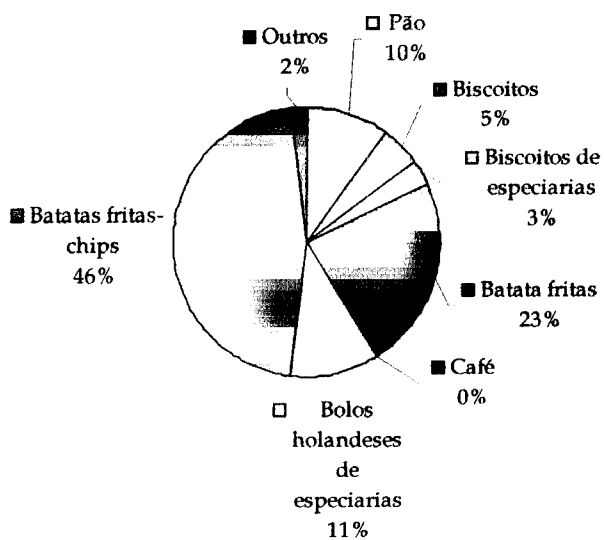


Figura 2.8- Holanda, crianças e adolescentes (7-18 anos) (Adaptado de Konings *et. al.*, 2003)

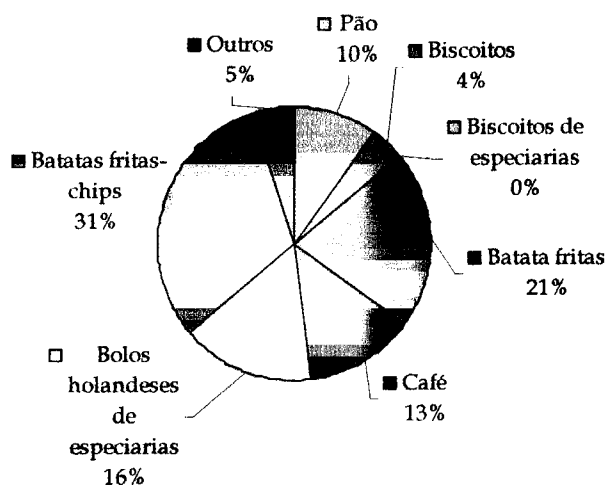


Figura 2.9- Holanda, população em geral (1-97 anos) (Adaptado de Konings *et. al.*, 2003)

Estudos feitos em países nórdicos, como a Noruega (Figura 2.10 e Figura 2.11) e a Suécia (Figura 2.12), confirmaram que o café tem um contributo muito importante na ingestão diária de acrilamida de adultos, tanto em homens como em mulheres (Dybing e Sanner, 2003; Svensson *et. al.*, 2003).

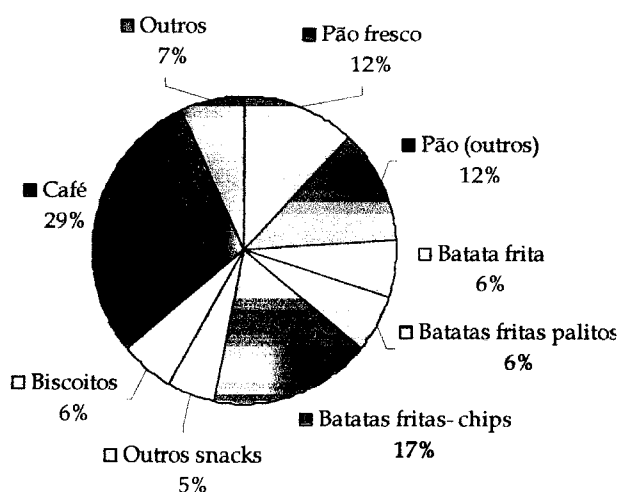


Figura 2.10- Noruega, adultos mulheres (16-79 anos). (Adaptado de Dybing e Sanner, 2003)

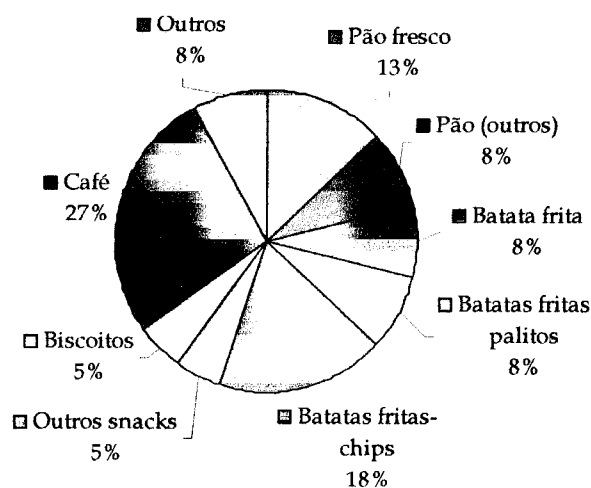


Figura 2.11- Noruega, adultos homens (16-79 anos). (Adaptado de Dybing e Sanner, 2003)

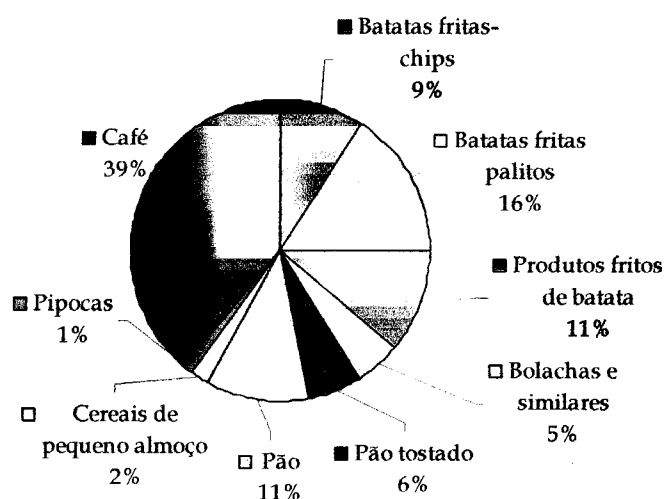


Figura 2.12- Suécia, adultos (18-74 anos). (Adaptado de Svensson *et. al.*, 2003)

Alimentos com uma baixa quantidade de acrilamida mas consumidos em grande escala, como o pão, podem igualmente ser uma fonte importante de exposição à acrilamida (Matthys *et. al.*, 2005).

Aproximadamente 50% da ingestão da acrilamida pode ser originada pela alimentação preparada em casa ou nos restaurantes. Os dados quantitativos ainda são, contudo, muito escassos (Stadler e Scholz, 2004; Dybing *et. al.*, 2005). Por exemplo, quando o pão é torrado, a quantidade de acrilamida pode aumentar até dez vezes dependendo do tempo da torra e da temperatura (Ahn *et. al.*, 2002).

A Food and Drug Administration (FDA) criou uma base de dados online referente à concentração de acrilamida em alimentos (USFDA-CFSAN, 2006). A European Union Joint Research Centre (EU) e a World Health Organization (WHO) (EU/WHO, 2006) criaram também uma base de dados onde os resultados disponíveis são monitorizados. Os dados nos *sites* da FDA e da EU indicam que as batatas e o café estão entre os produtos que contribuem para uma maior exposição à acrilamida (Stadler e Scholz, 2004). Outras comparações são difíceis de fazer devido aos diferentes tipos de alimentos apresentados pelas diversas bases de dados, mas no geral a concentração média da acrilamida para produtos semelhantes é mais baixa no caso da FDA (CAST, 2006).

Capítulo 3 - A COMPOSIÇÃO QUÍMICA E O PROCESSAMENTO DOS ALIMENTOS

“Esta bebida de Satanás (café) é tão deliciosa que seria uma pena deixar aos infiéis o deleite exclusivo de tomá-la. Há que enganar o diabo e convertê-la à Cristandade.”

Papa Clemente VIII (1536-1605)

3.1- Introdução

No capítulo anterior foram mencionados os alimentos que mais contribuem para a exposição dos consumidores à acrilamida: os produtos fritos à base de batata, pão e derivados (biscoitos doces e salgados, bolos, etc), chocolate, no caso de adolescentes, e café, quando se consideram os adultos.

Neste capítulo irá ser apresentada uma breve descrição química destes alimentos assim como dos métodos de processamento pelo calor a que são submetidos antes do seu consumo.

3.2- O café

O termo “café” designa não só a bebida obtida pela extracção do café torrado com água quente mas também uma larga gama de produtos intermediários dos quais as bagas de café recém-colhidas são o primeiro exemplo (Smith, 1985; Spiller, 1998a).

O arbusto do café pertence à família das Rubiáceas, a qual inclui mais de 500 géneros e cerca de 8000 espécies. Foram identificadas até agora pelo menos 66 espécies do género *Coffea* L. (Lineu), mas apenas duas são economicamente importantes (Illy e Viani, 1995). Estas são o *Coffea arabica*, que representa cerca de 75% da produção mundial de café e o *Coffea canephora*, variedade *robusta*, cuja produção representa aproximadamente os restantes 25%. Nas Figura 3.1 e Figura 3.2 estão representados ramos com frutos de café de cada uma destas espécies.

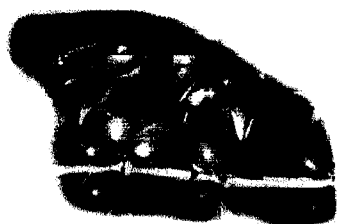


Figura 3.1- Café Arábica. Adaptado de:

<http://www.osamayor.com/cafe/>, consultado em 2006/01/15



Figura 3.2- Café Robusta. Adaptado de:

<http://www.osamayor.com/cafe/>, consultado em 2006/01/15

Para além de diferenças taxonómicas, existem, entre as duas espécies de café, diferenças na composição química, tanto qualitativas quanto quantitativas.

3.2.1- Processamento do café

Os arbustos do café dão origem a uns frutos vermelhos (bagas de café) cujas sementes são os grãos de café verde. Na Figura 3.3 está representado um corte esquemático de uma baga de café.

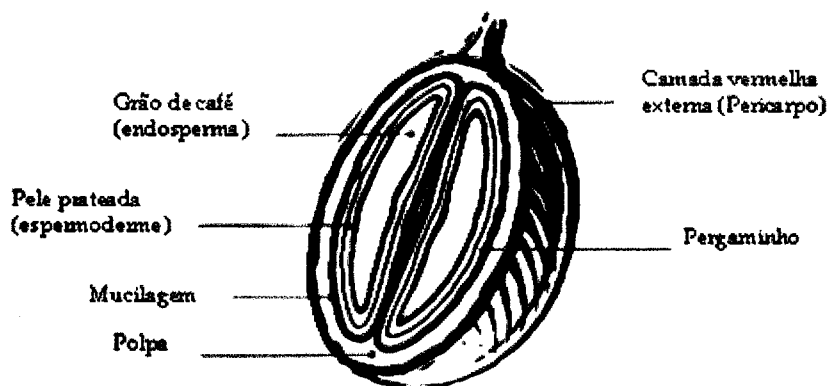


Figura 3.3- Corte esquemático de uma baga de café (Adaptado de:

<http://www.laohamutuk.org/Bulletin/2002/Apr/bulletinv3n23a.html>, consultado em 2006/01/15)

Uma vez maduros, os frutos são colhidos e submetidos a sucessivos processos de remoção da camada externa, da polpa, da mucilagem, da camada de pergaminho e finalmente, da pele prateada que envolve o grão de café verde (endosperma). Há dois processos que permitem remover estas camadas. O “método húmido”, que dá origem a cafés altamente aromáticos, com pouco “corpo” e um paladar ácido, e o “método seco” que origina cafés encorpados e aromas menos intensos. No método húmido a polpa dos grãos de café verde é eliminada por fermentação, com as vantagens decorrentes de

formação de alguns compostos aromáticos, sendo os grãos posteriormente secos e descascados mecanicamente (Spiller, 1998a). No método seco, os grãos de café são secos ao sol e descascados também mecanicamente (Smith, 1985). A opção por um destes métodos depende principalmente das condições climáticas da zona em questão e também dos custos associados, que são significativamente menores no método seco (Illy e Viani, 1995; Spiller, 1998a). Por exemplo, junto do Equador, onde chove abundantemente ao longo de todo o ano, só o método húmido é possível, enquanto nas zonas subtropicais, com épocas de chuvas e de seca bem definida, a opção por um dos métodos baseia-se na referida sazonalidade (Illy & Viani, 1995).

Em ambos os métodos os grãos de café devem ser embalados e armazenados com uma percentagem de humidade de cerca de 12%, a uma temperatura inferior a 21 °C (Spiller, 1998a).

3.2.1.1- A torra do café

Os grãos de café verdes não originam uma bebida com paladar e aroma agradáveis. O desenvolvimento dos aromas, sabores e cores típicos do café são desenvolvidos durante a torra.

O processo de torra consiste na aplicação considerável de calor aos grãos, entre 200 a 250 °C durante um período de tempo que pode variar entre 5 a 20 minutos. Os grãos têm que ser mantidos em movimento para assegurar uma torra uniforme, até atingirem a cor desejada, sendo nesta altura rapidamente arrefecidos por uma corrente de ar frio com ou sem a ajuda de um jacto de água (Schwartzberg, 2002).

De um modo geral, durante a torra os grãos perdem cerca de 15-20% da massa total devido à perda de humidade e à pirólise de alguns compostos. Aumentam de volume entre 100 a 130% em função do tempo da torra e a sua cor muda de amarelo esverdeado para castanho mais ou menos escuro em função do grau de torra escolhido, ligeira, média, intensa ou muito intensa (Tabela 3.1).

Tabela 3.1- Correlação entre o grau de torra e a duração total do processo. (Adaptado de: Gonzales, 2004)

Grau de torra	Tempo de torra (em min), a 205 °C
Ligeira	7
Média	10
Intensa	13
Muito Intensa	19

A sua composição química também sofre uma grande transformação, tanto a nível quantitativo como qualitativo, devido à ocorrência de reacções complexas de pirólise e de condensação, que dão origem a uma grande variedade de produtos degradativos, formados a partir de diversos precursores, como proteínas, hidratos de carbono, compostos fenólicos e azotados de menor massa molecular. Simultaneamente, verifica-se a formação de pigmentos de massa variável que, no seu conjunto, apresentam uma grande importância nas características organolépticas da bebida do café. A extensão das reacções depende da respectiva velocidade e da duração do processo (Clarke, 1985; Spiller, 1998a; Belitz *et. al.*, 2004a; Solá, 2005).

3.2.1.2- A preparação do café torrefacto

O café torrefacto tem como característica o facto de os grãos de café verde serem adicionados de açúcar ou xarope de glicose, em quantidades tais que não superem os 15% em massa de café total (Petrik, 2005).

Dentro do tambor da torra, o café é levado até uma temperatura 20 a 30 °C abaixo da temperatura da torra. Introduce-se nesta altura o açúcar e mistura-se muito bem de modo a que o mesmo funda à volta dos grãos. Depois, sobe-se a temperatura até cerca de 200 °C, o açúcar carameliza e forma uma película queimada à volta do café. Este tipo de processamento dá origem a uma bebida com mais corpo e com um sabor amargo característico. Todavia, este método mascara os aromas dos bons cafés, sendo normalmente apenas utilizado na torra de cafés de menor qualidade (Solá, 2005).

3.2.1.3- A moagem do café torrado

A preparação do café bebida exige uma moagem prévia do café torrado, a qual pode ser executada a nível industrial ou apenas no momento do consumo.

Os grãos de café torrado precisam de estar duros, frios e quebradiços para que a moagem seja uniforme e eficaz (Andueza *et. al.*, 2003). Durante o processo, são libertadas grandes quantidades de dióxido de carbono e de outros compostos voláteis (Spiller, 1998a). A temperatura também sobe um pouco, normalmente até cerca de 50 °C, mas idealmente não deve exceder os 35 °C, para minimizar a perda de compostos voláteis e o aumento de gosto de queimado no café (Solá, 2005).

O grau de moagem depende do método de extracção que se vai usar. Moagem muito fina é usada para preparar café turco ou grego, moagem fina para café "expresso", moagem média para máquinas de balão e moagem mais grossa para se preparar café solúvel, uma vez que permite que a água não fique retida pelo pó durante a percolação. Uma vez que o café moído oxida e perde a frescura rapidamente, é conveniente consumi-lo rapidamente ou embalá-lo de forma a permitir a manutenção das suas características (Smith, 1985).

3.2.1.4- Preparação de café descafeinado

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um alcalóide natural presente em muitos alimentos e bebidas, sendo considerada a droga mais popular do Mundo. É consumida principalmente através do café, do chá e de outras bebidas energéticas (Lundsberg, 1998).

Os efeitos da cafeína no organismo dependem de muitos factores tais como da dose ingerida, do sexo, da idade, da condição física, do ambiente, do consumo de tabaco, da medicação e de outros factores. Em todo o caso, há a possibilidade da substância apresentar efeitos adversos na saúde humana (Ramalakshmi e Raghavan, 1999; Nawrot *et. al.*, 2003). Por esse motivo, nos últimos anos tornou-se prática corrente o consumo de café descafeinado, ou seja, isento de cafeína.

A extracção da cafeína dos grãos de café verde pode ser efectuada por um de três processos: com água (Smith, 1985), com dióxido de carbono líquido a altas pressões (Katz, 1985; Belitz *et. al.*, 2004a; Zlobine, 2005) ou com um solvente orgânico (Spiller, 1998a). Os dois primeiros são actualmente os métodos mais usados pelos produtores, com predominância para a extracção com dióxido de carbono, que tem a vantagem adicional de poder ser aplicada aos grãos torrados. A aplicação de solventes orgânicos é usada esporadicamente uma vez que está condicionada pela legislação em muitos países, que exige que a quantidade de solvente residual usado na descafeinação seja inferior a 10 mg/kg, o que nem sempre é fácil de conseguir.

Em Portugal, os teores residuais de cafeína, expressos em cafeína anidra, não podem exceder 0,09% no café verde e 0,1% no café torrado e no café moído. No café solúvel e nos extractos de café o limite máximo é de 0,3% em relação à respectiva matéria seca (Portaria 268, 1980; Decreto-lei 53, 1989).

Recentemente foi divulgada por Silvarolla *et. al.* (2004) a descoberta de um mutante da espécie Arábica que apresenta apenas 0,06% de cafeína em relação aos 1,2% da espécie vulgar. Esta descoberta poderá revolucionar o mercado do café uma vez que o processo de descafeinação, apesar de todos os avanços na área, provoca a perda de importantes compostos aromáticos e outros sólidos solúveis e produz uma bebida de valor inferior. Neste momento os esforços estão orientados no sentido de tornarem esta nova planta economicamente rentável e produtiva.

3.2.1.5- Preparação do café solúvel

Os passos essenciais na produção de café solúvel consistem na mistura adequada de cafés torrados, normalmente da variedade robusta, moagem, extracção aquosa e remoção da água da infusão por desidratação ou liofilização (Smith, 1985; Spiller, 1998a; Rovira, 2005). O processo faz com que o extracto de café obtido perca a maioria dos seus compostos voláteis e aromáticos. Têm sido desenvolvidas várias técnicas para recolher estes compostos aromáticos e adicioná-los de novo ao café solúvel antes de ser embalado (Spiller, 1998a).

3.2.1.6- Os sucedâneos do café

O uso de substitutos de café constitui uma prática generalizada, em especial em épocas de baixa produção de café e consequente aumento de preço, tanto devido a causas naturais como a perturbações no comércio internacional, tais como as que ocorreram durante as duas Grandes Guerras Mundiais. Em alguns países consumidores estes substitutos têm poder de competição com o café puro, não só pelo preço mais reduzido como pelo facto de não possuírem cafeína.

O sucedâneo de café mais importante é a chicória, sendo também usados alguns cereais, como a cevada, o malte, o centeio, o trigo e o milho, e, em menor grau, algumas plantas leguminosas, como por exemplo o grão-de-bico, o amendoim, o feijão, a soja, e o tremço. De um modo geral, estes produtos são torrados a 180-200 °C, cobertos com açúcar e de novo torrados de modo a que se forme uma camada dura e quebradiça que favorece o processo de moagem (Belitz *et. al.*, 2004a). Todos estes substitutos são consumidos puros ou como misturas com e sem adição de café solúvel (Smith, 1985).

3.2.1.7- Café tratado

Algumas das substâncias que se formam durante a torra, como por exemplo os ácidos fenólicos e as ceras, são irritantes para o organismo. Vários processos têm sido desenvolvidos para separar estes compostos do café torrado de forma a torná-lo tolerável para as pessoas mais sensíveis. Os mais comuns são a lavagem dos grãos com dióxido de carbono líquido ou com um solvente orgânico e depois com vapor de água (Belitz *et. al.*, 2004a).

3.2.2- Os componentes químicos do café

Os componentes químicos do café verde dependem da espécie e da variedade em questão e, em menor extensão, de outros factores como as práticas agrícolas, o grau de maturação e as condições de armazenamento.

Durante a torra ocorrem mudanças consideráveis, uma vez que os compostos mais lábeis são degradados e os compostos mais reactivos interagem para formar produtos complexos. A infusão do café torrado e moído em água quente também origina uma grande mudança na composição, uma vez que os compostos mais solúveis em água são preferencialmente extraídos. Outras alterações são observadas após processamentos adicionais como a descafeinação. Na Tabela 3.2 apresenta-se um resumo razoável dos dados disponíveis.

Tabela 3.2- Composição química de cafés Arábicas e Robustas verdes e torrados e de café solúvel em pó em % de matéria seca. (Adaptado de: Smith, 1985)

Componente	Arábica		Robusta		Café Solúvel
	Verde	Torrado	Verde	Torrado	
Minerais	3,0-4,2	3,5-4,5	4,0-4,5	4,6-5,0	9,0-10,0
Cafeína	0,9-1,2	~1,0	1,6-2,4	~2,0	4,5-5,1
Trigonelina	1,0-1,2	0,5-1,0	0,6-0,75	0,3-0,6	-
Lípidos	12,0-18,0	14,5-20,0	9,0-13,0	11,0-16,0	1,5-1,6
Ácidos clorogénicos (Σ)	5,5-8,0	1,2-2,3	7,0-10,0	3,9-4,6	5,2-7,4
Ácidos alifáticos	1,5-2,0	1,0-1,5	1,5-2,0	1,0-1,5	-
Oligossacarídeos	6,0-8,0	0-3,5	5,0-7,0	0-3,5	0,7-5,2
Polissacarídeos (Σ)	50,0-55,0	24,0-39,0	37,0-47,0	-	~6,5
Aminoácidos livres	2,0	0	2,0	0	0
Proteínas	11,0-13,0	13,0-15,0	11,0-13,0	13,0-15,0	16,0-21,0
Ácidos húmicos	-	16,0-17,0	-	16,0-17,0	15,0

Uma análise sumária da Tabela 3.2 permite confirmar a existência de importantes modificações na composição do café durante a torra, como a perda total de aminoácidos livres, a diminuição acentuada do teor de polissacarídeos e a formação de ácidos húmicos (Casal *et. al.*, 2003; Murkovic e Derler, 2006).

Os aminoácidos estão presentes nos grãos de café verde tanto no estado livre como parte integrante das proteínas. O teor de aminoácidos livres nos grãos depende do grau de maturação e da espécie. Na Figura 3.4 apresenta-se uma comparação entre o

conteúdo de aminoácidos livres presentes nas duas espécies de café mais comuns. A asparagina, que como vimos anteriormente, é um dos principais precursores da acrilamida, é um dos três aminoácidos presentes em maior quantidade em ambas as espécies.

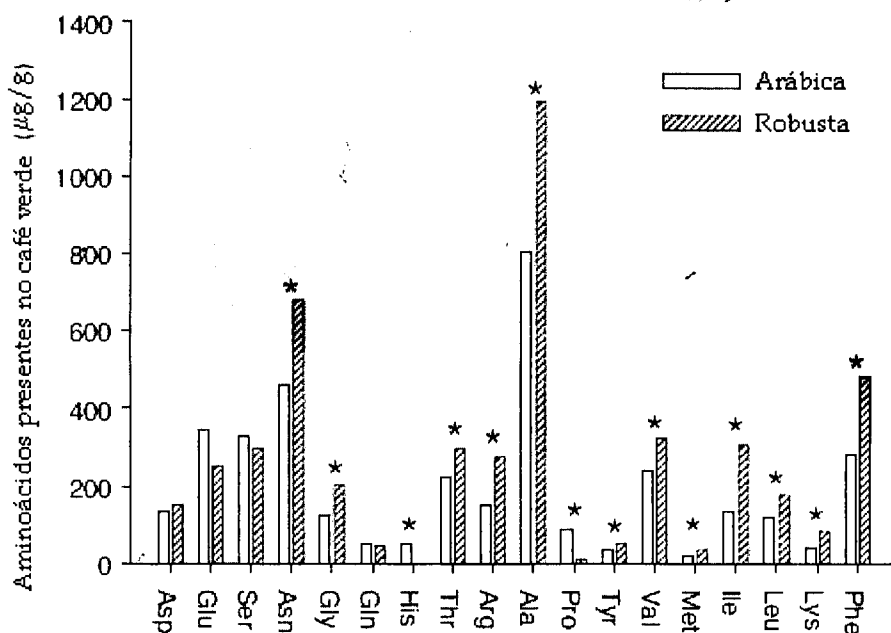


Figura 3.4- Aminoácidos presentes no café verde nas espécies Arábica e Robusta. (*: Diferença significativa). (Adaptado de: Murkovic e Derler, 2006)

ALA— alanina, ARG- Arginina, ASN— asparagina, ASP— ácido aspártico, GLN— glutamina, GLU— ácido glutâmico, GLY— glicina, HIS— histidina, ILE— isoleucina, LEU— leucina, LYS— lisina, MET— metionina, PHE— fenilalanina, PRO— prolina, SER— serina, THR— treonina, TYR— tirosina, VAL— valina

Durante a torra ocorre a desnaturação das proteínas e a sua degradação em fragmentos de mais baixo peso molecular. Adicionalmente, algumas das proteínas podem reagir com os hidratos de carbono (reacção de Maillard) e com compostos fenólicos. Os aminoácidos livres presentes degradam-se ou combinam-se com outros compostos, dando origem a uma mistura complexa de compostos voláteis e não voláteis. Muitos destes compostos voláteis são importantes constituintes aromáticos, pelo que os níveis de aminoácidos podem ter uma influência directa no aroma e, consequentemente, na qualidade do café torrado. Também é razoável supor que os

aminoácidos livres, apesar de presentes em muito menor quantidade do que os ligados a proteínas, serão mais importantes a este respeito uma vez que estão mais acessíveis às espécies reactivas presentes no meio (Macrae, 1985; Montavon *et. al.*, 2003).

O café verde contém uma variedade de diferentes hidratos de carbono entre os quais a glicose (7-8% no total de matéria seca) e a galactose (11-13% no total de matéria seca), e polissacarídeos insolúveis (Spiller, 1998b). Durante a torra, os polissacarídeos degradam-se e tornam-se mais extraíveis contribuindo para as propriedades organolépticas da infusão de café tais como a viscosidade, a permanência do paladar na boca e a formação e estabilidade da espuma no café “expresso”. Também contribuem para a retenção de compostos voláteis (Trugo, 1985; Nunes e Coimbra, 1998; Redgwell *et. al.*, 2002).

Um grupo característico de compostos que se forma durante a torra é o dos pigmentos. Em geral, trata-se de melanoidinas, que resultam da combinação da caramelização da sacarose e de reacções de condensação entre componentes com grupos amina e açúcares redutores (Macrae, 1985; Spiller, 1998b). As melanoidinas são o resultado final da reacção de Maillard nos grãos de café e são responsáveis pela retenção de compostos aromáticos (Andriot *et. al.*, 2004).

3.2.3- Bebidas derivadas do café

Para a preparação do café bebida podem usar-se diferentes proporções de pó de café e água de acordo com os hábitos de consumo, diferentes de país para país. Normalmente, usa-se uma mistura de café das variedades Arábica e Robusta de forma a combinar a grande aromaticidade dos primeiros com o “corpo” e com a maior riqueza em cafeína dos segundos.

Em Portugal, o tão apreciado “expresso” obedece a certas regras específicas para que se possam apreciar todas as suas características sensoriais e aromáticas. Assim o “expresso” ideal deverá ser preparado de acordo com os dados apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3- Parâmetros que definem um “expresso”. (Adaptado de: Illy e Viani, 1995; Barberá, 2005)

<i>Temperatura da água de extracção</i>	Constante a 92 °C
<i>Pressão da água</i>	constante a 8/9 atmosferas
<i>Água</i>	Mineral pouco dura
<i>Volume de café na taça</i>	30/35 mL
<i>Tempo de extracção</i>	25/30 segundos
<i>Porção de café moído</i>	6,5 ± 1,5 g
<i>Espuma</i>	Cor de avelã, com estrias tipo “tigre”, de 2/3 mm de espessura, consistente durante 2 a 3 minutos no mínimo
<i>Qualidades sensoriais</i>	Corpo denso e opaco. Aromático, pouco amargo. Paladar permanente
<i>Chávena</i>	De porcelana, redonda e côncava e mantida a uma temperatura entre 40 a 50 °C segundo o calor específico e o material da chávena

É a natureza polifásica do “expresso” que o torna único em relação a qualquer outra bebida de café, tanto a nível organoléptico como a nível físico-químico (Illy & Viani, 1995). Trata-se de uma solução concentrada de sais, ácidos, açúcares, cafeína e muitas outras substâncias complexas que formam a matriz onde coexistem três fases dispersas:

1. Uma emulsão de gotas de gordura
2. Uma suspensão de partículas sólidas
3. Uma névoa de bolhas de gás, a efervescência, que forma a espuma.

A bebida obtida a partir do café solúvel é marcadamente diferente da bebida obtida a partir do café moído. O café solúvel possui muito maior quantidade de hidratos de carbono solúveis, logo apresenta geralmente mais corpo e mais espuma, para além de um sabor mais amargo.

No caso do café descafeinado, este origina uma bebida relativamente livre de cafeína e com um paladar menos aromático devido ao tratamento para extrair a cafeína.

Em resumo, pode concluir-se que o café é uma bebida extremamente variável. Os parâmetros necessários para a definir incluem a espécie do café, as técnicas de cultura, o método do processamento do café verde, a técnica de torra, e o método de extracção ou

técnica de preparação do café solúvel. Considerações adicionais que poderão interferir com o paladar e o aroma podem ser a utilização de fertilizantes e o modo de armazenamento (Spiller, 1998a).

3.3- O cacau

O cacau pode ser consumido como bebida mas as suas características são diferentes das bebidas do café e do chá, uma vez que não forma uma infusão aquosa límpida, mas sim uma suspensão. No entanto, o produto derivado do cacau mais consumido em todo o Mundo é, sem dúvida, o chocolate.

Alimentos à base de grãos de cacau são consumidos pelo Homem desde, pelo menos, 460 a 480 AC. O grão de cacau corresponde à semente da árvore tropical de cacau, *Theobroma cacao*, da família das *Sterculiaceae*.

Os grãos de cacau contêm uma grande variedade de compostos biologicamente activos. Estes incluem os alcalóides derivados da purina como a teobromina (que é a predominante), a cafeína e a teofilina (Apgar e Tarka, 1998). Ao contrário do café e do chá, o cacau tem que ser consumido em grandes quantidades para que as suas propriedades estimulantes se façam sentir (Belitz *et. al.*, 2004b).

O consumo de cacau no Mundo é semelhante ao do café, sendo mais elevado nos países Europeus e na América do Norte (Lundsberg, 1998).

3.3.1- Colheita e processamento do cacau

Os frutos do cacau são colhidos quando maduros e as sementes são extraídas com uma parte da polpa envolvente. A polpa é removida por um processo de fermentação que decorre durante 2 a 8 dias, durante o qual começam a desenvolver-se a cor e o aroma típicos do cacau. Após a fermentação, as sementes são secas, usualmente ao sol durante alguns dias, até que atinjam um grau de humidade de 6 a 8% e percam cerca de metade da sua massa (Belitz *et. al.*, 2004b). De seguida, os grãos fermentados

são torrados a temperaturas entre os 130 a 150 °C durante 15 a 45 minutos, dependendo da extensão de torra pretendida (Krysiak, 2006). Os grãos torrados são rapidamente arrefecidos com água, secos e transferidos para uma máquina que elimina as películas e os restos secos da polpa. Posteriormente, são desintegrados e moídos de forma a romper as paredes celulares e a libertar a manteiga de cacau que se encontra no interior. O produto resultante é uma pasta moldável bastante fluida chamada licor de cacau.

Este produto sofre uma neutralização parcial dos ácidos livres de forma a suavizar o sabor e melhorar as propriedades da suspensão, evitando a formação de depósito na bebida de cacau (Belitz *et. al.*, 2004b).

3.3.2- Composição química do cacau

O processo de fermentação dos grãos verdes de cacau é responsável pela formação de grande parte dos precursores responsáveis pelo paladar e aroma característicos. O desenvolvimento completo do aroma do cacau depende das condições da torra, mas também do período de colheita e da secagem.

Durante a fermentação, as alterações químicas e físicas ocorrem rapidamente devido à presença de uma grande quantidade de açúcar e de microrganismos na polpa. Os açúcares são convertidos em alcoóis e finalmente em ácido acético que penetram a película protectora do grão onde, com a ajuda do calor que se liberta, vai causar a destruição das células, iniciando as alterações químicas necessárias ao desenvolvimento dos compostos aromáticos (Escrivá *et. al.*, 1998; Thompson *et. al.*, 2001).

A desestruturação celular permite a mistura entre si de compostos solúveis em água que normalmente não entrariam em contacto uns com os outros. A complexidade das reacções que ocorrem durante a fermentação ainda não está completamente compreendida, mas algumas enzimas presentes no cacau que participam neste processo são a glicosídase, a protéase e a polifenol oxídase (Thompson *et. al.*, 2001).

Em geral, as proteínas, que correspondem a cerca de 60% do conteúdo total em azoto dos grãos de cacau, são hidrolisadas a péptidos e aminoácidos, os açúcares são hidrolisados e formam-se ácidos voláteis e muitos outros compostos, produto de

diferentes reacções (Bonvehí, 2005).

A quantidade e a composição dos aminoácidos livres mudam durante a fermentação. As sementes não fermentadas apresentam uma concentração mais baixa de aminoácidos livres em relação às sementes fermentadas. Após a fermentação, a asparagina corresponde a cerca de 7% da quantidade total de aminoácidos livres (Rosihus *et. al.*, 2006).

A hidrólise da sacarose, que ocorre durante a fermentação, fornece a quantidade de açúcares redutores necessários para a formação dos compostos aromáticos durante a torra (Bonvehí, 2005).

Rosihus *et. al.* (2006) analisaram a quantidade de asparagina e de açúcares redutores presentes nos grãos de cacau fermentados e nas batatas cruas. Concluíram que, em termos absolutos, os grãos de cacau apresentam uma quantidade muito inferior de asparagina (<20%) e de açúcares redutores (<5%) em relação à quantidade encontrada nas batatas.

Os lípidos, presentes em quantidades elevadas (cerca de 54%), dão origem à manteiga de cacau que possui um grande valor nutricional e económico com diversas aplicações (Belitz *et. al.*, 2004b).

Durante a fermentação e secagem subsequente, os grãos verdes perdem cerca de 65% do seu peso. A redução da humidade interrompe o processo enzimático. A secagem fica completa quando a quantidade de humidade dos grãos atinge 6% e estes se tornam muito quebradiços (Apgar e Tarka, 1998).

O processo de torra que se segue, provoca a libertação de compostos aromáticos desejáveis, que se formam durante a reacção de Maillard. Outro dos objectivos da torra do cacau é a obtenção da textura adequada para a posterior moagem (Bonvehí, 2005; Ramli *et. al.*, 2006).

3.3.3- Produção de chocolate

O chocolate é fabricado a partir do licor de cacau não neutralizado ao qual se adiciona açúcar, manteiga de cacau, baunilha, canela, e, ocasionalmente, leite, nozes,

café, etc. Os ingredientes são misturados e refinados, sendo o produto obtido sujeito a um processo de “maturação” de forma a melhorar o sabor. A massa de chocolate é finalmente moldada na forma desejada (Belitz *et. al.*, 2004b). Para se obter um produto final altamente aromático, estruturalmente homogêneo, estável e com viscosidade adequada para que se “derreta na boca”, devem seguir-se cuidadosamente os procedimentos associados aos vários passos descritos (Fryer e Pinschower, 2000).

Comercialmente, o chocolate pode ser apresentado de diversas formas e com diferentes aplicações. Na Tabela 3.4 apresenta-se um resumo da composição de alguns produtos de chocolate de maior consumo.

Tabela 3.4- Composição química de alguns produtos à base de chocolate (Adaptado de: Fryer e Pinschower, 2000; Belitz *et. al.*, 2004b)

Produto	Massa de cacau %	Leite em pó magro %	Manteiga de cacau %	Manteiga de leite (gorda) %	Açúcar %
	Percentagem usual dos componentes (%)				
Chocolate de culinária	33-50	---	5-7	---	50-60
Chocolate para fundir	35-60	---	0-15	---	38-50
Chocolate de creme de leite	10-20	8-16	10-22	5.5-10	35-60
Chocolate de leite inteiro	10-30	9.3-23	12-20	3.2-7.5	32-60
Chocolate de leite magro	10-35	12.5-25	15-25	0-2	30-60
Chocolate negro	39.6	---	11.8	---	48.1
Chocolate amargo	60.7	---	2.6	---	36.3
Gelado de chocolate	33-65	---	5-25	---	25-50

3.4- Os cereais

Os cereais são membros da grande família das monocotiledóneas, as *Gramineae*. A sua importância como alimento teve origem no facto de os grãos de cereais serem muito nutritivos e as suas culturas serem de alto rendimento, com médias mundiais na

ordem das três toneladas por hectare. A composição dos grãos de cereais inclui geralmente cerca de 70% de hidratos de carbono, 10% de proteínas e 3% de lípidos, que logicamente variam de acordo com a espécie, condições de cultivo e variedade (Morris e Brice, 2000).

Os cereais mais cultivados são o trigo, o centeio, o arroz, a cevada, o milho, o sorgo e a aveia, com os dois primeiros a ocupar uma posição especial uma vez que são adequados para preparar pão. No seu conjunto, os cereais são de extrema importância na preparação de alimentos bem como de rações para animais. São por isso cultivados em cerca de 60% das áreas agrícolas do Mundo (Belitz *et. al.*, 2004c).

3.4.1- Composição química dos cereais

A parte dos cereais que se recolhe e processa é o grão. Este é constituído pelo germe, pelo endosperma e pelo pericarpo. Na Figura 3.5 apresenta-se um corte longitudinal de um grão de cereal onde estão representadas as várias camadas que constituem os grãos.

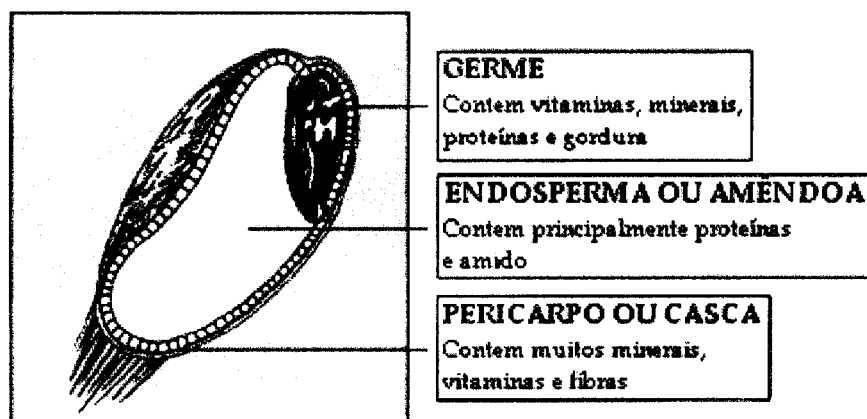


Figura 3.5- Corte longitudinal de um grão de cereal. (Adaptado de: <http://www.hawos.de/pages/engl/alles3.htm>, consultado em 2006/09/20)

Do ponto de vista nutricional, os cereais são de uma grande riqueza. Para além de hidratos de carbono, proteínas e fibra fornecem uma grande variedade de micronutrientes em particular alguns tipos de vitamina B, de vitamina E e de minerais,

como o ferro. A distribuição dos nutrientes pelas diferentes partes não é uniforme. Enquanto o amido se encontra só no endosperma, as proteínas estão distribuídas por todo o grão e as fibras quase se limitam à casca (Alldrick *et. al.*, 2000).

O amido é o hidrato de carbono presente em maior quantidade nos cereais. São as quantidades enormes de amido rodeado por proteínas insolúveis que dão origem à farinha. Das proteínas destaca-se o glúten, que é o responsável pelas propriedades do trigo durante o processo de cozedura no forno (Belitz *et. al.*, 2004c).

Os aminoácidos livres presentes nos cereais dependem da espécie que se está a considerar. De um modo geral o ácido glutâmico (19-33% de aminoácidos livres), a asparagina (15-18% *idem*) e a leucina (7-15% *idem*) são os aminoácidos presentes em maior quantidade (Ejeta *et. al.*, 1987; Doyle, 2002; Elmore e Mottram, 2002).

Apesar de serem uma excelente fonte de nutrientes, os cereais apresentam, porém, duas limitações muito importantes:

1. Em termos de composição de aminoácidos constituintes das suas proteínas, os cereais tendem a apresentar níveis reduzidos de alguns dos aminoácidos essenciais, em particular de lisina e treonina. Este facto é importante ao considerar o valor nutritivo das rações de animais, mas em relação à alimentação humana só é relevante em sociedades com uma dieta proteica muito limitada.

2. A biodisponibilidade dos nutrientes dos cereais é baixa o que implica a necessidade de um processamento adequado. A biodisponibilidade de um nutriente pode ser definida como a quantidade de um nutriente presente num alimento, capaz de ser absorvida no sistema gastrointestinal.

3.4.2- Processamento dos cereais

Os cereais apresentam uma percentagem relativamente baixa de água (cerca de 12%), o que permite o seu armazenamento pouco depois da colheita. Nos casos em que é necessário um passo adicional de secagem, esta pode ser efectuada com uma corrente de ar quente a cerca de 60-80 °C.

A produção de farinha baseia-se na simples trituração dos grãos, sendo

eliminadas as cascas. Uma vez obtida, a farinha pode ser usada para preparar diversos produtos alimentares.

Os produtos de padaria são produzidos a partir de farinha de trigo, centeio e em menor quantidade de outros cereais, por adição de água, sal, um agente levedante (leveduras ou produtos químicos) e outros ingredientes como leite, manteiga (para tornar o produto menos consistente), açúcar, ovos, etc., sendo posteriormente processados num forno. Podem dividir-se em dois grandes grupos.

O primeiro é o grupo do pão e derivados, produzidos normalmente a partir de farinha muito fina, misturada com água e sal e com um grau de humidade final de cerca de 15%. A possível adição de leite, açúcar e manteiga é sempre inferior a 10%. Como agente levedante usam-se leveduras, normalmente as *Saccharomyces cerevisiae*, que degradam em simultâneo a sacarose e a maltose acelerando o processo de fermentação. A temperatura óptima de fermentação é de 28 a 32 °C e deve ser mantida durante cerca de três horas. O pH óptimo para o crescimento varia entre 4 e 5. Para além da libertação de CO₂ e de etanol, que aumentam o volume da massa, as leveduras originam alguns compostos responsáveis pelo aroma.

O segundo corresponde ao grupo da padaria fina que inclui produtos com um tempo de vida prolongado como biscoitos, bolachas doces e salgadas, etc. Estes produtos são feitos com farinha misturada com 10% de manteiga e/ou açúcar, assim como outros ingredientes e um levedante químico. O grau de humidade nestes produtos é extremamente reduzido. Os levedantes químicos mais utilizados são o bicarbonato de sódio (NaHCO₃), usado para preparar bolachas, e o hidrogenocarbonato de amónia (NH₄HCO₃) usado, por exemplo, no fabrico de pão de gengibre e de bolachas de mel. A interação entre a água, o meio ácido, o calor e um levedante químico em pó provocam a libertação de CO₂. Nos casos dos agentes à base de amónia, estes decompõem-se a temperaturas acima dos 60 °C libertando NH₃, CO₂ e água. A temperatura do forno e o tempo de cozedura dependem do produto final que se pretende. Geralmente a massa vai ao forno entre 200 e 250 °C durante 15 a 20 minutos.

Durante a cozedura no forno destes produtos, numa primeira fase, verifica-se uma maior actividade das enzimas e das leveduras que provocam um aumento do

volume, devido à libertação de produtos gasosos, à medida que a temperatura sobe. Consequentemente, a massa do pão cresce rapidamente. A actividade das leveduras cessa por volta dos 45 °C e desaparece acima dos 55 °C. As amilases, no entanto, continuam activas até cerca de 70 °C continuando a quebrar o amido em açúcares mais simples.

À medida que a temperatura aumenta, começam a ocorrer mudanças físicas na massa particularmente a partir de 65 °C. O amido começa a gelificar e as proteínas coagulam acima dos 75 °C. Obviamente, é na zona superficial da massa que a temperatura é mais alta, e no interior raramente excede os 100 °C. Isto resulta numa crosta castanha e dura devido à ocorrência de reacções de Maillard e a mudanças estruturais provocadas pela produção de dextrinas a partir do amido (Belitz *et. al.*, 2004c).

3.5- Os vegetais

Os vegetais podem definir-se como as partes frescas de plantas que, cruas, cozinhadas, enlatadas ou processadas de alguma forma fazem parte da alimentação humana. De um ponto de vista botânico, os vegetais podem ser divididos em *algae* (algas marítimas), cogumelos, raízes vegetais (cenouras), tubérculos (batatas, inhame), bolbos e caules (rábano, salsa), vegetais folhudos (espinafres), vegetais inflorescentes (bróculos), vegetais granulosos (ervilhas verdes) e vegetais com fruto (tomate) (Belitz *et. al.*, 2004d).

Neste trabalho, e tendo em conta a formação de quantidades elevadas de acrilamida em batatas, irá ser feita apenas referência às mesmas e aos tipos de processamento mais comuns a que são sujeitas.

3.5.1- Composição química das batatas

As batatas contêm cerca de 1 a 3% de compostos azotados dos quais 35 a 80%

correspondem a proteínas, sendo a parte restante constituída por aminoácidos livres, péptidos e outros compostos. Os açúcares predominantes nas batatas são a glicose e a frutose (0,3 a 4%) assim como a sacarose (0,1 a 12%). Outros açúcares ocorrem em quantidades mais pequenas. O amido é o polissacarídeo mais abundante nas batatas com cerca de 13 a 23% em percentagem de matéria seca de batata (International Starch Institute, 2001). Outros polissacarídeos presentes são a celulose, a hemicelulose e as pectinas.

A fracção proteica consiste em grande parte em enzimas, as quais podem ser prejudiciais ou benéficas durante o processamento. A sua presença é importante na formação de compostos aromáticos e, conseqüentemente, do sabor típico dos produtos finais (Belitz *et. al.*, 2004d). Para além das proteínas, as batatas também apresentam aminoácidos livres, sendo a asparagina e a glutamina os que estão presentes em maior quantidade (Figura 3.6).

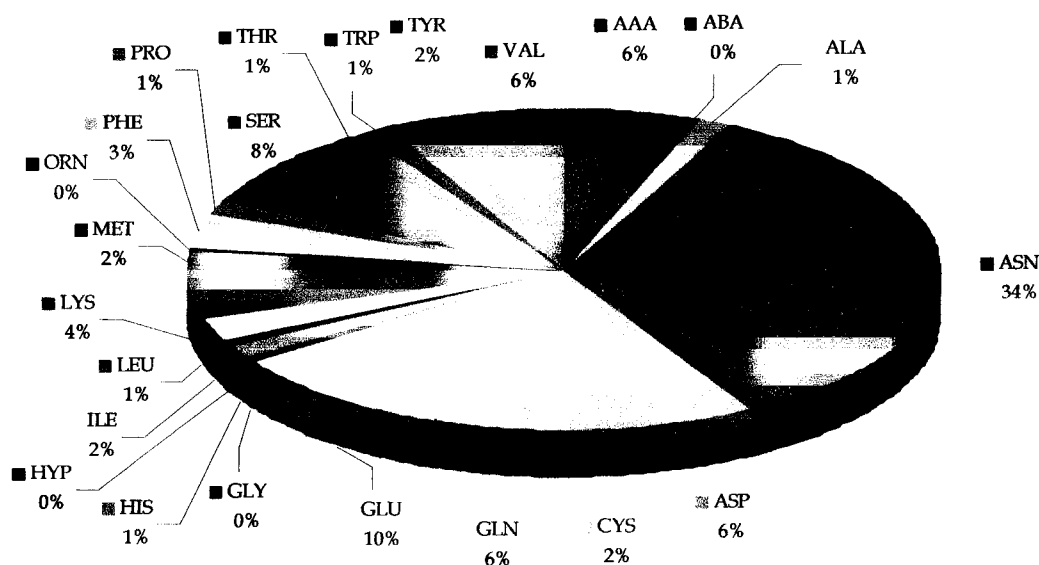


Figura 3.6- Distribuição dos aminoácidos livres (% baseada na quantidade total de aminoácidos livres) em batatas (média de 124 amostras independentes). (Adaptado de: Taeymans *et. al.*, 2004).

AAA – ácido aminoadípico, ABA – ácido aminobutírico, ALA – alanina, ASN – asparagina, ASP – ácido aspártico, CYS – cisteína, GLN – glutamina, GLU – ácido glutâmico, GLY – glicina, HIS – histidina, HYP – hidroxiprolina, ILE – isoleucina, LEU – leucina, LYS – lisina, MET – metionina, ORN – ornitina, PHE – fenilalanina, PRO – prolina, SER – serina, THR – treonina, TRP – triptofano, TYR – tirosina, VAL – valina. Nota: A Arginina não foi quantificada.

A quantidade dos vários componentes químicos é muito dependente da variedade de batata (Finotti *et. al.*, 2006; Vivanti *et. al.*, 2006), do tipo de solo e da fertilização usada (De Wilde *et. al.*, 2004 e 2006a). O grau de amadurecimento (De Wilde *et. al.*, 2006b) e as condições de armazenamento das batatas cruas afectam essencialmente a quantidade de açúcares redutores (Chuda *et. al.*, 2003; De Wilde *et. al.*, 2005; Ohara-Takada, *et. al.*, 2005) e de aminoácidos livres (Brierley *et. al.*, 1997).

3.5.2- Processamento das batatas. O processo de fritura

A confecção pela fritura de géneros alimentícios é uma prática muito difundida pois trata-se de um processo rápido que permite transmitir aos alimentos um sabor e textura muito apreciados pelo consumidor e pode ser utilizado num leque de alimentos muito variado, desde a batata até ao peixe. Além disso, é um processo bastante económico, pois utiliza com muita eficiência a energia calorífica (Pokorný, 2002).

A fritura consiste na imersão do alimento num óleo aquecido até cerca de 180 °C. Durante este processo há a transferência directa do calor do óleo quente para o alimento frio. Pode ser descrita de uma forma simplista em duas fases:

1.ª fase – desidratação parcial dos alimentos. Durante esta fase, a água presente nos alimentos liberta-se rapidamente sob a forma de vapor e vai diminuindo até se dissipar. Outros materiais solubilizados na fase aquosa são retirados do interior dos alimentos para o exterior.

2.ª fase – entrada do óleo nos alimentos. O óleo vai ocupar parte do espaço deixado livre pela água o que confere aos alimentos um sabor característico. A profundidade de penetração está condicionada pela humidade, pela forma e volume do alimento e, ainda, pelo tempo e temperatura de fritura (DRABL, 2006).

A forma mais usual de processar as batatas e de as conservar por maiores períodos de tempo é a fritura. Durante este processamento as batatas adquirem uma tonalidade mais escura, normalmente entre a cor amarela e a cor castanha, tornam-se

estaladiças e há a formação de compostos aromáticos característicos devido à reacção de Maillard.

As altas temperaturas a que se processa a fritura provocam alterações físicas e químicas nas batatas e também nos óleos que sofrem várias reacções de degradação que limitam o seu tempo de vida. Algumas destas reacções são a hidrólise, a oxidação e a polimerização que dão origem a vários compostos químicos. A acumulação destes causa alterações na viscosidade e na cor e aumenta a formação de espuma no óleo. A quantidade de substâncias que se formam e as suas estruturas químicas dependem de muitos factores incluindo o tipo de óleo e de alimento, as condições da fritura e a disponibilidade de oxigénio (Warner, 2004).

As alterações físicas e químicas que ocorrem nas batatas e no óleo durante o processo de fritura estão resumidas esquematicamente na Figura 3.7.

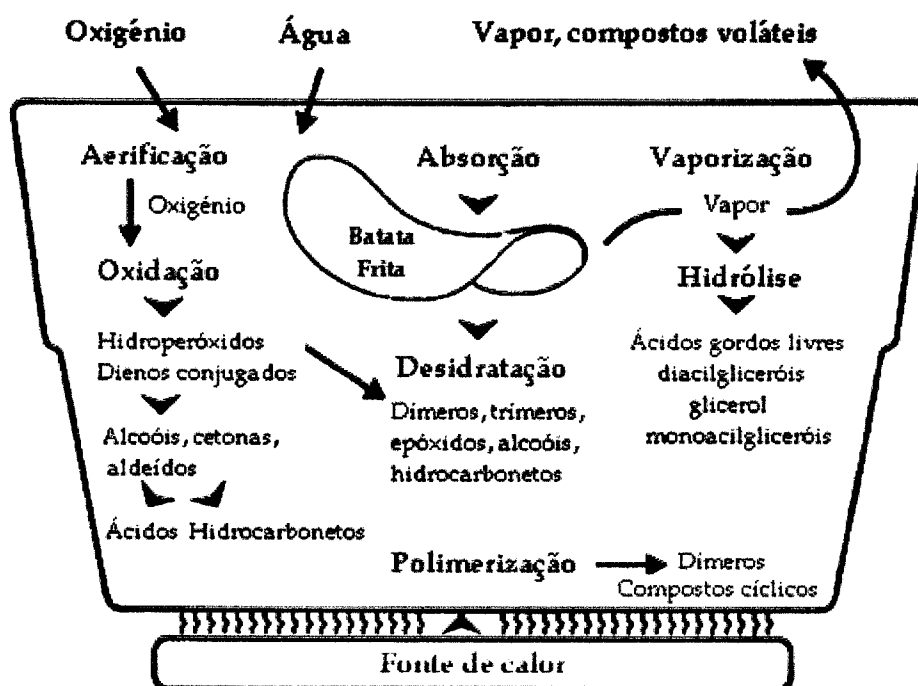


Figura 3.7- Reacções físicas e químicas que ocorrem durante a fritura. (Adaptado de: Warner, 2004)

Na Tabela 3.5 estão resumidos alguns cuidados que se devem ter para evitar a degradação precoce do óleo durante a fritura.

Tabela 3.5- Cuidados a ter para evitar a degradação do óleo de fritar (Adaptado de: Warner, 2004)

<i>Processo de fritura</i>
Manter a temperatura do óleo nem demasiado alta nem demasiado baixa (cerca de 170 °C).
Evitar tempos prolongados de fritura.
Minimizar o arejamento/absorção de oxigénio.
Manter o equipamento de fritura em boas condições.
Manter uma fritura constante, em vez de uma fritura intermitente.
Filtrar o óleo e limpar a fritadeira.

Capítulo 4 – A FORMAÇÃO DA ACRILAMIDA EM ALIMENTOS

“Nada se perde, nada se cria, tudo se transforma”

*Antoine Lavoisier
(1743-1794)*

4.1- Mecanismos de formação da acrilamida em alimentos

Os mecanismos de formação da acrilamida não estão ainda totalmente esclarecidos, mas têm sido muitos os avanços registados nos últimos anos, na sequência do trabalho de diversos grupos de investigação. Uma revisão extensiva sobre este tema foi feita por Taeymans *et. al.* (2004).

Genericamente, a acrilamida aparece em alimentos submetidos a processamento térmico a temperaturas superiores a 120 °C. O teor da substância tende a aumentar com a intensidade e o tempo de aquecimento. Na maior parte dos alimentos, em particular nas batatas e nos cereais processados a altas temperaturas, está estabelecido que a principal via de formação consiste na reacção de Maillard, tendo como ponto de partida a reacção do aminoácido asparagina com açúcares redutores e/ou outras substâncias com função carbonílica. Esta via de formação é consistente com o facto de os produtos mais afectados apresentarem, simultaneamente, elevados teores de asparagina livre e de açúcares redutores.

A recente descoberta de acrilamida em azeitonas pretas, em sumo de ameixa (Roach *et. al.*, 2003), em ração de animais esterilizada por autoclave (Twaddle *et. al.*, 2004) e em açúcar (Lingnert *et. al.*, 2002) parece implicar, todavia, o envolvimento de outras vias de formação durante o tratamento a temperaturas mais baixas.

4.1.1- Formação de acrilamida a partir da reacção de Maillard

Desde os tempos mais remotos, que os alimentos têm sido processados para se obter aromas e paladares mais agradáveis. A transformação que se verifica nos alimentos durante o seu processamento pode ser traduzida por uma cascata de reacções químicas que levam a alterações no paladar e na cor. Uma parte destas reacções constitui aquilo que é normalmente designado por reacções de Maillard (Fay e Brevard, 2005).

Nos alimentos, as reacções de Maillard são responsáveis por mudanças na cor, no paladar e no valor nutritivo, mas também, pela formação de compostos nocivos ou

indesejáveis como as aminas aromáticas heterocíclicas, HAA's (Sugimura *et. al.*, 2000). Os efeitos na saúde dos compostos derivados das reacções de Maillard têm sido intensivamente estudados. Para além de compostos nocivos como os já referidos, outros produtos apresentam, pelo contrário, actividade antioxidante, quimiopreventiva e antimutagénica (Somoza, 2005).

A reacção geral de Maillard corresponde a um conjunto de reacções que se desencadeiam em várias etapas, iniciando-se a partir da reacção entre os grupos amínicos livres de aminoácidos, péptidos ou proteínas e os grupos hidroxil-glucosídicos dos açúcares redutores. As primeiras etapas da reacção são relativamente simples envolvendo a condensação de um composto aminado com um açúcar redutor, o que dá origem a uma glicosilamina. Estes compostos, por sua vez, conduzem à formação de um número limitado de derivados (bases de Schiff, aldossilaminas e compostos de Amadori) que no seu conjunto são habitualmente designados por pré-melanoidinas. As etapas seguintes, que se traduzem pela degradação dos compostos de Amadori, conduzem à formação de variadíssimos compostos, muitos dos quais correspondem a moléculas insaturadas que se podem polimerizar (Nunes e Baptista, 2001).

A reacção de Maillard pode ser resumidamente descrita através do seguinte esquema (Figura 4.1):

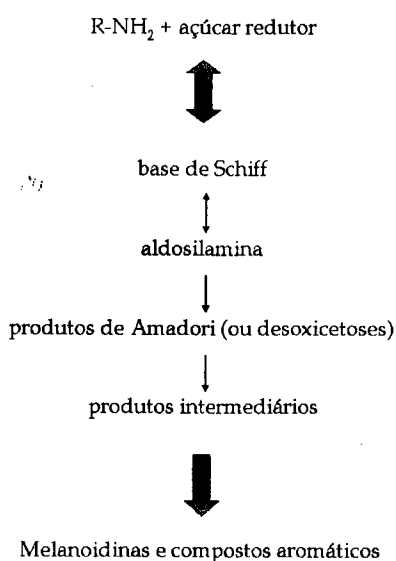


Figura 4.1- Esquema geral da reacção de Maillard (Adaptado de: Nunes e Baptista, 2001)

Os complexos amino-açúcar que se produzem nas primeiras fases da reacção apresentam propriedades físico-químicas (como ausência de cor, alta solubilidade em água e estabilidade ao calor) diferentes das exibidas pelos produtos finais da reacção, que geralmente apresentam fraca solubilidade e são corados (Nunes e Baptista, 2001). O escurecimento é a característica mais visível da reacção de Maillard. A cor produzida, a sua intensidade e as propriedades do produto final são fortemente dependentes da natureza dos reagentes e das condições de reacção, especialmente do valor de pH, da temperatura e da presença de baixas quantidades de água.

Mottram *et. al.* (2002) e Stadler *et. al.* (2002) foram os primeiros a referir que a acrilamida podia resultar de um mecanismo térmico de Maillard resultante da reacção entre a asparagina (um aminoácido ácido) e açúcares redutores (glicose e frutose). Aqueles autores efectuaram uma série de experiências, nas quais submeteram a tratamento térmico, soluções equimolares de glicose com diversos aminoácidos (asparagina, glicina, cisteína, metionina e glutamina) tendo verificado que nas experiências a 165 °C e pH 5,5 apenas a asparagina dava origem a quantidades bastante elevadas de acrilamida. Foram obtidas evidências de que o esqueleto carbonado e o grupo amida da acrilamida derivam da asparagina, ao usar este aminoácido marcado com isótopos (^{15}N e ^{13}C), verificando-se uma incorporação na nova molécula de mais de 98% destes átomos (Stadler *et. al.*, 2002; Zyzak *et. al.*, 2003).

O mecanismo de Maillard que leva da asparagina até à acrilamida é complexo e pode envolver muitos intermediários diferentes. Mottram *et. al.* (2002) propuseram o envolvimento de um processo químico conhecido por “degradação de Strecker”. A representação esquemática deste mecanismo é apresentada na Figura 4.2.

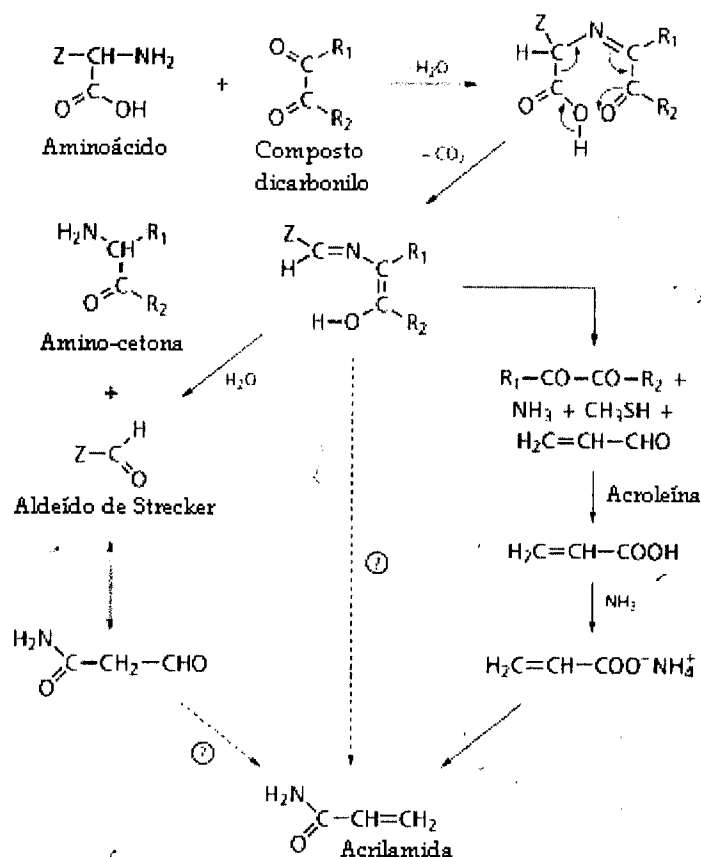


Figura 4.2- Mecanismo de formação da acrilamida após uma degradação de Strecker de um aminoácido na presença de compostos dicarbonílico durante a reação de Maillard (Adaptado de: Mottram *et. al.*, 2002).

Yaylayan *et. al.* (2003) e Zyzak *et. al.* (2003) apresentaram evidências de um percurso alternativo que envolve a descarboxilação nas fases iniciais do N-glicósido da asparagina via formação de uma base de Schiff. Um esquema deste mecanismo é apresentado na Figura 4.3.

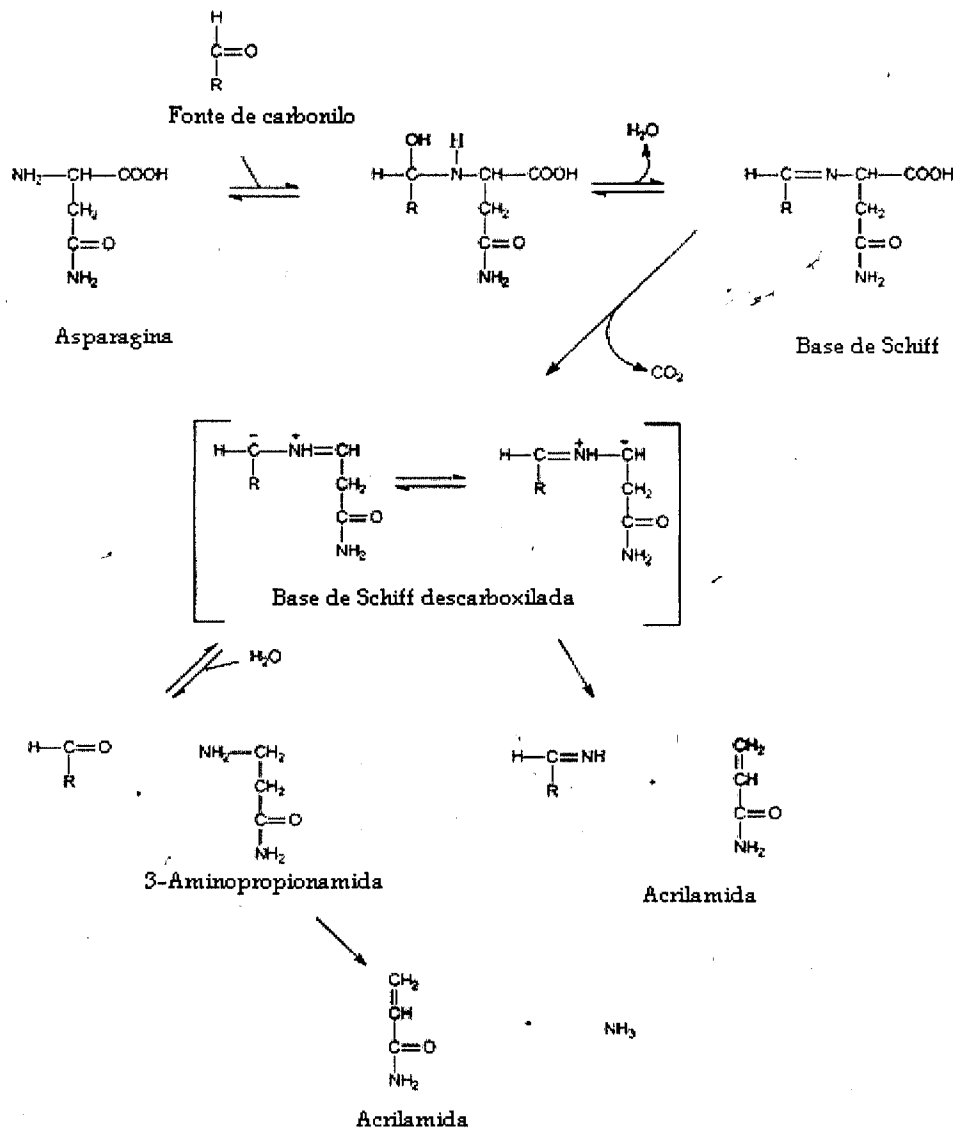


Figura 4.3- Mecanismo de formação de acrilamida em alimentos processados a altas temperaturas, envolvendo a descarboxilação do N-glicosido da asparagina (Adaptado de: Zyzak *et. al.*, 2003).

O facto de a asparagina aparecer como o único aminoácido capaz de levar à formação de acrilamida pode explicar a ocorrência deste composto em alimentos vegetais, como cereais e batatas, que são ricos neste aminoácido em particular. Como já foi referido no Capítulo 3, as batatas contêm cerca de 35% de asparagina em percentagem de aminoácidos livres e os cereais cerca de 15%.

4.1.2- Formação da acrilamida a partir de outros mecanismos

Alguns autores identificaram mecanismos alternativos à reacção de Maillard para a formação de acrilamida em alimentos (JIFSAN Workshop of Acrylamide in Food, 2004). Na Figura 4.4, apresenta-se um esquema com alguns dos mecanismos propostos que serão discutidos nos pontos seguintes.

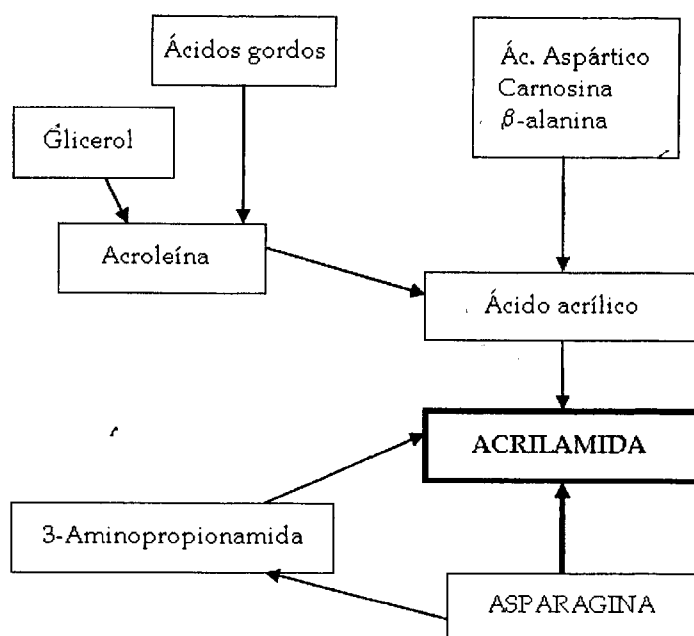


Figura 4.4- Mecanismos alternativos de formação da acrilamida. (Adaptado de: Eriksson, 2005)

4.1.2.1- A partir da acroleína

A acroleína $[CH_2=CH-CH=O]$ é um aldeído com características estruturais semelhantes à acrilamida $[CH_2=CH-C(O)-NH_2]$. Pode formar-se a partir da decomposição térmica dos triglicéridos presentes no óleo de fritar, da degradação de aminoácidos e proteínas, da degradação de hidratos de carbono e como produto da reacção de Maillard entre aminoácidos ou proteínas e hidratos de carbono (Lingnert *et. al.*, 2002; Mottram *et. al.*, 2002).

Em certas condições, a acroleína juntamente com a asparagina pode levar à

formação de acrilamida. Neste caso, é a acroleína e não os açúcares redutores que fornecem o grupo carbonilo para a reacção de Maillard. A acroleína, ou um dos seus derivados, pode reagir com o amoníaco libertado a partir da degradação da asparagina originando acrilamida (Figura 4.5) (Yasuhara *et. al.*, 2003).

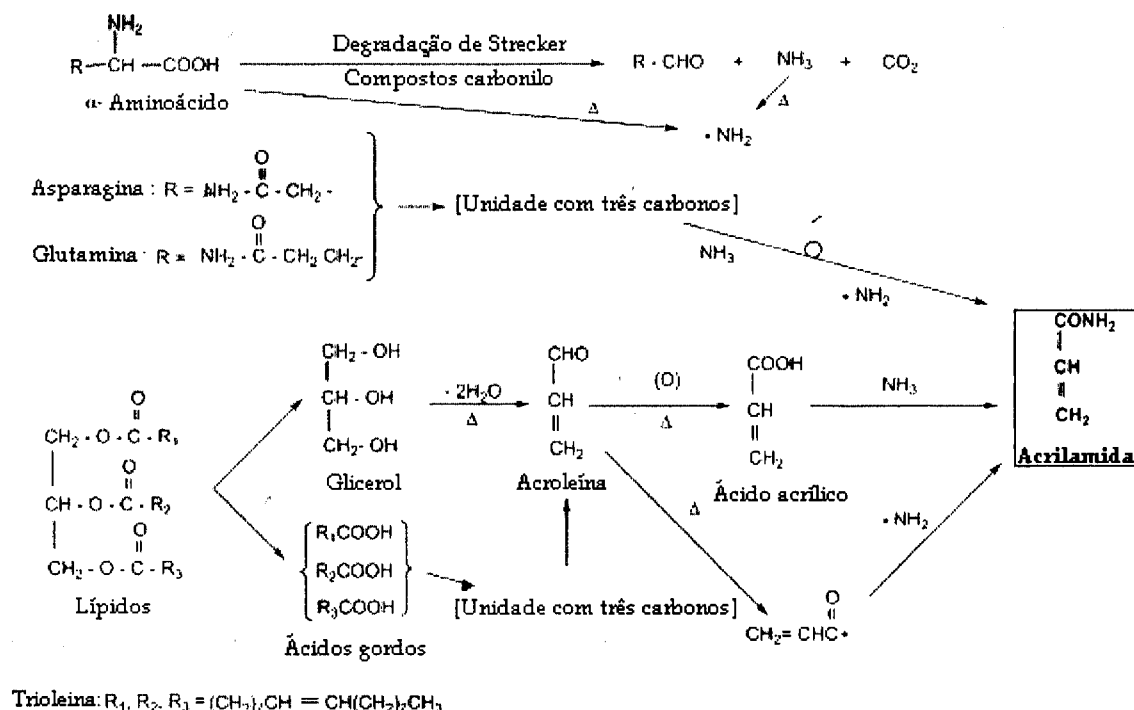


Figura 4.5- Mecanismo de formação da acrilamida a partir de aminoácidos e lipídios via acroleína
(Adaptado de: Yasuhara *et. al.*, 2003)

Este mecanismo foi testado por Yasuhara *et. al.* (2003) que procederam ao aquecimento de uma mistura de amoníaco gasoso e acroleína a diferentes temperaturas, tendo verificado a formação de uma grande quantidade de acrilamida. Também aqueceram isoladamente diferentes tipos de óleo e aminoácidos e demonstraram que se libertam grandes quantidades de acroleína e amoníaco, respectivamente. A partir dos resultados destas experiências, concluíram que se pode formar acrilamida a partir da reacção do amoníaco libertado pelos aminoácidos com o ácido acrílico que se forma a partir da acroleína que, por sua vez, se forma durante o aquecimentos dos óleos

(Lingnert *et. al.*, 2002; Yasuhara *et. al.*, 2003).

Algumas experiências efectuadas por outros autores não confirmaram, contudo, a hipótese colocada. Becalski *et. al.* (2003) fritaram batatas em azeite, em óleos de milho e girassol e num óleo parafínico livre de triglicéridos e logo, livre de acroleína, e encontraram quantidades semelhantes de acrilamida em todos eles. Adicionaram carbonato de amónia, que se decompõe libertando amoníaco durante a fritura, mas não registaram alterações na concentração de acrilamida obtida. Concluíram que a acrilamida não se forma a partir de precursores presentes no óleo, ou seja, a partir da acroleína. Os seus resultados foram confirmados por Mestdagh *et. al.* (2005 e 2006).

As experiências realizadas por Becalski *et. al.* (2003) e por Mestdagh *et. al.* (2005 e 2007), também foram utilizadas para verificar a influência que o tipo de óleo usado na fritura pode ter na formação de acrilamida. Anteriormente, Gertz e Klostermann (2002) tinham concluído que se forma mais acrilamida na fritura em óleo de palma do que em qualquer outro óleo. Becalski *et. al.* (2003) encontraram mais acrilamida nas batatas fritas em azeite do que naquelas fritas em óleo de milho. Estes autores consideraram que as diferenças entre os óleos não estavam relacionadas com a presença de acroleína como precursor mas sim com um efeito cinético, ou seja, a formação de acrilamida em óleo de palma e azeite era mais rápida. Por outro lado, Mestdagh *et. al.* (2005 e 2007) e, anteriormente Matthäus *et. al.* (2004) e Williams (2005), não encontraram qualquer influência do tipo de óleo na formação de acrilamida em batatas. Obviamente ainda há muitos aspectos a clarificar no que respeita à influência do óleo usado nas frituras na formação de acrilamida.

4.1.2.2- A partir do ácido acrílico

O ácido acrílico pode formar-se a partir da reacção do mesmo número de moles de glicose e ácido aspártico a temperaturas superiores a 120 °C. O rendimento da reacção apresentou-se comparável ao da formação da acrilamida a partir de uma reacção análoga com asparagina e glicose, indicando uma via comum para os compostos vinílicos a partir dos aminoácidos correspondentes e açúcares (Stadler *et. al.*,

2004). Adicionalmente, o ácido aspártico pode ser convertido a ácido acrílico sem o envolvimento de açúcares ou de uma fonte de carbonilo através de um mecanismo concertado de descarboxilação/desaminação. Alguns estudos mostraram que outros aminoácidos, tais como a *L*-alanina e a *L*-arginina também são capazes de originar ácido acrílico a temperaturas acima de 180 °C, com rendimentos dentro da mesma ordem de grandeza observada para o ácido aspártico (CAST, 2006).

Outra possível via de formação de ácido acrílico tem como precursor a carnosina, dipéptido composto por *L*-histidina e β -alanina, presente na carne. A β -alanina, libertada por degradação da carnosina, pode hidrolisar formando ácido acrílico e eventualmente acrilamida ou os seus derivados (Figura 4.6) (Yaylayan *et. al.*, 2004).

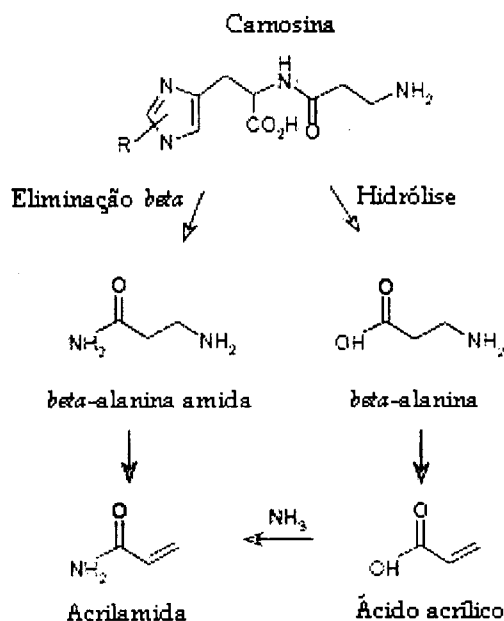


Figura 4.6- Mecanismo de formação da acrilamida a partir da carnosina (Adaptado de: JIFSAN, 2004).

Disponível em: http://www.jifsan.umd.edu/presentations/acry2004/acry_2004_wg1_report.pdf,

consultado em 2006/04/16)

Yaylayan *et. al.* (2004) também descobriram que a creatina, um componente da carne, pode formar N-metilacrilamida ao ser cozinhada, mas a importância desta formação não é conhecida. A quantidade de acrilamida encontrada pelos autores foi muito baixa.

4.1.2.3- A partir da 3-aminopropionamida

Outra via de formação da acrilamida que pode ocorrer em batatas tem o seu início na descarboxilação enzimática da asparagina que leva à formação de 3-aminopropionamida (3-APA) (Granvogl *et. al.*, 2004; Bagdonaite *et. al.*, 2006). Durante a fritura, a 3-aminopropionamida pode originar acrilamida por uma reacção de desaminação (Figura 4.7).

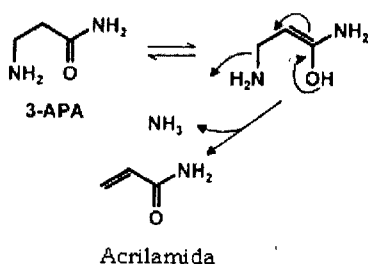


Figura 4.7- Mecanismo de formação da acrilamida a partir da 3-aminopropionamida (3-APA). (Adaptado de: Granvogl *et. al.*, 2004)

O rendimento da reacção de desaminação da 3-APA é alto (cerca de 60%), quando realizado em laboratório, mas apenas foram detectados vestígios do precursor 3-aminopropionamida em batatas, limitando a importância deste mecanismo (Granvogl *et. al.*, 2004).

4.1.2.4- A partir da despolimerização da poliacrilamida

Ahn e Castle (2003) investigaram a possibilidade da presença de acrilamida em alimentos resultar da despolimerização térmica da poliacrilamida usada em processos agrícolas. Concluíram que mesmo que a poliacrilamida contaminasse as culturas e os alimentos delas derivados (o que por si só é improvável), não há evidências de que o processo de despolimerização ocorra em quantidades significativas durante o aquecimento dos alimentos para libertar acrilamida.

4.2- Factores que afectam a formação da acrilamida em alimentos

Os factores que afectam a velocidade de formação da acrilamida a partir da asparagina e de açúcares redutores incluem a concentração dos reagentes e a razão entre eles, assim como a temperatura, o pH e o conteúdo em água. Outros compostos como o glioxal, a 2-dioxiglicose, o glicerol, o octanal, a 2-octanona, a ribose e os gliceraldeídos em geral também podem levar à formação de acrilamida uma vez que podem reagir com a asparagina (Stadler *et. al.*, 2002; Zyzak *et. al.*, 2003).

4.2.1- A presença dos precursores: asparagina e açúcares redutores

A glicose e a frutose são os açúcares redutores presentes em maior quantidade nos vegetais, incluindo nas batatas, e logo têm uma grande influência na formação da acrilamida. As batatas com uma concentração mais alta de açúcares redutores apresentam, geralmente, as mais altas concentrações de acrilamida (Amrein *et. al.*, 2003). Biedermann *et. al.* (2002c) trabalharam com batatas ainda verdes, mas com evidências de danos provocados pelo sol, e verificaram que as mesmas apresentavam uma quantidade muito mais elevada de açúcares redutores, e davam origem a uma concentração de acrilamida 3 a 8 vezes mais elevada do que nas batatas saudáveis.

Um estudo feito em 74 amostras de batatas de 17 colheitas diferentes demonstrou que os teores de acrilamida nas batatas fritas estão correlacionados principalmente com os teores de frutose na matéria-prima (Amrein *et. al.*, 2003). Estudos laboratoriais indicaram que a frutose é mais eficiente na formação da acrilamida do que a glicose ou a galactose (Biedermann e Grob, 2003). Uma explicação possível é o facto de o ponto de fusão da frutose ser menor sob certas condições de baixa humidade, o que leva a um incremento da mobilidade, e logo da reactividade da molécula. Apesar de não ser um açúcar redutor, a sacarose é um precursor possível, considerando a sua hidrólise nos monossacarídeos individuais após tratamento térmico (Becalski *et. al.*, 2004).

O teor de açúcares redutores em batatas cruas e, consequentemente, o teor de acrilamida nas batatas fritas, é fortemente influenciado pelas condições de

armazenamento, em especial pela temperatura. Verificou-se que a concentração de glicose e frutose nas batatas cruas aumentam à medida que se diminui a temperatura de armazenamento de 20 para 2 °C (Amrein *et. al.*, 2003 e 2004a; Grob *et. al.*, 2003). Noti *et. al.* (2003) demonstraram que batatas guardadas a 4 °C e fritas posteriormente apresentam uma cor mais escura e uma maior concentração de acrilamida do que batatas armazenadas a 20 °C. No entanto, a 20 °C, as batatas degradam-se muito mais rapidamente, ficando impróprias para consumo em algumas semanas. Estes autores sugerem que se armazenem as batatas a uma temperatura de 10 °C, para compensar ambos os efeitos. A concentração da asparagina e de outros aminoácidos não parecem ser afectadas pela temperatura de armazenamento (Chuda *et. al.*, 2003; Amrein *et. al.*, 2004a).

Dependendo da composição da matéria-prima no que respeita às concentrações de asparagina livre e açúcares redutores, o factor limitante da formação da acrilamida irá ser ou o aminoácido ou o açúcar redutor. Por exemplo, em simulações com pão, a asparagina está presente em concentrações muito inferiores à concentração dos açúcares redutores. Biedermann e Grob (2003) e Surdyk *et. al.* (2004) mostraram que ao aumentar a quantidade de asparagina na massa antes de ir ao forno se verifica um acréscimo acentuado dos níveis de acrilamida na crosta do pão, enquanto a adição de frutose não surte qualquer efeito. Concluíram que neste caso o factor limitante é a asparagina.

Fredriksson *et. al.* (2004) verificaram que durante a fermentação biológica (uso de leveduras) do pão, durante cerca de 6 horas, há uma redução de cerca de 90% da asparagina presente na massa uma vez que este aminoácido constitui, possivelmente, uma fonte importante de azoto para as leveduras. A massa obtida deu origem a pão com uma baixa concentração de acrilamida. O prolongamento da fermentação do pão pode, assim, ser uma excelente forma para reduzir a quantidade de acrilamida formada.

Em contraste, nas batatas, onde a concentração da asparagina é muito alta (cerca de 35% da totalidade de aminoácidos livres) em qualquer que seja a variedade em questão, o aumento de açúcares redutores durante o armazenamento dá origem à formação de uma maior quantidade de acrilamida durante a fritura (Becalski *et. al.*, 2004). O factor limitante nas batatas, neste caso, é a concentração dos açúcares

redutores. Zyzak *et. al.* (2003) verificaram também que a redução do conteúdo de asparagina nas batatas (por digestão enzimática daquele aminoácido) reduz a formação da acrilamida.

A reacção entre a asparagina e um açúcar redutor não é, todavia, muito eficiente. Apenas uma pequena percentagem dos dois reagentes é que reagem para formar acrilamida. O rendimento da reacção numa base molar é de cerca de 0,1-0,3% do conteúdo inicial de asparagina, obtido repetidamente em estudos modelo, em condições optimizadas para a formação de acrilamida (Mottram *et. al.*, 2002; Stadler *et. al.*, 2002; Becalski *et. al.*, 2003; Yasuhara *et. al.*, 2003). Surdyk *et. al.* (2004) divulgaram rendimentos inferiores a 0,3% na crosta do pão após adição à massa de diferentes quantidades de asparagina. Os rendimentos noutro estudo modelo sobre a formação da acrilamida em batatas, farinha de trigo e amido de milho foram, ligeiramente mais altas, mas geralmente inferiores a 1% (Biedermann e Grob, 2003).

A formação da acrilamida é afectada pela concentração dos precursores, mas a presença de inibidores, que competem com aqueles na reacção de Maillard, assume também grande importância. Bråthen *et. al.* (2005) e Kim *et. al.* (2005) verificaram que a adição de glicina ou de glutamina aos alimentos inibem a formação de acrilamida em mais de 90%. Provavelmente estes aminoácidos competem com a asparagina durante a condensação com os açúcares redutores ou reagem com a ligação dupla da acrilamida formada. Outros aminoácidos com um efeito semelhante são a cisteína (Lindsay e Jang, 2004) e a lisina (Kim *et. al.*, 2005). A adição de glucanato de sódio também permite a redução de acrilamida uma vez que compete com os açúcares redutores durante a reacção de Maillard (Grune e Talarico, 2006).

4.2.2- Efeito da adição de agentes levedantes

Biedermann e Grob (2003) verificaram no seu trabalho, que o hidrogenocarbonato de amónia (NH_4HCO_3) usado com agente levedante em certos produtos de padaria, como o pão de gengibre, pode aumentar o rendimento da reacção para mais de 5%.

Amrein *et. al.* (2004b) testaram, por sua vez, o efeito que diferentes agentes levedantes químicos produzem na formação de acrilamida em pão de gengibre. Verificaram que a quantidade ideal de NH_4HCO_3 era cerca de 0,8 g por cada 100 g da massa para que houvesse um compromisso satisfatório entre a quantidade de acrilamida e as características organolépticas do produto final. Para valores inferiores, a quantidade de acrilamida era menor, mas a cor, a textura, o aroma e o paladar do produto final não eram satisfatórios. No caso de quantidades superiores, o produto final apresentava uma cor muito escura e um pH muito alcalino para além de uma grande concentração de acrilamida. Os resultados obtidos por estes autores estão apresentados na Figura 4.8. A linha contínua na figura representa a percentagem das características organolépticas desejadas no pão de gengibre: cor, paladar, aroma e textura.

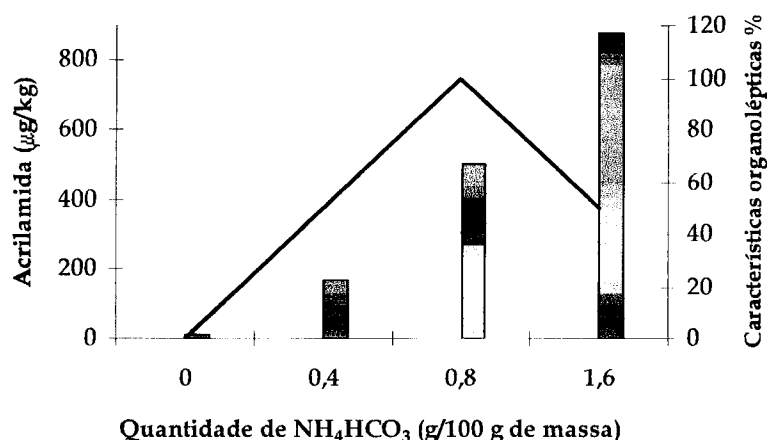


Figura 4.8- Quantidade de acrilamida formada em pão de gengibre, produzido com diferentes quantidades de hidrogenocarbonato de amónia. Relação com a percentagem de características organolépticas apresentadas pelo produto final. (Adaptado de Amrein *et. al.*, 2004b)

A concentração elevada de acrilamida encontrada sugere que este agente levedante pode fornecer uma fonte extra de azoto devido à libertação de NH_3 durante o processo de fermentação. Todavia, os autores testaram esta hipótese ao adicionar o composto marcado com isótopos de azoto (^{15}N) e a acrilamida detectada não apresentou sinais dos átomos marcados, não se provando assim a hipótese formulada. Os autores

concluíram que o efeito é provavelmente indirecto, ao promover a formação de compostos com grupos carbonilo mais reactivos originados a partir da reacção do amoníaco com os açúcares redutores. Outra possibilidade é a alteração do pH provocada pela libertação do amoníaco, interferindo assim na reacção de Maillard (Taeymans *et. al.*, 2004).

Os mesmos autores também testaram a influência de um agente levedante alternativo, o bicarbonato de sódio (NaHCO_3). Verificaram que este composto origina produtos com uma quantidade bastante menor de acrilamida, mas revelou-se necessária a adição de 1,67 g de agente químico por cada 100 g de massa para se obter a cor e textura ideais. Adicionalmente, provocou um aumento substancial do pH para valores situados entre 8,2-8,8 quando comparado com o produto original (6,9), com consequências nefastas a nível organoléptico (Figura 4.9). Este factor pode ser compensado pela adição de ácido cítrico ou tartárico a qual, ao diminuir o pH, poderá levar a reduções ainda maiores da acrilamida.

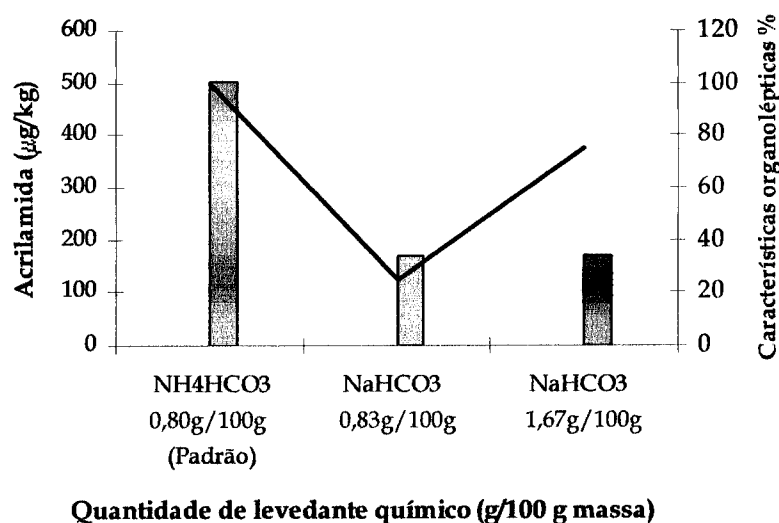


Figura 4.9- Quantidade de acrilamida formada em pão de gengibre produzido com diferentes quantidades de agentes levedantes e relação com as características organolépticas do produto final.

(Adaptado de: Amrein *et. al.*, 2004b)

4.2.3- O efeito da temperatura e do tempo total do processamento

A temperatura a que os alimentos são cozinhados está directamente relacionada com a concentração de acrilamida. Em geral, a formação da substância é proporcional ao aumento da temperatura desde os 120 °C até aos 170 °C (Mottram *et. al.*, 2002; Stadler *et. al.*, 2002; Tareke *et. al.*, 2002).

Mottram *et. al.* (2002) verificaram que ao aquecer uma mistura equimolar de asparagina e glicose em solução tampão de fosfato, a reacção de formação da acrilamida era favorecida por temperaturas superiores a 100 °C e que não eram necessárias temperaturas muito elevadas (acima de 180 °C) para que a formação da substância ocorresse (Figura 4.10).

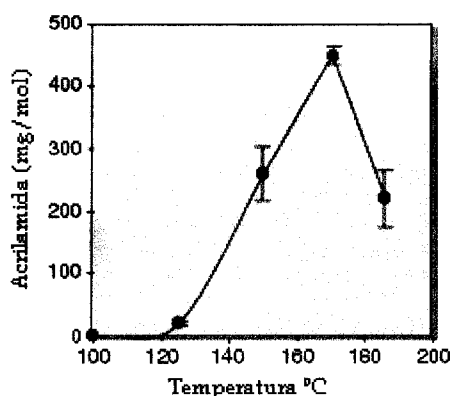


Figura 4.10-- Influência da temperatura na formação de acrilamida em mg/ mol de asparagina. Sistema formado por uma solução com 0,1 mmol de asparagina e 0,1 mmol de glicose numa solução tampão fosfato 0,5 M a pH 5,5 e aquecida durante 20 minutos num tubo fechado. (Adaptado de: Mottram *et. al.*, 2002).

Gertz e Klostermann (2002) efectuaram experiências semelhantes em matrizes reais. Fritaram batatas a diferentes temperaturas e demonstraram que se forma uma maior quantidade de acrilamida à medida que a temperatura aumenta até cerca de 185 °C. Também testaram diferentes tempos de fritura e verificaram que a quantidade de substância aumenta com a duração do processamento (Figura 4.11).

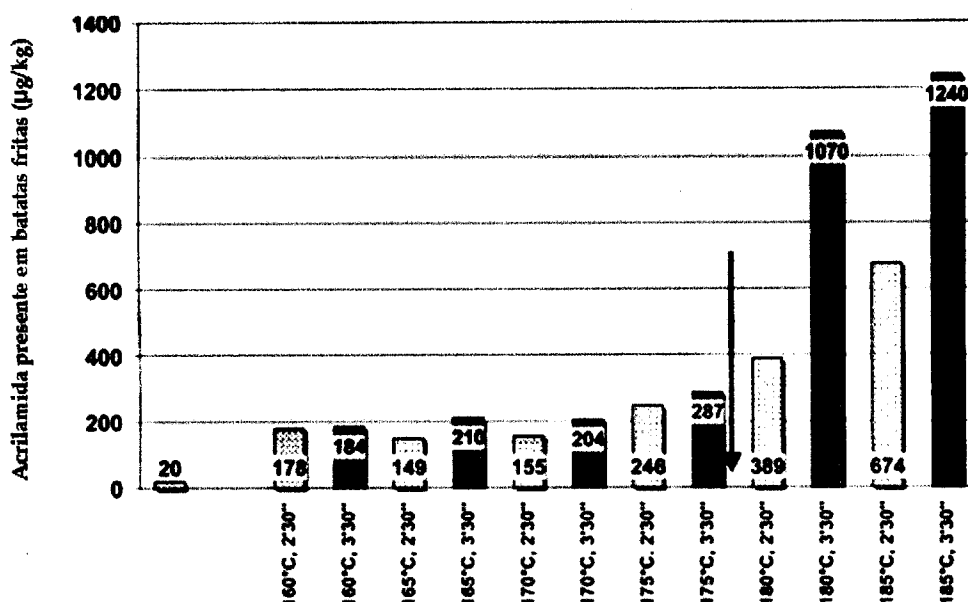


Figura 4.11- Relação entre a quantidade de acrilamida formada em batatas fritas tipo francês e o aumento da temperatura e tempo de fritura. A seta vertical indica as condições normais de fritura das batatas em restaurantes: 175 °C durante 3'30''. (Adaptado de: Gertz e Klostermann, 2002).

Idênticas conclusões foram tiradas por Grob *et. al.* (2003), que verificaram um aumento dos teores de acrilamida em batatas fritas à medida que aumentavam a temperatura, para iguais períodos de tempo de fritura (Figura 4.12).

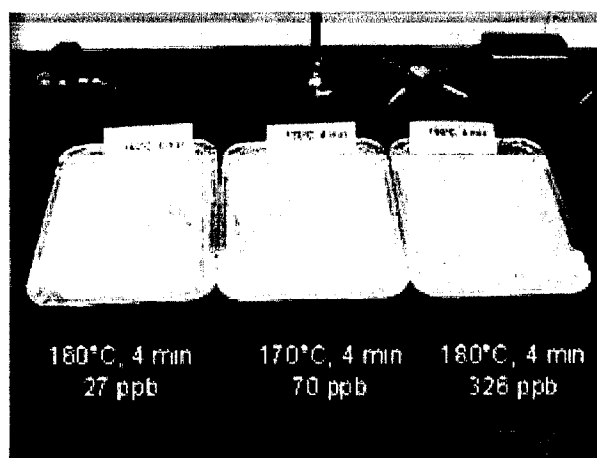


Figura 4.12- Dependência da formação de acrilamida com a temperatura de fritura. (Adaptado de: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/acryjack/sld024.htm>, consultado em 2006/04/16)

Experiências realizadas com pão, revelaram que a crosta apresenta uma maior quantidade de acrilamida que o miolo. Estes resultados são previsíveis, uma vez que, tal como foi dito anteriormente (Capítulo 3), durante o processo de cozedura no forno, a temperatura na superfície da massa é bastante elevada e a humidade é baixa o que favorece a ocorrência da reacção de Maillard. Consequentemente, a crosta apresenta uma maior quantidade de acrilamida do que o miolo (Surdyk *et. al.*, 2004). As Figura 4.13 e Figura 4.14 revelam que a maior quantidade de acrilamida se forma na crosta, acima de 200 °C e com tempos de processamento mais longos. Com o aumento da temperatura aumenta a quantidade de crosta e a sua cor torna-se cada vez mais escura. No caso do miolo, a quantidade é muito pequena quando comparada com a crosta uma vez que esta, à medida que se forma, actua como barreira protectora (Surdyk *et. al.*, 2004).

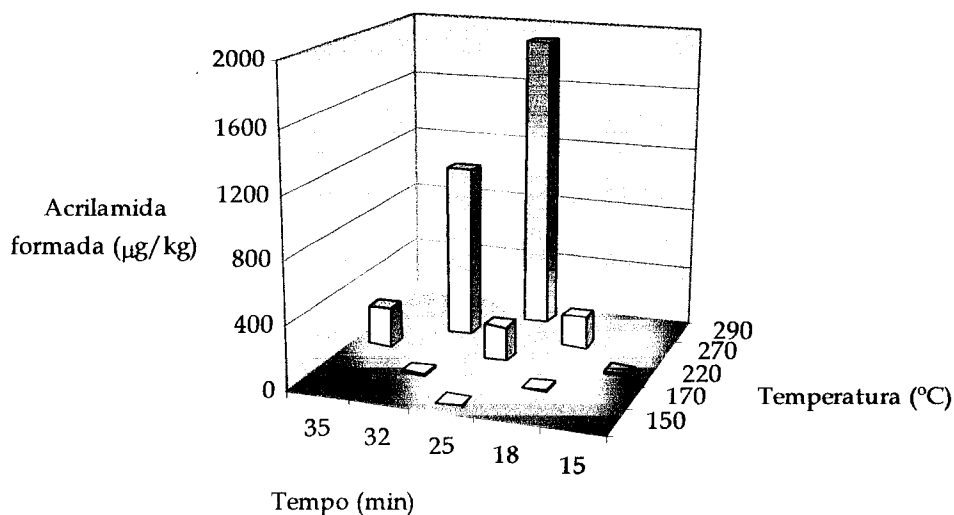


Figura 4.13- Efeito do tempo e da temperatura do forno na concentração de acrilamida na crosta do pão
(Adaptado de Surdyk *et. al.*, 2004)

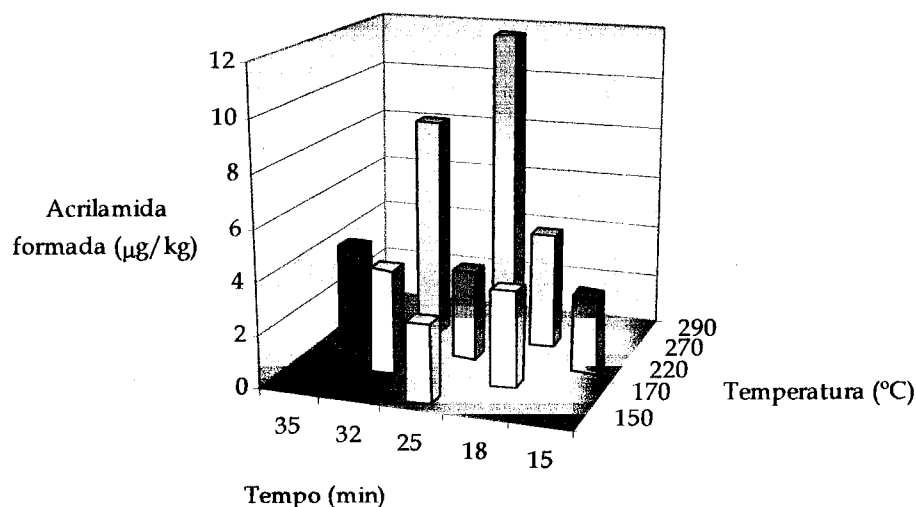


Figura 4.14- Efeito do tempo e da temperatura do forno na concentração de acrilamida no miolo do pão. (Adaptado de: Surdyk *et. al.*, 2004)

, Em alguns produtos como o café torrado, verificou-se, no entanto, que o aquecimento a altas temperaturas ou demasiado prolongado reduz a quantidade de acrilamida formada na fase inicial do processo de torra (Bagdonaite e Murkovic, 2004). A análise da Figura 4.15 revela que é nos primeiros cinco minutos de torra que se forma uma grande parte da acrilamida. À medida que se prolonga o processo ou se aumenta a temperatura a quantidade de acrilamida diminui.

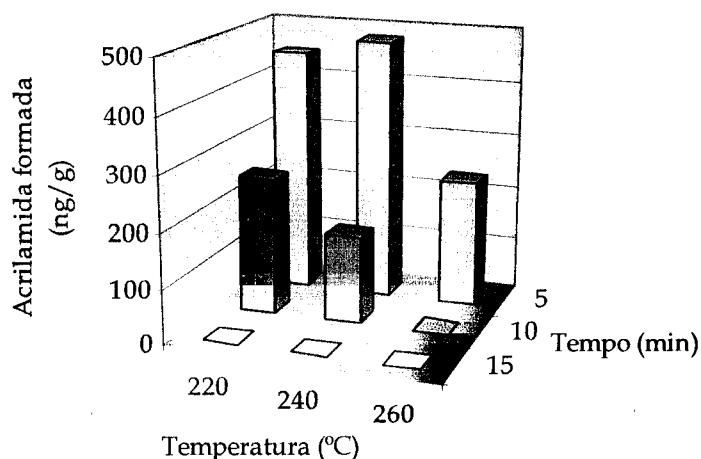


Figura 4.15- Concentração de acrilamida em grãos de café Robusta aquecidos num forno entre 220 e 260 °C durante 5 a 15 minutos. (Adaptado de: Bagdonaite e Murkovic, 2004)

Andrzejewski *et. al.* (2004) verificaram, em experiências semelhantes, que no café se formam grandes quantidades de acrilamida nas fases iniciais do processo de torra atingindo níveis máximos de 2000 µg/kg. À medida que o processo evolui, a formação da acrilamida é ultrapassada por uma reacção de eliminação desconhecida, resultando na presença de uma quantidade média de acrilamida residual de cerca de 250 µg/kg no final do processo.

Alguns estudos cinéticos feitos com acrilamida marcada isotopicamente mostraram que cerca de 95% é degradada durante a torra do café, o que indica que a partir de uma determinada temperatura passa a haver uma maior velocidade de eliminação em relação à velocidade de formação (Stadler e Scholz, 2004).

Esta diminuição dos teores de acrilamida que se verifica a temperaturas acima de 190 °C sugere que a acrilamida ou reage com outros compostos, ou volatiliza ou polimeriza, o que faz diminuir os seus teores nos produtos finais (Amrein *et. al.*, 2003; Biedermann e Grob, 2003; Claeys *et. al.*, 2005a). Eriksson *et. al.* (2006) verificaram que ao aquecer alimentos a 180 °C na frigideira ou no forno, nas condições normais de preparação caseira, cerca de 0,15 a 3,3% da acrilamida evapora e pode encontrar-se no ar.

Outro parâmetro a ter em conta durante o aquecimento dos alimentos é a extensão do acastanhamento. Krokida *et. al.* (2001), por exemplo, realizaram um estudo sobre o impacto que o processo de fritura tem sobre a coloração dos alimentos. Concluíram que os parâmetros mais importantes são a temperatura do óleo e a espessura dos alimentos. A coloração torna-se mais intensa à medida que a temperatura do óleo aumenta ou que a espessura e o tamanho das porções dos alimentos diminuem.

Tal como foi referido anteriormente, a concentração da acrilamida aumenta com a temperatura e com o tempo de processamento, mas a extensão de acastanhamento não é necessariamente um indicativo da quantidade de substância que se irá formar. Neste sentido, é interessante referir uma experiência de Taubert *et. al.* (2004) que fritaram amostras de batatas raladas, cortadas em fatias de 3 mm e em fatias de 15 mm, tendo verificado que as amostras que apresentavam uma maior quantidade de acrilamida eram as batatas raladas seguidas das fatias de 3 mm e, com menor

quantidade, as fatias de 15 mm. Consideraram que no caso das porções de menor volume os precursores estão mais acessíveis e logo reagem mais extensivamente. No caso das fatias mais espessas, ocorre a formação de uma superfície estaladiça que funciona como barreira protectora dos precursores presentes no interior. À medida que aumenta a temperatura e, consequentemente, a extensão de acastanhamento, as porções mais finas e as batatas raladas apresentam uma maior concentração de acrilamida. Mas no caso das fatias de 15 mm a concentração da acrilamida praticamente não sofreu alterações apesar de o acastanhamento ter aumentado. Possivelmente ocorrem reacções de degradação da acrilamida na superfície das batatas que se sobrepõem às reacções de formação da substância. Este facto confirma a observação de que a formação da acrilamida é um fenómeno superficial.

Fiselier e Grob (2005) demonstraram igualmente que, a fritura excessiva (mais do que 4,5 min) ou a temperatura demasiado alta (igual ou superior a 200 °C) resulta numa coloração bastante escura e numa quantidade bastante elevada de acrilamida no caso das batatas mais ricas nestes precursores (Figura 4.16).

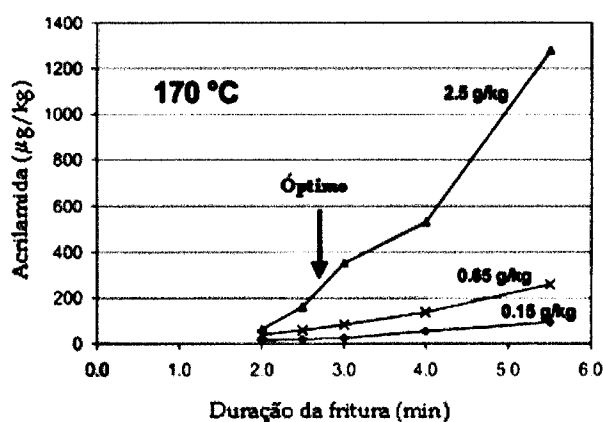


Figura 4.16- Relação entre a quantidade de acrilamida e o tempo total de fritura em batatas que apresentam concentrações de açúcares redutores entre os 0,15 g/kg e 2,5 g/kg. (Adaptado de: Fiselier e Grob, 2005)

A análise da figura permite concluir que as batatas ricas em açúcares redutores e submetidas a um tempo de fritura inferior a 3 min apresentam uma coloração mais escura. A utilização destas variedades (ricas em açúcares redutores) é adoptada pelos

produtores de batatas fritas para obter o que vulgarmente denominam “batatas tipo caseiro”, habitualmente de cor mais escura do que as restantes (Biedermann-Brem *et. al.*, 2003; Stadler e Scholz, 2004; Fiselier e Grob, 2005).

Em estudo realizados com pão, Surdyk *et. al.* (2004) concluíram que a adição de frutose e de asparagina à massa aumenta a quantidade de acrilamida formada mas não leva a um aumento da intensidade da coloração da crosta.

4.2.4- Efeito do pH

O efeito do pH na reacção de formação da acrilamida foi investigado indirectamente ao considerar o efeito da adição de ácido cítrico a alimentos. Jung *et. al.* (2003) descobriram que o aumento da concentração de ácido cítrico em snacks à base de milho, fritos ou assados, e a incorporação de uma pré-lavagem ácida na preparação das batatas antes de as submeter à fritura, diminuiu a quantidade de acrilamida que se formou. Testaram estas observações ao aquecer misturas equimolares de asparagina e glicose dissolvidas em soluções tampão com diferentes pH, a 150 °C durante 30 minutos. Os seus resultados estão apresentados na Figura 4.17.

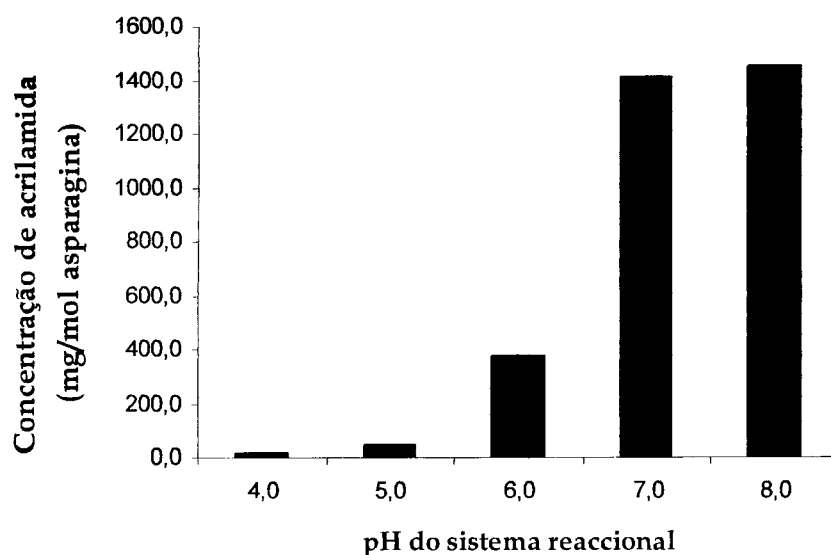


Figura 4.17- Dependência do pH na formação da acrilamida a partir de uma solução 0,5 mmol de asparagina e 0,5 mmol de glicose em 1 mL de solução tampão de fosfato com diferentes pH aquecidos a 150 °C durante 30 minutos (Adaptado de: Jung *et. al.*, 2003).

Como se pode verificar pela análise da figura anterior, a formação da acrilamida atinge o seu máximo a pH 7-8, o que leva a concluir que a acidificação das soluções permite reduzir a quantidade de substância.

O efeito do pH na reacção de Maillard e, consequentemente, na formação da acrilamida, ainda não está bem explicado, mas está relacionado com a extensão de protonação dos aminoácidos que intervêm na reacção (Lingnert *et. al.*, 2002; Rydberg *et. al.*, 2003).

A extensão de protonação da função aminada dos aminoácidos a um dado pH é determinada pelo valor do pK_a do grupo amina, sendo a maioria destes valores situados no intervalo entre 9,3 e 9,8, a 25 °C. O grupo R-amina da asparagina apresenta um pK_a excepcionalmente baixo (8,9 a 25 °C) e, a pH 7-8, encontra-se protonado em menor grau do que outros aminoácidos. Por esta razão, a este pH a asparagina é mais propensa do que outros aminoácidos a reagir com electrófilos, por exemplo com grupos aldeídos dos hidratos de carbono, resultando na formação de bases de Schiff e consequentemente na formação de acrilamida (Rydberg *et. al.*, 2003).

4.2.5- Efeito da presença de água

A reacção de Maillard e, consequentemente, a formação de acrilamida, parece ser inibida pela presença de quantidades elevadas de água. A comprová-lo está o facto de nunca ter sido detectada a presença da substância em alimentos cozidos (Tareke *et. al.*, 2002). Aparentemente, este efeito inibidor parece estar relacionado com o facto de a água ser um dos produtos dos passos iniciais da reacção de Maillard e a sua presença no meio tornar a reacção mais lenta (Lingnert *et. al.*, 2002). Para além disso, na presença de grandes quantidades de água os reagentes encontram-se diluídos, diminuindo a probabilidade da reacção ocorrer.

Mottram *et. al.* (2002) demonstraram, contudo, que a ausência total da água tem igualmente um efeito inibidor na formação da acrilamida. Estes autores fizeram reagir uma mistura de asparagina e glicose a 185 °C sem adicionar qualquer solução aquosa tendo verificado que a formação da substância era substancialmente inferior à ocorrida

na presença de uma pequena quantidade de água.

Segundo os autores, a presença de quantidade residuais de água é importante para permitir a mobilidade dos reagentes, o que também foi confirmado por Lingnert *et. al.* (2002).

4.2.6- Outros factores

Os alimentos ricos em proteínas como a carne e o peixe não apresentam quantidades significativas de acrilamida como Tareke *et. al.* (2002) verificaram ao analisar hambúrgueres grelhados, misturas fritas de batata com bacalhau e carne de porco assada.

Para verificar a possibilidade de reacções de competição ou de degradação que envolvem proteínas na formação de acrilamida em carne e peixe, Rydberg *et. al.* (2003) misturaram batatas raladas com diferentes quantidades de bacalhau (0-100%) e formaram pequenos pastéis que foram cozinhados numa fritadeira ou assados num forno. Estas experiências demonstraram que a diminuição da acrilamida (cerca de 70% no caso de quantidades iguais de batatas e de bacalhau) foi consideravelmente mais alta do que a esperada, face a um efeito puramente aditivo. Isto pode reflectir uma acção protectora das proteínas, por exemplo por captura da acrilamida formada, via reacção com um grupo nucleófilo ($-SH$, $-NH_2$) presente nas cadeias laterais dos aminoácidos (Rydberg *et. al.*, 2003).

Idênticas conclusões foram retiradas por Vatter e Shetty (2003) que analisaram bolinhos de batata cobertos com farinha de grão-de-bico, que apresentavam quantidades bastante baixas de acrilamida. Neste caso, as proteínas do grão parecem exercer um efeito protector, uma vez que muitas delas são termicamente estáveis, não se degradando com o aumento da temperatura. Poderão funcionar como uma barreira térmica, uma vez que a formação de acrilamida ocorre essencialmente na superfície dos alimentos (Vatter e Shetty, 2003).

Adicionalmente, existem outros factores que influenciam a formação da acrilamida, como a termodinâmica da fritura e da cozedura em forno, a cinética da

formação e da eliminação (Claeys *et. al.*, 2005b e 2005c; Gökmen e Şenyuva, 2006b; Knol *et. al.*, 2005), para além de muito outros ainda não identificados.

No café, por exemplo, a acrilamida não é estável nos produtos finais empacotados, tendo-se verificado que a sua concentração diminui com o tempo de armazenamento à temperatura ambiente, com perdas até 60% em amostras reanalisadas 6 meses após da primeira análise (Andrzejewski *et. al.*, 2004).

4.3- Estratégias para reduzir a formação de acrilamida em alimentos

Tal como foi referido anteriormente, os factores que mais influenciam a formação da acrilamida nos alimentos, são o conteúdo de asparagina e de açúcares redutores na matéria-prima, a presença de adjuvantes ou aditivos que contenham ou libertem amoníaco, a temperatura, a duração total do aquecimento, a quantidade de água, o pH, a termodinâmica da fritura e da cozedura em forno, a cinética da formação e da eliminação da substância, a presença de proteínas, etc.

Como são muitos os factores e atendendo a que os alimentos são muito diferentes entre si, é extremamente improvável que se consiga desenvolver um método universal para limitar a acrilamida em todos eles. No entanto, têm sido apresentadas estratégias aplicáveis a grupos de alimentos individuais como batatas, cereais, cacau e café que serão discutidas nos próximos pontos.

1) Acções de redução da acrilamida em batatas

O uso de matérias-primas com baixo teor de açúcares redutores e/ou asparagina constitui, naturalmente, um dos processos mais eficazes para a obtenção de produtos finais com baixos teores de acrilamida. Biedermann *et. al.* (2002b e 2002c) sugerem a escolha de variedades de batata que apresentem uma menor concentração de açúcares redutores e asparagina, acompanhada de um armazenamento apropriado. Não se trata, todavia, de uma tarefa fácil, uma vez que continua a ser largamente desconhecido o

impacto de muitas das condições agrícolas, como o uso de fertilizantes, a altura da colheita, etc. na quantidade daqueles compostos (Amrein *et. al.*, 2003; Williams, 2005).

Têm sido apresentadas numerosas propostas que visam reduzir a formação de acrilamida em batatas fritas durante o processamento. Um ponto-chave tem sido sem dúvida a adesão dos produtores a processos de fritura com uma temperatura máxima de 170 a 175 °C e a obtenção de uma cor final das batatas dourada em vez de castanha. Outros parâmetros a ter em conta são a espessura, o tamanho das porções e a quantidade de batatas fritas em simultâneo. Outros autores sugerem a fritura a temperaturas ainda mais baixas na ordem dos 120 °C (Grune e Talarico, 2006).

Todavia, deve ter-se em conta, que não é a temperatura absoluta, mas o conjunto de todo o tratamento térmico que afecta a formação da acrilamida. Se ao fritar a temperaturas mais baixas houver a necessidade de aumentar o tempo total da fritura de forma a obter o produto com a qualidade desejada, o impacto total na formação da acrilamida pode ser muito limitado ou até invertido. Fritar por pouco tempo mas a temperaturas mais altas pode ser uma opção melhor se isto ajudar a reduzir o efeito global do tratamento térmico. Mudanças no processo de fritura também têm que ser avaliadas tendo em conta outros parâmetros, por exemplo, uma maior absorção de gordura quando a temperatura do óleo é mais baixa.

Há alguns trabalhos que demonstraram que o tipo de óleo pode influenciar a velocidade de formação da acrilamida. Este efeito não parece estar associado à presença de precursores como a acroleína ou outros produtos degradativos, mas a efeitos físicos, como a eficácia da transferência de calor, o que acelera o processo de fritura.

Outra possibilidade é o branqueamento das batatas em água quente antes da fritura. Esta técnica é aplicada em batatas cruas mergulhando-as em água a 70 °C durante cerca de 45 min. Consequentemente, os precursores da acrilamida são dissolvidos na água levando à obtenção de um produto final com baixos teores de acrilamida (Jung *et. al.*, 2003; Taubert *et. al.*, 2004).

As batatas cortadas e mergulhadas em soluções de ácido cítrico durante uma hora apresentam uma diminuição significativa (cerca de 70%) da acrilamida após a fritura. A diminuição do pH inibe a formação da base de Schiff ao favorecer a

protonação da função aminada da asparagina, levando a uma redução da coloração e da quantidade de acrilamida formada. Contudo é necessário ter em conta que estratégias deste género afectam a globalidade da reacção de Maillard e, consequentemente, as características organolépticas do produto final (Jung *et. al.*, 2003; Stadler e Scholz, 2004).

Alguns autores investigaram o impacto da adição de diferentes aditivos a batatas fritas. A acrilamida é significativamente reduzida nas batatas após a adição de misturas de flavonóides antioxidantes (Kurppa, 2004). Becalski *et. al.* (2004) mostraram que se pode obter uma redução de acrilamida de cerca de 25% em batatas fritas após a adição de rosmarinho (antioxidante) em pó aos óleos de fritar. Alguns efeitos destes antioxidantes podem estar associados aos efeitos combinados de diminuição do pH e ligação à água.

Outros processos que têm dado resultados significativos na diminuição de acrilamida são a gestão da quantidade da água (secagem das batatas antes da fritura) (Kita *et. al.*, 2004) e a fermentação da matéria-prima com micro-organismos apropriados (Awad, 2004; Baardseth *et. al.*, 2006). A adição ao meio reaccional de aminoácidos que possam competir com a asparagina durante a condensação com os grupos carbonilo só é possível quando se usam aminoácidos de sabor neutro (Lindsay e Jang, 2004; Kim *et. al.*, 2005).

Uma das estratégias mais prometedoras, até agora usada apenas em laboratório, é a degradação da asparagina usando a enzima asparaginase, a qual parece ser aplicável a batatas fritas (redução de acrilamida até 97%) mantendo-se um paladar e uma cor aceitável do produto final (Zyzak *et. al.*, 2003).

2) Acções de redução da acrilamida em cereais e produtos de padaria

Ao contrário do que acontece com as batatas, há ainda poucas propostas razoáveis para limitar a formação de acrilamida em cereais.

Neste tipo de matrizes, o factor limitante da formação de acrilamida é a asparagina, dado que os açúcares estão presentes geralmente em quantidades

abundantes. A comprovar esta circunstância, está o facto referido por vários autores de produtos fortificados com asparagina apresentarem uma maior concentração de substância. A degradação da asparagina usando a enzima asparaginase permite a redução da acrilamida até 85%, mantendo-se um paladar e uma cor aceitável do produto final (Zyzak *et. al.*, 2003). Søre *et. al.* (2004 e 2005) sugerem a degradação dos açúcares redutores com hexose oxídase ou glicose oxídase em qualquer passo de preparação dos cereais.

As três principais estratégias de mitigar a acrilamida em produtos de padaria são a substituição de NH_4HCO_3 por $NaHCO_3$, o uso de uma solução de sacarose como adoçante em vez de açúcares redutores e a adição de um ácido orgânico como por exemplo o ácido tartárico (Graf *et. al.*, 2006). Ainda não estão definidas a influência da temperatura do forno, do tempo de cozedura, da humidade do produto final, e da espessura dos biscoitos na formação da acrilamida. Outra recomendação é que se evite torrar o pão em demasia e se deixe fermentar durante mais do que três horas com leveduras (Fredriksson *et. al.*, 2004).

No caso destes produtos as estratégias de mitigação não são muito eficazes uma vez que para se obter resultados satisfatórios é necessário efectuar mudanças mais radicais que poderão ter um impacto negativo nas características organolépticas e na estabilidade do produto final.

3) Acções de redução da acrilamida em café e cacau

No caso do café, ainda não há soluções práticas para reduzir os níveis de acrilamida formada, uma vez que, qualquer mudança no processo de torra do café (temperatura e duração) irá alterar consideravelmente o produto final. No entanto Bagdonaitė *et. al.* (2004) sugerem a torra do café a 260 °C durante cerca de 5 minutos ou a 220 °C durante 15 min de forma a obter um produto final com menor quantidade de acrilamida. É necessário cuidado para não se comprometer a qualidade e as propriedades organolépticas do produto final.

Dois grupos de investigação demonstraram que a acrilamida não é estável no

café armazenado nos seus pacotes originais, tendo verificado que a concentração da substância diminui com o tempo de armazenamento à temperatura ambiente, com perdas entre 40 a 60% em amostras reanalisadas 6 meses após da primeira análise, o que pode levar a uma via de redução de acrilamida nestes produtos (Andrezwejski *et. al.*, 2004).

Alguns autores sugerem a fermentação dos grãos de café com microorganismos geradores de ácido láctico (Baardseth *et. al.*, 2005), a adição de asparaginase (Dria *et. al.*, 2004) e a adição de catiões multivalentes capazes de complexar com a acrilamida ou precursores (Corrigan, 2005).

Algumas destas técnicas também foram sugeridas para mitigar a formação de acrilamida em cacau nomeadamente a adição de asparaginase (Howie *et. al.*, 2006) e a adição de catiões multivalentes (Corrigan, 2005). Para além destas, Van der Meer (2006) sugere a imersão do grãos de cacau em água antes da torra.

Na Tabela 4.1 e na Tabela 4.2 é apresentado um resumo das várias estratégias desenvolvidas para limitar a formação de acrilamida em diversas matrizes alimentares.

Tabela 4.1- Estratégias para reduzir a formação de acrilamida em alimentos via reacção de Maillard

Estratégias	Efeito	Observações	Referências
Café			
1. Adição de microrganismos geradores de ácido láctico (<i>bifidobacterium sp.</i> , <i>lactobacillus sp.</i> , etc.) ou 2. Adição de ácido láctico A adição é feita aos grãos de café verde e exige um período mínimo de actuação de 1 a 6 horas após o qual os grãos são lavados com água e submetidos ao processo habitual de torra.	Os microrganismos convertem os açúcares redutores em ácido láctico reduzindo o pH dos grãos de café e limitando a reacção de Maillard. A formação de acrilamida pode ser reduzida até cerca de 50%.	O grão de café torrado obtido adquire uma tonalidade mais clara do que o café não tratado por este método	Baardseth <i>et. al.</i> , 2005
Adição de asparaginase ao café verde antes do processo de torra.	Conversão da asparagina a ácido aspártico. Redução da acrilamida entre 20 a 90%	Este método pode ser usado em cafés descafeinados. Não há alterações nas propriedades organolépticas do produto final.	Dria <i>et. al.</i> , 2004
Adição de um catião multivalente sob a forma de pó ou de solução, nomeadamente Al^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} aos grãos de café verde antes do processo de torra.	Os catiões multivalentes, complexam com a asparagina ou com os produtos da reacção desta com os açúcares redutores sem introduzirem reacções secundárias indesejáveis e limitando a reacção de Maillard. Permitem uma redução da acrilamida entre os 10 e os 90%.	Não há alterações nas propriedades organolépticas do produto final.	Corrigan, 2005
Cacau			
Imersão dos grãos de cacau verde em água. Os grãos molhados são moídos, as partículas reduzidas e homogeneizadas. Moldam-se aglomerados com as partículas de cacau e estes são torrados a uma temperatura entre 80 a 160 °C.	O aumento do grau de humidade (até 5%) impede que o grão de cacau atinja temperaturas internas demasiado elevadas durante a torra. Redução até cerca de 80% na formação da acrilamida.	O processo é económico, e dá origem a cacau torrado com cor e sabor melhorados.	Van der Meer, 2006
Adição de asparaginase ao cacau verde antes do processo de torra.	Conversão da asparagina a ácido aspártico. Redução da acrilamida entre 20 a 90%.	Não há alterações nas propriedades organolépticas do produto final.	Howie <i>et. al.</i> , 2005

Capítulo 4 – A FORMAÇÃO DA ACRILAMIDA EM ALIMENTOS

Estratégias	Efeito	Observações	Referências
Adição de um cátion multivalente sob a forma de pó ou de solução, nomeadamente Al^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} aos grãos de cacau verde antes do processo de torra.	Os cátions multivalentes, complexam com a asparagina ou com os produtos da reação desta com os açúcares redutores sem introduzirem reações secundárias indesejáveis e limitando a reação de Maillard. Permitem uma redução da acrilamida entre os 10 e os 90%.	Não há alterações nas propriedades organolépticas do produto final.	Corrigan, 2005
<i>Cereais usados no fabrico de pão e produtos doces de pastelaria</i>			
1. Substituição do fermento baseado em NH_4HCO_3 por $NaHCO_3$.	1. Redução de cerca de 50% na formação da acrilamida uma vez que o efeito promotor do grupo amónia é eliminado.	Não há alterações nas propriedades organolépticas do produto final.	Graf <i>et. al.</i> , 2006 Amrein <i>et. al.</i> , 2004b Vass <i>et. al.</i> , 2004
2. Utilização de uma solução de sacarose em vez de açúcares redutores.	2. Redução da formação da acrilamida até cerca de 60%. Um efeito semelhante foi obtido no gengibre.		
3. Adição moderada de ácido tartárico ou cítrico.	3. A adição destes ácidos com $NaHCO_3$ potencializa o efeito levedante deste e ao baixar o pH da massa reduz a formação da acrilamida até cerca de 30%.		
4. Adição de asparaginase	4. Remoção da asparagina e redução da acrilamida até cerca de 85%.		
Adição de hexose oxidase ou de glicose oxidase em qualquer passo da preparação dos alimentos anterior ao processamento térmico.	A enzima oxida o carbono redutor do açúcar o que elimina a possibilidade deste se envolver na formação da acrilamida. Redução da acrilamida até cerca de 65%.	Não há alterações nas propriedades organolépticas do produto final.	Søe <i>et. al.</i> , 2004 e 2005
<i>Batatas e cereais usados na preparação de snacks salgados</i>			
1. Imersão num banho de água a 70 °C durante 45 min ou 2. Imersão num banho com ácido cítrico. O alimento é posteriormente submetido ao processamento habitual.	Eliminação dos precursores e diminuição do pH dos alimentos limitando a reação de Maillard. Redução da acrilamida até cerca de 70%.	Este método pode ser aplicado a produtos à base de milho sem aumento da acidez do produto final	Pedreschi <i>et. al.</i> , 2004 e 2007 Jung <i>et. al.</i> , 2003 e 2004 Fiselier e Grob, 2005

Capítulo 4 – A FORMAÇÃO DA ACRILAMIDA EM ALIMENTOS

Estratégias	Efeito	Observações	Referências
Aplicação de cisteína ou glutatona em solução alcalina (pH 8-13) na superfície do alimento antes do processamento a temperaturas elevadas	O grupo tiol da cisteína reage com a ligação dupla da acrilamida que se vai formando o que faz desaparecer parte da acrilamida livre. Redução da acrilamida até cerca de 90%.	Não há alterações nas propriedades organolépticas do produto final. O aducto que se forma entre a acrilamida e a cisteína aparentemente não é tóxico.	Flückiger e Salih, 2006
Adição de microrganismos capazes de metabolizar açúcares (<i>saccharomyces cerevisiae</i> , <i>streptococcus lactis</i> ou <i>streptococcus thermophilus</i>). O alimento é incubado a 30 °C durante 2,5 h com agitação e submetido ao processamento térmico.	Eliminação dos açúcares redutores. Redução da acrilamida até cerca de 80%	Não há alterações nas propriedades organolépticas do produto final.	Awad, 2004
Imersão do alimento numa solução de glicina ou glutamina antes do processamento térmico	Redução da acrilamida até cerca de 93% devido à competição dos aminoácidos adicionados com a asparagina durante a reacção de Maillard ou reacção directa com a ligação dupla da acrilamida formada dando origem a aductos que eliminam a acrilamida livre.	Não há alterações nas propriedades organolépticas do produto final.	Bråthen <i>et. al.</i> , 2005 Kim <i>et. al.</i> , 2005
1. Adição de asparaginase	1. Conversão da asparagina reactiva a ácido aspártico e amoníaco o que leva uma redução da acrilamida até cerca de 99,9%.	Não há alterações nas propriedades organolépticas do produto final.	Elder <i>et. al.</i> , 2004 ^a
2. Adição de microrganismos	2. Metabolizam a asparagina para a síntese de proteínas ou de outros metabolismos microbianos.		
3. Lixiviação dos alimentos com uma solução aquosa de pH entre 5 e 9	3. A solubilidade da asparagina em água aumenta em meio ligeiramente ácido ou ligeiramente básico.		
1. Imersão num banho de água a 70 °C durante cerca de 4 min	1. Redução da formação da acrilamida entre 40 a 95% uma vez que há remoção dos açúcares redutores	Não há alterações nas propriedades organolépticas do produto final.	Lindsay e Jang, 2004
2. Adição de um agente supressor da formação da acrilamida como um cátion multivalente (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Al ³⁺) ou um composto quelante (pectina, EDTA, ácido cítrico)	2. Complexação com os precursores da acrilamida, especialmente com aminoácidos, impedindo a sua reacção na formação da acrilamida.		
3. Adição de um bloqueador do grupo carbonilo (quitosano ou cisteína)	3. Competição com a asparagina durante a condensação com os açúcares redutores. Os compostos que se formam não evoluem para formar acrilamida e no geral são pouco reactivos.		

Capítulo 4 – A FORMAÇÃO DA ACRILAMIDA EM ALIMENTOS

Estratégias	Efeito	Observações	Referências
4. Combinações dos anteriores	4. A combinação de qualquer destes métodos leva a reduções mais eficazes da acrilamida.		
Adição de aminoácidos como a lisina aos alimentos antes do processamento térmico	Competição com a asparagina durante a condensação com os açúcares redutores. Reacção com a ligação dupla da acrilamida para formar um aducto. Redução da formação da acrilamida até cerca de 20%.	Não há alterações nas propriedades organolépticas do produto final.	Plank e Novak, 2005 Elder <i>et. al.</i> , 2004b Kim <i>et. al.</i> , 2005
Imersão num banho de asparaginase saturado com outros compostos presentes na matriz alimentar também solúveis em água. O banho é preparado a partir de extracções contínuas a matrizes alimentares de modo a estabelecer-se um equilíbrio entre os vários compostos solúveis extraídos e o solvente (água). Adição de asparaginase para eliminar toda a asparagina presente e utilização deste banho para extrair asparagina noutros produtos semelhantes.	Remoção selectiva da asparagina e não de outros componentes muitas vezes responsáveis pelo paladar dos alimentos. Redução da acrilamida até cerca de 80%.	Não há alterações nas propriedades organolépticas do produto final.	Zyzak <i>et. al.</i> 2003 e 2004
1. Diminuição da temperatura de processamento	1. O processamento dos alimentos a temperaturas inferiores a 120 °C leva à formação de quantidades reduzidas de acrilamida		
2. Adição de glucanato de sódio	2. O glucanato de sódio é um açúcar ácido que ao ser adicionado a uma alimento substituiu os açúcares redutores	Não há alterações nas propriedades organolépticas do produto final.	Grune e Talarico, 2006
3. Adição de aditivos alimentares básicos ou ácidos	3. O aumento ou diminuição do pH em combinação com o aumento ou diminuição da temperatura leva à alteração do mecanismo de formação da acrilamida		
<i>Batatas usadas na preparação de batatas estaladiças, batatas fritas tipo francês e diversos tipos de snack à base de batatas</i>			
Imersão das batatas numa solução de 2% em farinha de grão-de-bico antes do processamento térmico	A farinha de grão de bico possui proteínas estáveis a temperaturas elevadas que formam uma barreira térmica que limita a reacção de Maillard durante a fritura das batatas. Inibição da formação da acrilamida até cerca de 80%.	Bons resultados mesmo a temperaturas mais altas	Vattem e Shetty, 2003

Capítulo 4 – A FORMAÇÃO DA ACRILAMIDA EM ALIMENTOS

Estratégias	Efeito	Observações	Referências
1. Adição de microrganismos geradores de ácido láctico(<i>bifidobacterium sp., lactobacillus sp., etc.</i>) ou 2. Adição de ácido láctico A adição é feita antes do processamento e exige um período mínimo de actuação de 1 a 6 horas após o qual as batatas são lavadas com água e submetidas ao processo habitual.	Os microrganismos convertem os açúcares redutores em ácido láctico reduzindo o pH das batatas e limitando a reacção de Maillard. A formação de acrilamida pode ser reduzida até cerca de 50%.	A batata frita adquire uma tonalidade mais clara.	Baardseth <i>et. al.</i>, 2004 e 2006 Kita <i>et. al.</i>, 2004
Utilização de uma máquina especial continuamente alimentada por fatias finas de batata que são pré-lavadas em água a 60 °C e submetidas ao processo de fritura (dentro da máquina).	Eliminação de parte dos precursores e possibilidade de manipular outros parâmetros tais como a temperatura e humidade de modo a criar as condições desfavoráveis à formação da acrilamida. Redução da acrilamida até cerca de 90%.	Não há alterações nas propriedades organolépticas do produto final. O método é simples de implementar e não acarreta custos adicionais .	Barry <i>et. al.</i>, 2006
Adição de um composto com um grupo tiol livre como a cisteína coadjuvado por um agente redutor como o ácido ascórbico para diminuir o pH e ampliar o efeito da cisteína.	O grupo tiol da cisteína reage com a ligação dupla da acrilamida que se vai formando o que faz desaparecer parte da acrilamida livre. Redução de cerca de 98%.	Não há alterações nas propriedades organolépticas do produto final.	Elder, 2005
Preparação de uma mistura de ovo e pão ralado usada para cobrir croquetes de batata antes da fritura	A mistura de ovo e pão ralado tem um baixo potencial de formação da acrilamida. Redução de cerca de 80% da acrilamida.	Não há alterações nas propriedades organolépticas do produto final.	Fiselier <i>et. al.</i>, 2004
Fritura das batatas em vácuo a uma temperatura de 118 °C	Redução da acrilamida até 97%	Manutenção da cor e textura típicas das batatas fritas	Granda <i>et. al.</i>, 2004
Fritura das batatas a uma temperatura de 165-170 °C durante apenas 2 ou 3 minutos.	Formam-se menos pontos com uma alta concentração de acrilamida e no final a quantidade total é mais baixa.	Não há alterações nas propriedades organolépticas do produto final.	Grob <i>et. al.</i>, 2003
Fritura das batatas a 160 °C durante 3 min e pós-secagem num forno de ar quente a 105 °C durante cerca de 75 min.	Redução da acrilamida até cerca de 80% nas batatas fritas.	Não há alterações nas propriedades organolépticas do produto final.	Kita <i>et. al.</i>, 2004
1. Adição de leveduras (<i>saccharomyces cerevisiae, torula sp.</i>), bactérias (<i>lactobacillus sp., lactococcus sp., bacillus sp.</i>) e fungos (<i>penicillium sp., aspergillus sp.</i>) aos alimentos antes do processamento térmico.	1. Metabolizam os açúcares redutores e possivelmente a asparagina removendo assim os precursores. Redução da acrilamida até cerca de 90%.	Os produtos obtidos apresentam uma cor mais clara e uniforme.	Lindsay e Jang, 2005
2. Adição de caramelo ou outras partículas coradas	2. As partículas coradas apresentam uma excepcional tolerância química e física e o facto de apresentarem uma carga associada faz com que formem aductos com os açúcares redutores.		

Capítulo 4 – A FORMAÇÃO DA ACRILAMIDA EM ALIMENTOS

Estratégias	Efeito	Observações	Referências
Imersão das batatas num banho de NaCl com concentração de 0,002 g/L a 25 °C durante 5 min mantendo uma agitação de 200 rpm.	O mecanismo de redução da acrilamida nestas condições ainda não foi explicado mas como há formação de uma cor mais clara é provável que iniba passos da reacção de Maillard. Redução na formação da acrilamida até cerca de 97%.	Melhoria na cor final das batatas fritas (mais claras).	Pedreschi <i>et. al.</i> , 2006 e 2007
Adição de açúcares não redutores como a tre-halose.	A tre-halose reage com os produtos da reacção da glicose com a asparagina inibindo assim as reacções de formação da acrilamida. Redução até cerca de 14%.	Apenas usado em simulações. A tre-halose é um aditivo alimentar aprovado.	Oku <i>et. al.</i> , 2005
Introdução de glicina como ingrediente ou no passo imediatamente antes do processamento final	Competição da glicina com a asparagina durante a reacção de Maillard ou reacção directa com a ligação dupla da acrilamida formada dando origem a aductos que eliminam a acrilamida livre. Reduz até cerca de 70% a formação de acrilamida.	Melhoria na cor final das batatas fritas (mais claras).	Sahagian e Van Eijck, 2005
Adição de uma mistura de flavonóides antioxidantes a um alimento, a um ingrediente ou a um produto final.	Os flavonóides são antioxidantes fortes capazes de reagir com a acrilamida ou com os seus precursores (aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos ou proteínas). A adição destas misturas de flavonóides permite reduzir a formação da acrilamida ou dos seus precursores até cerca de 70% durante a confeção, processamento, aquecimento ou armazenamento dos alimentos.	Não há alterações nas propriedades organolépticas do produto final.	Kurppa, 2004
Adição de um cátion multivalente sob a forma de pó ou de solução, nomeadamente Al ³⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Zn ²⁺ e Cu ²⁺ aos grãos de cacau verde antes do processo de torra.	Os cátions multivalentes, complexam com a asparagina ou com os produtos da reacção desta com os açúcares redutores sem introduzirem reacções secundárias indesejáveis e limitando a reacção de Maillard. Permitem uma redução da acrilamida entre os 10 e os 90%.	Não há alterações nas propriedades organolépticas do produto final.	Corrigan, 2005

Tabela 4.2-Estratégias para reduzir a formação de acrilamida em alimentos via acroleína

Estratégias	Efeitos	Observações	Referências
<i>Batatas usadas na preparação de batatas estaladiças, batatas fritas tipo francês e diversos tipos de snack à base de batatas</i>			
1. Adição de um antioxidante como o ácido cítrico antes do processamento térmico.	1. Impede a hidrólise dos lípidos e a sua conversão a glicerol	Não há alterações nas propriedades organolépticas do produto final.	Tricoit <i>et. al.</i> , 2004
2. Lavagem do alimento com uma solução desionizada que elimine íons metálicos antes do processamento térmico.	2. Os íons metálicos como o ferro estão presentes nos alimentos, fazem parte da constituição das frigideiras e são catalisadores térmicos da degradação dos lípidos a glicerol.		
3. Eliminação do glicerol por adição de carvão activado ou derivados de sílica ao óleo ou água em contacto com o produto final.	3. A eliminação do glicerol impede a sua transformação térmica a acroleína.		
4. Eliminação de aminoácidos livres por passagem da sua superfície por uma resina de troca iónica ou sílica gel antes do processamento térmico.	4. A eliminação dos aminoácidos livres impede a sua reacção com a acroleína e consequente formação de ácido acrílico que pode levar à formação de acrilamida.		

Capítulo 5 - MÉTODOS ANALÍTICOS USADOS NA QUANTIFICAÇÃO DA ACRILAMIDA EM ALIMENTOS

"A curiosidade é mais importante do que o conhecimento"

Albert Einstein
(1879-1945)

5.1- Introdução

Os alimentos constituem, quase sem excepção, uma mistura complexa e heterogénea de uma variedade impressionante de substâncias químicas. A medição dos seus componentes individuais representa quase sempre uma tarefa difícil, implicando geralmente o uso de técnicas analíticas sofisticadas. De entre estas, apresenta particular importância o uso das técnicas cromatográficas de HPLC e de GC.

A implementação de métodos cromatográficos exige, geralmente, diversas etapas prévias que constituem aquilo que genericamente podemos designar por processo de preparação das amostras. O principal objectivo deste processo é o de transferir o(s) analito(s) em estudo da matriz original para um extracto orgânico, o mais possível isento de interferentes, passível de ser analisado pela instrumentação analítica seleccionada.

A quantificação da acrilamida em alimentos constitui um bom exemplo de dificuldade analítica, não só devido à complexidade das matrizes envolvidas, fenómeno comum a qualquer análise de constituintes alimentares, mas principalmente por factores relacionados com a própria substância: trata-se de uma molécula de baixa massa molecular, com elevada polaridade, logo extremamente difícil de extrair de matrizes aquosas por solventes orgânicos convencionais, com más propriedades cromatográficas e de difícil detecção, dada a ausência de propriedades adequadas à generalidade dos detectores cromatográficos mais usados.

Por todos estes motivos, a análise de acrilamida em alimentos envolve geralmente um demorado e complexo processo de preparação da amostra, que pode incluir vários passos para: a) a pulverização e homogeneização da amostra, b) a hidratação da amostra, c) a extracção da acrilamida, d) a purificação e a concentração dos extractos, incluindo a eliminação de gordura e a precipitação de proteínas e polissacarídeos, e) a derivatização do composto.

O número e o tipo de etapas usadas durante a globalidade do processo de preparação de amostra são função do tipo de matriz e da técnica cromatográfica usada.

5.2- Métodos de preparação das amostras para a análise de acrilamida

5.2.1- Homogeneização das amostras

A homogeneização da amostra constitui o passo inicial de qualquer processo analítico e tem como objectivo a mistura correcta de todos os seus componentes. No caso de amostras sólidas é geralmente necessário proceder à redução do tamanho das partículas, o que se consegue à custa de operações que incluem cortar, quebrar e pulverizar a matriz (Lichon, 1996).

No caso da acrilamida, é necessário tomar alguns cuidados especiais durante a execução destas operações, uma vez que a substância se encontra principalmente na superfície dos alimentos e não no seu interior. Isto deve-se ao facto, já referido anteriormente (Capítulo 4), de ser na zona superficial que se verificam as condições mais adequadas de temperatura e humidade para a reacção de Maillard ter lugar. No caso do pão, por exemplo, é na crosta e não no miolo que se encontra a grande maioria da acrilamida que se formou durante a cozedura no forno (Figura 4.13 e Figura 4.14). No mesmo capítulo também se referiu o facto de ser nas partes mais torradas dos alimentos que se encontra a maior parte da substância, o que faz com que, mesmo à superfície dos alimentos, se encontrem zonas totalmente distintos no que respeita à presença de acrilamida.

Por tudo isto é necessário garantir que a toma escolhida inclui todas as partes do alimento, nas correctas proporções, de forma a garantir a sua representatividade. Em situações excepcionais poder-se-á pretender a análise de apenas determinadas partes do alimento, por exemplo, apenas da crosta ou apenas das porções mais queimadas, devendo naturalmente fazer-se a recolha da toma em função do objectivo pretendido.

Assume também grande importância, em especial nos alimentos sólidos, o grau de pulverização a que se deve sujeitar a amostra. Petersson *et. al.* (2006) realizaram um estudo sobre o impacto que a pulverização poderá ter na extracção de acrilamida, tendo concluído que é importante usar partículas suficientemente pequenas ($<1000\ \mu\text{m}$) de forma a obter um rendimento de extracção satisfatório.

As técnicas apresentadas nos diferentes trabalhos publicados para pulverizar e homogeneizar as amostras variam de acordo com a matriz analisada. Alguns autores sugerem a utilização de um processador de alimentos ou de uma picadora eléctrica antes da extracção da acrilamida de batatas fritas e cereais (Ahn *et. al.*, 2002; Becalski *et. al.*, 2003; Roach *et. al.*, 2003; Bermudo *et. al.*, 2006b; Petersson *et. al.*, 2006). Também foi proposto o uso de um almofariz, para amostras de batatas fritas e bolachas (Kim *et. al.*, 2007), de um moinho, em amostras de carne e de café (Hoenicke *et. al.*, 2004), ou congelar os alimentos (batatas fritas e chocolate) e proceder depois à sua pulverização (Peng *et. al.*, 2003). A homogeneização dos alimentos em Ultra-Turrax, durante 1 a 2 minutos, já com estes mergulhados no solvente de extracção, tem dado bons resultados em alimentos como batatas fritas e pão (Jezussek e Schieberle, 2003; Delatour *et. al.*, 2004; Gökmen *et. al.*, 2005; Pittet *et. al.*, 2004). Ono *et. al.* (2003) e Nielsen *et. al.* (2006) propõem a pulverização prévia dos alimentos (batatas fritas e cereais) numa picadora eléctrica e a homogeneização em Ultra-Turrax, após adição de solvente de extracção.

5.2.2- Extracção da acrilamida das matrizes alimentares

Dada a grande polaridade da acrilamida, a generalidade dos esquemas analíticos propostos inclui um processo de extracção com água, que se segue às etapas anteriormente referidas de homogeneização e pulverização. A hidratação da matriz é essencial para uma correcta extracção da substância, pelo que entre a adição de água e o processo extractivo propriamente dito, deve respeitar-se um tempo de repouso mínimo de 30 minutos. Mesmo nos casos em que a extracção é feita com solventes orgânicos, o passo de hidratação é usualmente efectuado.

O uso da água acarreta, no entanto, os inconvenientes em regra associados a este solvente, ou seja, o facto de a generalidade dos componentes maioritários, como açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos orgânicos, etc., serem co-extraídos. Nas amostras líquidas, como por exemplo, leite e bebidas à base de café e chocolate, esta etapa de extracção aquosa é desnecessário dado o facto de elas próprias constituírem já soluções aquosas.

A extracção aquosa é efectuada geralmente à temperatura ambiente (Nemoto, *et. al.*, 2002; Tareke *et. al.*, 2002; Pittet *et. al.*, 2004). Fohgelberg *et. al.* (2005) extraíram acrilamida de leite materno e de comida de bebé com água a 37 °C. Alguns autores aconselham o uso de água aquecida a temperaturas até 80 °C, uma vez que a acrilamida é relativamente estável a esta temperatura e o rendimento poderá ser razoavelmente maior (Rothweiler *et. al.*, 2003; Dunovská *et. al.*, 2004; Şenyuva e Gökmen, 2006). Ahn *et. al.* (2002) propõem a extracção com água quente previamente fervida e mantida a 80 °C durante duas horas com agitação constante.

Young *et. al.* (2004) e Jiao *et. al.* (2005) sugerem que a extracção pode ser efectuada com soluções concentradas de cloreto de sódio de modo a evitar a formação de emulsões durante a purificação das amostras, aumentando assim o rendimento do processo. Alguns autores sugerem o uso de soluções aquosas ácidas como forma de aumentar o rendimento da extracção. Por exemplo, Gertz e Klostermann (2002) usaram uma solução aquosa de ácido acético a 37 °C e Taubert *et. al.* (2004) usaram uma solução aquosa de ácido perclórico.

Alguns autores sugerem o uso de solventes orgânicos, misturados ou não com água, de forma a diminuir a co-extracção de componentes maioritários. Assim, foi proposto o uso de misturas de acetona/água (Fauhl *et. al.*, 2003), acetonitrilo/água (85/15 v:v) (Jezussek e Schieberle, 2003) e de metanol/água (Konings *et. al.*, 2003; Petersson *et. al.*, 2006). O uso de metanol foi proposto por Şenyuva e Gökmen (2005 e 2006a) e Gökmen *et. al.* (2005, 2006b) enquanto Ciesarová *et. al.* (2004) usaram etanol a 70 °C e Pabst *et. al.* (2005) usaram isopropanol.

Biedermann *et. al.* (2002a) desenvolveram 2 métodos para extrair a acrilamida de matrizes alimentares. No primeiro usaram água a 70 °C para hidratar a amostra e extraíram a acrilamida com isopropanol e a ajuda de umas gotas de um óleo alimentar para reter a acrilamida extraída. No segundo método usaram água a 60 °C seguida de 2-butanona.

Como método extractivo alternativo, tem sido usada a técnica de PLE (Pressurized Liquid Extraction) comercialmente conhecida como ASE - Accelerated Solvent Extraction (Dionex, 2003). Esta técnica consiste em extrair amostras sólidas e

semi-sólidas com solventes líquidos convencionais a temperaturas e pressões elevadas para aumentar a eficiência do processo. Hoenicke *et. al.* (2004) aplicaram esta técnica a amostras de batatas fritas, cereais e café. O mesmo processo de extracção foi adoptado por Yusá *et. al.* (2006) que o aplicaram em amostras de cereais e de batatas, usando o acetonitrilo como solvente extractor. Segundo os autores, a técnica permite uma extracção da acrilamida de uma forma rápida e automatizada de várias amostras de alimentos num curto espaço de tempo.

Pedersen e Olsson (2003, 2004) extraíram acrilamida de batatas fritas por um processo contínuo num aparelho de Soxhlet. O solvente usado foi o metanol e a extracção foi mantida por 10 dias até os resultados obtidos serem constantes. Encontraram valores na ordem dos 15000 µg/kg de acrilamida o que os levou a concluir que os métodos apresentados até à data não eram eficazes para extrair a totalidade da acrilamida dos alimentos e que deviam, por isso, ser revistos. Os seus resultados foram, todavia, refutados por outros autores (Devries e Post, 2004; Grob *et. al.*, 2004; Tanaka *et. al.*, 2004) que demonstraram que a acrilamida se formava durante o processo de extracção com o metanol, uma vez que os precursores, asparagina e açúcares redutores também eram extraídos nas condições de refluxo usadas pelos autores.

5.2.3- Purificação dos extractos

Tal como já foi referido, uma dificuldade inerente à extracção de amostras alimentares com água reside na co-extracção de componentes maioritários da matriz.

A presença destes interferentes pode resultar numa multitude de problemas, incluindo a formação de emulsões, a incorrecta separação cromatográfica, a possibilidade de contaminação do equipamento e, consequentemente, a diminuição da *performance* global do método.

A remoção de interferentes pode ser realizada por intermédio de operações de purificação, que podem ser de diferentes tipos. Os mais comuns são a) precipitação selectiva de proteínas e hidratos de carbono, b) etapas adicionais de extracção líquido-líquido, c) processos de extracção em fase sólida.

a) Precipitação selectiva de proteínas e hidratos de carbono

As proteínas e os polissacarídeos podem ser separados das matrizes alimentares usando diferentes processos: ultra-centrifugação, precipitação, precipitação isoelectrica, adição de solventes orgânicos, adição de polímeros não iónicos, adição de polielectrólitos e complexação por afinidade (Singh e Singh, 1996; Linden e Lorient, 2000).

Na análise de acrilamida, o passo extra de desproteinação é indispensável sempre que se trata de matrizes alimentares ricas em proteínas. O método mais utilizado consiste na adição de uma solução de hexacianoferrato de potássio tri-hidratada, $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$ (Carrez I) seguida de uma solução de sulfato de zinco hepta-hidratado, $ZnSO_4.7H_2O$ (Carrez II). Neste método as proteínas são precipitadas por oclusão molecular durante a formação de um precipitado branco ($K_2Zn_3[Fe(CN)_6]_2$), eliminando-se cerca de 85% das proteínas das amostras (Cabral, 1981; Sun *et. al.*, 2003). O método foi usado para eliminar proteínas de amostras de batatas fritas e derivados de cereais (Ciesarová *et. al.*, 2004; Hamlet *et. al.*, 2004; Pittet *et. al.*, 2004; Gökmen *et. al.*, 2005; Şenyuva e Gökmen, 2005a e 2006).

Alguns autores propuseram a desproteinação dos extractos aquosos pela adição de solventes orgânicos como o metanol (Jezussek e Schieberle, 2003), o 1-propanol (Dunovská *et. al.*, 2004) e o acetonitrilo (Riediker e Stadler, 2003; Hoenicke *et. al.*, 2004; Wenzl *et. al.*, 2003).

Na literatura consultada referente a processos analíticos usados na quantificação de acrilamida não é feita qualquer referência à necessidade de remoção de polissacarídeos. Os polissacarídeos são os responsáveis pela formação e estabilidade da espuma do café (Capítulo 3) e a nossa experiência mostrou-nos que a sua presença é responsável por problemas experimentais que impediam a correcta quantificação da acrilamida nestas amostras. A técnica adoptada neste trabalho, para reduzir a quantidade de polissacarídeos e consequentemente da espuma em extractos de café e sucedâneos, será discutida detalhadamente no Capítulo 8.

b) Etapas adicionais de extracção líquido-líquido

Alguns autores sugerem uma etapa adicional de extracção líquido-líquido para a remoção de gorduras. Como solvente pode usar-se o hexano (Biedermann *et. al.*, 2002a; Nemoto *et. al.*, 2002; Jezussek e Schieberle, 2003; Dunovská *et. al.*, 2004; Ciesarová *et. al.*, 2004; Wenzl *et. al.*, 2004; Bermudo *et. al.*, 2006a), o éter de petróleo (Jiao *et. al.*, 2005; Zhang *et. al.*, 2005b), o ciclo-hexano (Petersson *et. al.*, 2006) ou o diclorometano (Becalski *et. al.*, 2003; Delatour *et. al.*, 2004).

A remoção de gordura também pode ser efectuada, como nós próprios o fizemos ao longo do nosso trabalho experimental, por uma simples filtração depois de colocar o extracto a uma temperatura próxima de 0 °C, o que provoca a solidificação da maior parte da matéria gorda.

c) Processos de extracção em fase sólida

O processo de extracção em fase sólida, cuja designação provem do inglês SPE (Solid Phase Extraction), tem sido muito usado como técnica de purificação dos extractos de acrilamida, isoladamente ou combinada com outros passos adicionais de purificação já apresentados.

A extracção em fase sólida corresponde a um processo de separação de compostos onde a retenção dos mesmos ocorre sobre um suporte sólido (sorbente) e a posterior eluição se faz através de um líquido que atravessa esse suporte. O suporte sólido pode ser fixado no interior de uma pequena coluna ou de um disco/membrana.

Encontram-se descritos vários tipos de mecanismos para a retenção dos compostos: adsorção, partilha (com enchimentos polares ou apolares), troca-iónica (catiónica ou aniónica), exclusão ou mistos. Os materiais sorbentes mais usados incluem o florisil, a alumina, a sílica gel e diversos materiais à base de sílica modificada (Almeida *et. al.*, 2004).

Na maioria dos trabalhos publicados sobre a análise da acrilamida, as técnicas de SPE usadas envolvem uma combinação de vários sorbentes de modo a garantir

multi-interacções e alargar a gama de interferentes eliminados. Em regra, esta separação é efectuada nos extractos aquosos imediatamente antes do processo cromatográfico ou antes do processo de derivatização, quando este tem lugar. Em alguns casos, é aplicada a extractos orgânicos após as etapas de derivatização e extracção do derivado formado.

Muitos grupos de investigação sugerem o uso de sorbentes apolares, como o C₁₈ (Gökmen *et. al.*, 2005; Jiao *et. al.*, 2005; Kim *et. al.*, 2007; Şenyuva e Gökmen, 2005; Zhang *et. al.*, 2005b) ou a grafite (Tareke *et. al.*, 2000 e 2002) para purificar extractos aquosos de amostras de batatas fritas, cereais de pequeno-almoço, pão e alimentos para crianças. Outros autores propõem a utilização de sorbentes de fase-mista (mistura de sorbentes: apolar, troca iónica e troca catiónica), aplicados na purificação de batatas fritas e cereais (Rosén e Hellenäs, 2002; Peng *et. al.*, 2003; Murkovic, 2004; Nielsen *et. al.*, 2006; Şenyuva e Gökmen, 2006), produtos japoneses derivados de arroz (Ono *et. al.*, 2003) e amostras aquosas de cafés, chocolate em pó e cacau (Delaour *et. al.*, 2004; Granby e Fagt, 2004). Jezussek e Schieberle (2003) usaram colunas com terra de diatomáceas para purificar o extracto aquoso de batatas fritas antes da injeção no GC-MS. Kawata *et. al.* (2001) usaram fibra de carbono como sorbente em SPE para extrair acrilamida e outros compostos polares de águas residuais antes da análise por GC-MS.

Outros grupos sugerem a combinação de dois ou mais sorbentes diferentes, usados em sequência. Becalski *et. al.* (2003), Govaert *et. al.* (2006) e Petersson *et. al.* (2006) propuseram a utilização de sorbentes apolares seguidos de sorbentes de fase-mista para purificar amostras de batatas fritas, café, chocolate, pão e cereais. Andrzejewski *et. al.* (2004) e Roach *et. al.* (2003) propuseram uma combinação semelhante à anterior para analisar acrilamida em café. Bermudo *et. al.* (2006a e 2006b) sugeriram uma combinação de diferentes sorbentes de troca catiónica num primeiro método e, num segundo método, sorbentes polares seguidos de sorbentes de fase-mista, para purificar amostras de batatas fritas e produtos derivados de cereais. Young *et. al.* (2004) efectuaram o processo SPE com sorbentes apolares seguidos de sorbentes de troca catiónica na purificação de extractos aquosos de batatas fritas. Riediker e Stadler (2003) usaram uma combinação de sorbentes de fase-mista e de troca catiónica para purificar extractos aquosos de amostras de produtos à base de cereais antes da análise por LC-MS/MS.

Todas estas técnicas de purificação por SPE acabadas de descrever são aplicadas a extractos aquosos antes de se efectuar a derivatização, se for o caso, ou antes da análise directa por LC-MS/MS ou GC-MS. O solvente de eluição usado é, em todos os casos apresentados, a água.

No entanto, a purificação por SPE também pode ser aplicada a extractos orgânicos obtidos após derivatizar a amostra e extrair os derivados da fase aquosa. Alguns autores sugeriram Florisil (silicato de magnésio) para efectuar a purificação do extracto orgânico obtido após a bromação dos extractos aquosos de amostras de batatas fritas, água e cereais (US EPA, 1996; Nemoto *et. al.*, 2002; Pittet *et. al.*, 2004). Estes autores propuseram como solvente de eluição a acetona.

De um modo geral, após os procedimentos de extracção e purificação da acrilamida das matrizes alimentares, é necessário eliminar o solvente em excesso. Na grande maioria dos trabalhos apresentados até agora, a evaporação é efectuada em evaporadores rotativos, sob vácuo entre 50 a 60 °C. No entanto, este passo também é crítico. Biedermann *et. al.* (2002a) verificaram que grande parte da acrilamida desaparece quando os extractos aquosos são evaporados até à secura sem a presença de um resíduo que a retenha nas paredes do balão do evaporador. Para além disso, muitas amostras quando evaporadas em excesso, dão origem a soluções gelatinosas e espessas que tornam difícil a recuperação do balão do evaporador e posteriores operações (Ahn *et. al.*, 2002). Este efeito foi confirmado durante o desenvolvimento deste trabalho experimental. Verificamos que os extractos aquosos de batatas fritas, quando evaporados excessivamente, se tornam gelatinosos dificultando a recuperação do balão do evaporador. No caso dos extractos de café, notava-se uma concentração de sólidos que, para além de dificultar a recuperação, exigia a introdução de um passo extra de centrifugação.

5.3- A quantificação da acrilamida

A quantificação da acrilamida é geralmente obtida com recurso a técnicas cromatográficas, tanto de cromatografia líquida como de cromatografia gasosa. A grande diferença entre ambas reside no facto da primeira permitir facilmente a análise directa da substância, enquanto a análise por cromatografia gasosa implica geralmente uma derivatização prévia do composto, com as desvantagens daí decorrentes em termos de tempo e trabalho. Comum a ambas as técnicas é a utilização de detectores de massa, o que se justifica pela complexidade das matrizes analisadas e pelos elevados níveis de sensibilidade exigidos. Neste caso a vantagem pertence aos processos baseados na cromatografia gasosa, dado o menor custo e a maior facilidade de funcionamento dos aparelhos acoplados de GC-MS em relação aos aparelhos de LC-MS. Tendo em conta as possibilidades únicas apresentadas pelos detectores de massa, é usual o recurso a análogos isotópicos da acrilamida para funcionarem como padrões internos. Dada a sua especificidade, será feita, em separado, uma breve referência aos mesmos.

5.3.1- Padrões internos usados na quantificação da acrilamida

O uso de análogos isotópicos dos compostos a quantificar como padrão interno, neste caso da acrilamida, apresenta enormes vantagens em relação a quaisquer outras substâncias, uma vez que apresentam, genericamente, propriedades idênticas à acrilamida tanto a nível químico como físico. O seu uso em metodologias cromatográficas, porém, está confinado aos processos em que são usados detectores de massa, pois apenas estes permitem a obtenção de cromatogramas individualizados de substâncias com tempos de retenção semelhantes, como é sempre o caso do analito e do respectivo análogo isotópico.

O deutério, o carbono 13 e, ocasionalmente, o azoto 15 são normalmente os isótopos incorporados, correspondendo a situação ideal à incorporação de um mínimo de três átomos, de modo a assegurar que os fragmentos monitorizados pelo detector

estejam suficientemente separados dos fragmentos isotópicos naturalmente presentes no analito. A posição dos átomos isotópicos na estrutura da molécula também deve ser levada em conta, uma vez que serão pouco úteis se durante a fragmentação no espectrómetro de massa forem eliminados dando origem a fragmentos sem átomos isotópicos e logo iguais aos do analito. Adicionalmente, os átomos de deutério não devem estar em posições estruturais onde possa ocorrer permuta isotópica uma vez que isso invalidaria a utilidade do padrão interno (Gilbert, 1987).

Alguns autores sugerem a utilização da $^{13}\text{C}_3$ -acrilamida como padrão interno (Tareke *et. al.*, 2002; Becalski *et. al.*, 2003; Riediker e Stadler, 2003; Lagalante e Felter, 2004; Pittet *et. al.*, 2004). Mas para além desta substância, também foram propostos outros análogos isotópicos, condicionados principalmente pela sua disponibilidade como, por exemplo, a $^{13}\text{C}_1$ -acrilamida (Nemoto, *et. al.*, 2002) e a $^2\text{H}_3$ -acrilamida (Ono *et. al.*, 2003; Peng *et. al.*, 2003).

O uso de análogos estruturais foi proposto inicialmente por diversos autores em particular a N,N-dimetilacrilamida (Tareke *et. al.*, 2000 e 2002), a metacrilamida (Biedermann *et. al.*, 2002a; Taubert *et. al.*, 2004), a propionamida (Biedermann *et. al.*, 2002a; Ciesarová *et. al.*, 2004) e a butiramida (Biedermann *et. al.*, 2002a). Kim *et. al.* (2007) usaram $^2\text{H}_5$ -3-cloropropanodiol como padrão de recuperação.

Al-Dmoor *et. al.* (2004) quantificaram a acrilamida por GC-MS pelo método do padrão externo.

5.3.2- Análise da acrilamida por GC-MS

5.3.2.1- GC-MS com derivatização da acrilamida

Apesar da acrilamida poder ser analisada na sua forma original, quando se usa GC-MS a molécula é normalmente bromada para formar a 2,3-dibromopropionamida que apresenta melhores propriedades cromatográficas (Figura 5.1).

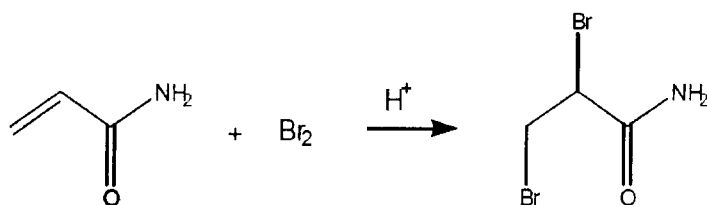


Figura 5.1- Reacção de derivatização da acrilamida a 2,3-dibromopropionamida

As principais vantagens da derivatização da acrilamida é que se forma um composto relativamente mais volátil, menos polar e com maior massa molecular, logo com melhor comportamento cromatográfico e mais facilmente detectável por espectrometria de massa (devido à maior massa dos fragmentos formados). O aumento de selectividade assim alcançado compensa o facto de se tratar de um processo demorado. Outra vantagem tem a ver com o facto de o derivado formado poder ser extraído no final com um solvente orgânico o que permite a obtenção de extractos finais isentos de compostos polares, geralmente presentes em grande quantidade no extracto aquoso: açúcares, proteínas, aminoácidos, etc. O derivado bromado é identificado pelo seu tempo de retenção e pela razão de iões de massa característicos.

Na prática, o processo de derivatização consiste na adição ao extracto aquoso de brometo de potássio (KBr), ácido brómico (HBr) e uma solução saturada de bromo (Br₂), deixando reagir pelo menos durante uma hora a 0 °C ou num banho de gelo (Hardas *et. al.*, 1999). O excesso de bromo é então removido pela adição de uma solução de tiosulfato de sódio até que a solução perca a cor avermelhada característica do bromo (Tareke *et. al.*, 2002; Ono *et. al.*, 2003; Ciesarová *et. al.*, 2004; Hamlet *et. al.*, 2004; Pittet *et. al.*, 2004; Williams, 2005). No European Workshop realizado em Oud-Turnhout na Bélgica foram divulgados estudos sobre a cinética da reacção de derivatização entre a acrilamida em relação à metacrilamida, inicialmente usada como padrão interno. Esta substância reage de uma forma muito mais lenta do que a acrilamida, o que faz com que a reacção de bromação seja muito demorada (De La Calle, 2003). O uso de análogos isotópicos como padrão interno permite a redução do tempo de reacção de uma noite para uma hora (Zhang, 2005a). Sob estas condições, o rendimento da reacção de derivatização é praticamente constante quando o tempo da reacção é superior a uma hora.

No final, o derivado bromado pode ser extraído da fase aquosa com acetato de etilo (Nemoto *et. al.*, 2002; Ono *et. al.*, 2003; Jezussek e Schieberle, 2003; Hamlet *et. al.*, 2004). Outros autores sugerem uma mistura de acetato de etilo e n-hexano na proporção de quatro para um (4:1) (Tareke *et. al.*, 2000 e 2002; Pittet, *et. al.*, 2004).

Andrawes *et. al.* (1987) mostraram que, sob certas condições, a 2,3-dibromopropionamida pode ser convertida, ao derivado mais estável 2-bromopropenamida por perda de HBr , no injetor do cromatógrafo ou directamente na coluna capilar. Como esta decomposição pode provocar uma diminuição da reprodutibilidade e precisão, alguns autores convertem deliberadamente a 2,3-dibromopropionamida a 2-bromopropenamida (Figura 5.2), antes da análise de GC o que pode ser conseguido pela adição de 10% de trietilamina ao extracto final antes da injeção no cromatógrafo (Nemoto, *et. al.*, 2002; Hamlet *et. al.*, 2004; Pittet *et. al.*, 2004). Esta conversão é praticamente instantânea à temperatura ambiente e é quantitativa e reprodutível (Andrawes *et. al.*, 1987).

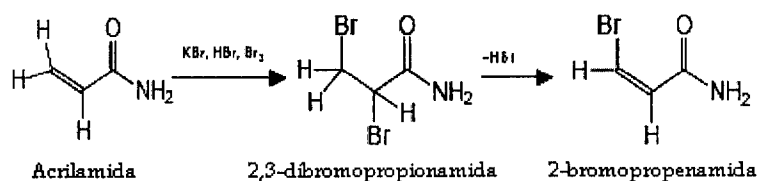


Figura 5.2- Reacção de conversão da acrilamida a 2,3-dibromopropionamida e de seguida a 2-bromopropenamida. (Adaptado de: Rothweiller *et. al.*, 2003)

Robarge *et. al.* (2003a e 2003b) converteram a 2,3-dibromopropionamida a 2-bromopropenamida *in situ*, a partir da decomposição térmica no injetor, usando amoníaco como gás reagente. Em qualquer caso, é necessário ter algum cuidado ao quantificar a acrilamida a partir deste derivado, uma vez que o mesmo origina o fragmento m/z 149 que está sujeito a interferências de ftalatos presentes nos materiais de empacotamento dos alimentos e são muitas vezes contaminantes em solventes (Rothweiler *et. al.*, 2003).

Outra técnica de bromação, sugerida por Nemoto *et. al.* (2002), baseia-se no uso

de brometo de potássio (KBr) e bromato de potássio ($KBrO_3$). Esta abordagem baseia-se no facto de a molécula de bromo se poder formar a partir de uma reacção de oxidação-redução entre o KBr e o $KBrO_3$ de maneira a eliminar a desvantagem de manipular bromo elementar. Apesar de ainda não se ter avaliado com rigor o rendimento da reacção trata-se, sem dúvida, de uma forma mais segura de realizar a operação de derivatização.

Na análise por GC-MS, os iões monitorizados para a identificação de 2,3-dibromopropionamida são: $[C_2H_3^{79}Br]^+=106$, $[C_2H_3^{81}Br]^+=108$, $[C_3H_5^{79}BrNO]^+=150$ e $[C_3H_5^{81}BrNO]^+=152$ usando-se o fragmento m/z 150 para a quantificação (Figura 5.3). Para o padrão interno derivatizado -2,3-dibromo($^{13}C_3$)propionamida- são monitorizados os iões $[^{13}C_2H_4^{81}Br]^+=110$, $[^{13}C_3H_5^{79}BrNO]^+=153$ e $[^{13}C_3H_5^{81}BrNO]^+=155$ (Tareke *et. al.*, 2002). No caso de se usar o padrão deuterado os iões a monitorizar são $[C_3^2H_3^{79}Br]^+=109$, $[C_2^2H_3^{81}Br]^+=111$, $[C_3H_2^2H_3^{79}BrNO]^+=153$ e $[C_3H_2^2H_3^{81}BrNO]^+=155$. Em ambos os casos usa-se o fragmento m/z 155 para a quantificação (Ono *et. al.*, 2003; Ciesarová *et. al.*, 2004).

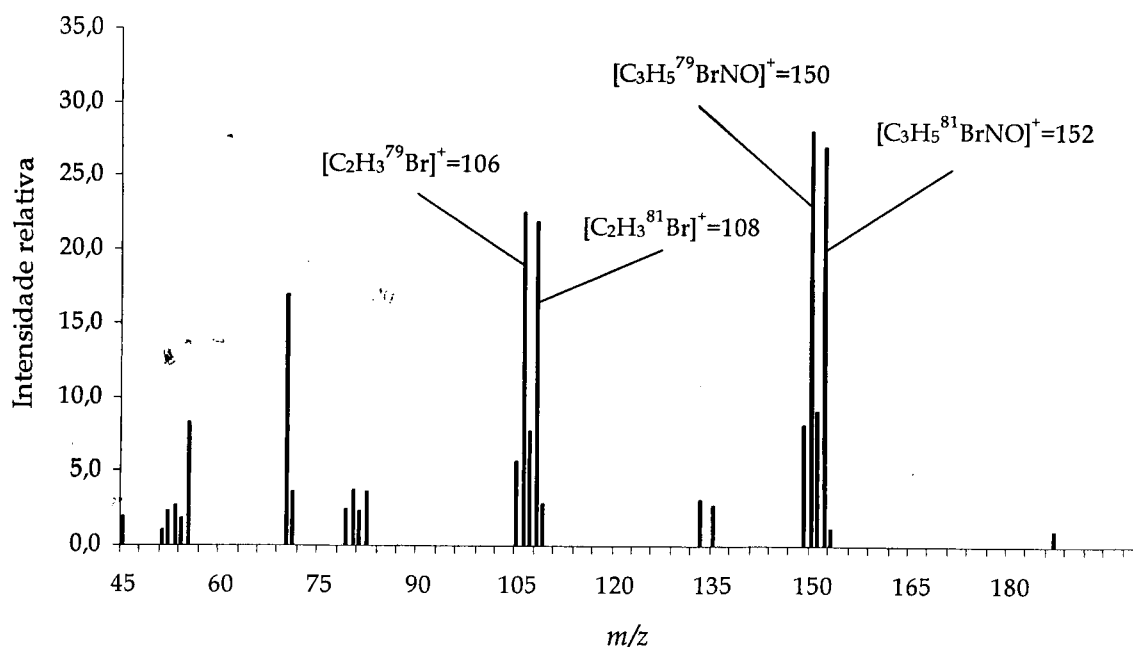


Figura 5.3- Espectro de massa do derivado bromado da acrilamida, 2,3-dibromopropionamida.

Com o padrão interno deuterado há a possibilidade de permuta entre o deutério e o hidrogénio durante a derivatização, o que diminui o rigor da análise. Por esse motivo é aconselhável usar acrilamida marcada com ^{13}C .

No caso da conversão a 2-bromopropenamida os iões a monitorizar são o $[\text{C}_3\text{H}_4\text{NO}]^+=70$, o $[\text{C}_3\text{H}_4^{79}\text{BrNO}]^+=149$ e o $[\text{C}_3\text{H}_4^{81}\text{BrNO}]^+=151$, usando o fragmento (m/z) 149 para a quantificação. Os iões monitorizados para a identificação do padrão interno, a 2-bromo($^{13}\text{C}_3$)propenamida, são $[\text{C}_3\text{H}_4^{81}\text{BrNO}]^+=151$, e o $[\text{C}_3\text{H}_4^{81}\text{BrNO}]^+=154$, usando m/z 154 para a quantificação. Os autores que sugeriram a metacrilamida como padrão interno monitorizaram os iões m/z 120 e 122 (Ahn *et. al.*, 2002). De um modo geral os limites de detecção dos métodos que englobam a bromação da acrilamida variam entre 2 a 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dependendo da amostra e dos processos de purificação empregues.

Para além da bromação, foram propostos outros métodos de derivatização da acrilamida. Lagalante e Felter (2004) propuseram um método para a análise quantitativa da acrilamida baseada em microextração em fase sólida (SPME) e análise por GC-MS. Neste método, a acrilamida é sililada com N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) dando origem ao composto volátil N,O-bis(trimetilsilil)acrilamida (BTMSA) (Figura 5.4). Uma vez formado, o BTMSA é facilmente extraído do *headspace* com uma fibra de SPME de 100 μm de poli(dimetilsiloxano). O método foi aplicado a amostras de cereais mas segundo os autores, é necessário efectuar mais optimizações para possibilitar a sua aplicação a outras matrizes. O limite de detecção obtido foi de cerca de 0,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$.



Figura 5.4- Reacção de sililação da acrilamida a N,O-bis(trimetilsilil)acrilamida (BTMSA). (Adaptado de Lagalante e Felter, 2004)

Pérez e Osterman-Golkar (2003) desenvolveram um processo em que fazem a acrilamida reagir com a L-valina e derivatizam o produto formado com isotiocianato de pentafluorofenilo (PFPITC) para formar pentafluorofeniltio-hidantoína (PFPTH) (Figura

5.5). Este derivado é extraído com éter dietílico e depois com tolueno e analisado por GC-MS-MS.

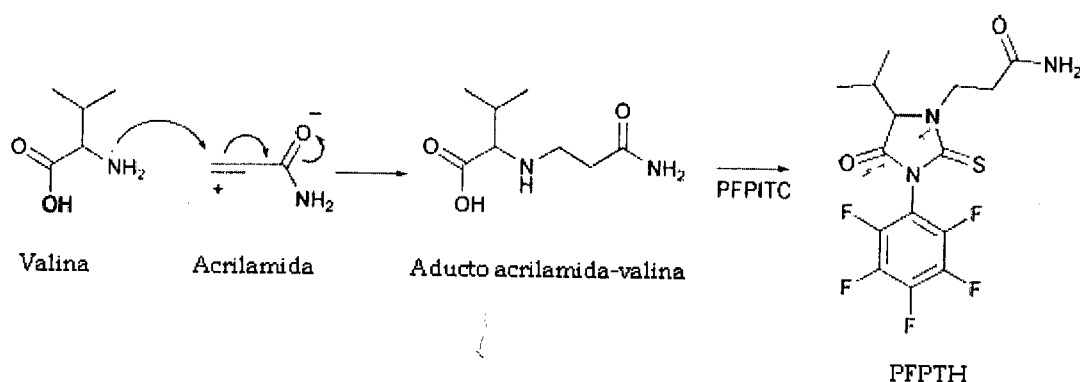


Figura 5.5- Reacção de formação dos aductos de acrilamida-valina (Adaptado de: Pérez e Osterman-Golkar, 2003)

Os iões monitorizados são os m/z 303, 304 e 319 para o analito e o 306, 307 e 322 para o padrão interno ($^2\text{H}_3$ -AA). Este método foi aplicado a água da torneira, café (infusão) e tabaco em pó (rapé). Concluíram que o método dá bons resultados e que o limite de detecção da acrilamida em água é cerca de 10 vezes menor do que no processo em que se derivatiza a amostra com bromo. No entanto, os autores afirmam que é necessário efectuar mais ensaios para validar este método na análise de acrilamida noutras matrizes alimentares.

A análise dos derivados da acrilamida por GC/MS, é sempre efectuada em colunas capilares de polaridade média a alta com um comprimento de 30 metros e um diâmetro interno de 0,25 mm (padrão para GC/MS). Injecta-se entre 1 a 2 μL de amostra em modo *splitless*. A temperatura inicial do forno varia entre 60-85 $^{\circ}\text{C}$ e em muitos casos, a rampa de aquecimento é de 15 $^{\circ}\text{C}$ por minuto. A temperatura final do forno é geralmente igual ou superior a 250 $^{\circ}\text{C}$.

5.3.2.2- GC-MS sem derivatização da acrilamida

Apesar de na maioria dos trabalhos efectuados em GC/MS ser usada a derivatização da acrilamida, alguns autores propõem a sua análise directa por GC/MS (SWISS, 2002; Jezussek e Schieberle, 2003; Ellenberg *et. al.*, 2004; Hoenicke *et. al.*, 2004;

Amrein *et. al.*, 2005). Graças à alta polaridade da acrilamida, são usadas colunas com fases polares, como por exemplo polietilenoglicol. O maior problema da análise de GC sem derivatização é a falta de picos característicos no espectro de massa da acrilamida não derivatizada. Os principais fragmentos são os iões de m/z 55 e 72. Estes iões também são usados para a quantificação. Substâncias com tempos de retenção próximos da acrilamida, como o maltol ou o ácido heptanóico produzem também praticamente os mesmos iões e podem, por isso, interferir na quantificação (Biedermann *et. al.*, 2002a).

A análise da acrilamida por GC-MS sem derivatização da amostra apresenta limites de detecção entre os 4 e os 20 $\mu\text{g/kg}$.

5.3.3- Análise da acrilamida por LC-MS/MS

5.3.3.1- LC-MS/MS sem derivatização

A utilização da técnica de LC-MS/MS na análise da acrilamida apresenta alta sensibilidade e torna possível evitar o passo da derivatização.

Para a separação cromatográfica da acrilamida, a generalidade dos autores propuseram a cromatografia em fase reversa com colunas de C_{18} (Rufián-Henares e Morales, 2006). A maior dificuldade reside na escolha da fase móvel apropriada para obter uma separação adequada do composto, com um tempo de retenção razoável, devido à alta polaridade da acrilamida.

A técnica LC-MS/MS apresenta uma grande selectividade, essencialmente em modo MRM (Multiple Reaction Monitoring). Neste modo, o ião precursor obtido no primeiro quadrúpolo é fragmentado num segundo quadrúpolo e monitorizado num terceiro (Figura 5.6).

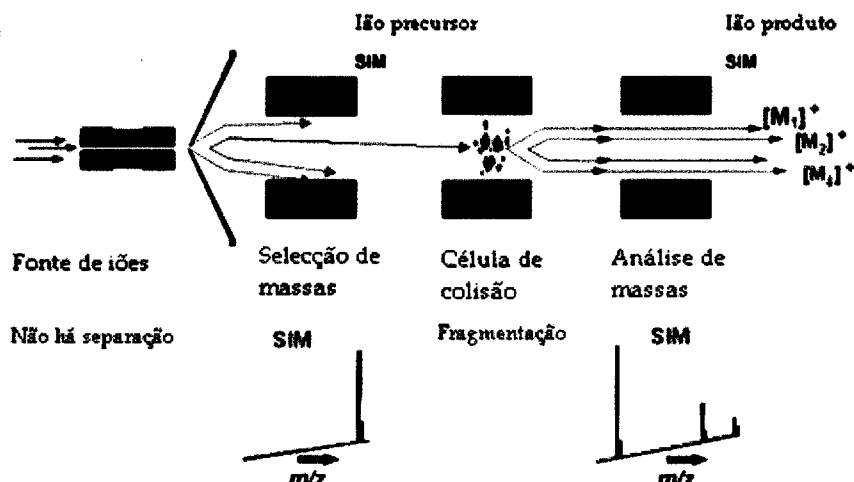


Figura 5.6- Esquema das reacções múltiplas que ocorrem no interior do LC-MS/MS. (Adaptado de: <http://www.chem.agilent.com>)

Os iões monitorizados durante a análise da acrilamida por LC-MS/MS são o $[CH_2=CHC=O]^+ = 55$ e $[CH_2=CHC=NH]^+ = 54$, gerados por colisão com o árgon no segundo quadrúpolo a partir do fragmento de m/z ($[CH_2=CHCONH_2]^+ = 72$ gerado no primeiro quadrúpolo.

A transição $72 > 55$ é sempre seleccionada para a quantificação porque apresenta uma abundância relativa elevada (Ahn *et. al.*, 2002; Rosén e Hellenas, 2002; Hoenicke *et. al.*, 2004; Murkovic, 2004). Em alguns casos têm sido usadas outras transições como $72 > 54$, $72 > 44$ e $72 > 27$, para confirmar a presença de acrilamida (Becalski *et. al.*, 2003; Konings, *et. al.*, 2003; Leung *et. al.*, 2003; Delatour *et. al.*, 2004; Granby e Fagt, 2004; Zhang *et. al.*, 2005b; Nielsen *et. al.*, 2006). Para a detecção dos isótopos de acrilamida usados como padrão interno, as transições monitorizadas são $75 > 58$ no caso da $[^2H_3]$ -acrilamida e $[^{13}C_3]$ -acrilamida (Ono *et. al.*, 2003; Kim *et. al.*, 2007) e $73 > 56$ para a $[^{13}C_1]$ -acrilamida (Zhang *et. al.*, 2005a). Petersson *et. al.* (2006) usaram a razão dos iões 55/58 para quantificar a acrilamida.

Apesar da alta selectividade oferecida pelo modo MS/MS permitir uma boa separação dos analitos, podem, inevitavelmente, ocorrer interferências especialmente nos casos em que a matriz analisada é muito complexa (Becalski *et. al.*, 2003). Estes autores, observaram picos com tempos de retenção idênticos ao da acrilamida e da acrilamida deuterada. Uma abordagem prometedora é re-extrair a acrilamida do extracto aquoso

obtido a partir da amostra, com um solvente orgânico de características polares, tal como o acetato de etilo. Desta forma podem remover-se constituintes interferentes tais como sais, açúcares, amidos, aminoácidos, etc, que permanecem preferencialmente na fase aquosa. O extracto obtido pode ser concentrado e analisado por LC-MS/MS (Hoenicke *et. al.*, 2004; Claus *et. al.*, 2005; Jiao *et. al.*, 2005; Zhang *et. al.*, 2005b). Becalski *et. al.* (2003) também referiram a presença de um composto interferente quando a transição 72>55 foi usada para a detecção da acrilamida. Estes autores propuseram o uso de colunas analíticas com maior comprimento (150 mm) e a realização de um passo adicional de purificação com sorbentes de fase-mista para evitar esta interferência.

Cavalli *et. al.* (2004) usaram uma coluna de troca iónica (aniónica e catiónica) em vez de uma coluna apolar (fase reversa) para separar a acrilamida de água potável, de forma a utilizar os múltiplos mecanismos de retenção oferecidos por este tipo de colunas para separar a acrilamida de potenciais interferentes.

De um modo geral, os métodos baseados em LC-MS/MS são muito sensíveis e aplicáveis a todo o tipo de amostras, apresentando limites de detecção inferiores a 10 µg/kg de acrilamida.

5.3.3.2- LC-MS/MS com derivatização

Jezussek e Schieberle (2003) desenvolveram um método de LC-MS/MS para a quantificação da acrilamida baseado na derivatização com ácido mercaptobenzóico. Aplicaram este método na análise de diversos produtos à base de cereais e obtiveram um limite de detecção de 6,6 µg/kg. Os resultados obtidos são prometedores mas, os autores, consideram que ainda é necessário aplicar a metodologia proposta a amostras mais complexas como café e chocolate.

5.3.4- Outras técnicas analíticas usadas na determinação da acrilamida

Para além das técnicas hifenadas atrás mencionadas, alguns investigadores descreveram diferentes métodos analíticos para a determinação da acrilamida usando

as técnicas de HPLC e GC acopladas a outros sistemas de detecção.

No método oficial da EPA, a acrilamida é quantificada em águas residuais, por GC/ECD (Electron Capture Detection) (US EPA, 1996). Apesar de não se usar SPE durante o pré-tratamento da amostra, os autores não fazem qualquer referência a sobreposição entre os picos de interferentes e do derivado bromado da acrilamida. Pedersen e Olsson (2003) desenvolveram um método para analisar acrilamida por GC/FID (Flame Ionization Detection) em amostras de batatas fritas.

A aplicação de PTR-MS (Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry) para avaliar a formação de acrilamida *online* foi efectuada por Polien *et. al.* (2003) em matrizes alimentares reais, usando batatas termicamente tratadas. Esta técnica é normalmente usada para analisar compostos aromáticos voláteis formados durante a reacção de Maillard (Taeymans *et. al.*, 2004).

No método 8316 da US EPA (2004) é utilizada a espectroscopia de UV para detectar a acrilamida em águas residuais. A Dionex (2003) desenvolveu um método de extracção da acrilamida por ASE (Accelerated Solvent Extraction) seguida de cromatografia iónica com detecção UV ou MS. Paleólogos e Kontominas (2005) publicaram um método de análise da acrilamida por HPLC com detecção UV a 202 nm. Segundo os autores, o limite de detecção obtido foi de 10 µg/L em vários tipos de amostras alimentares.

Bermudo *et. al.* (2006a) apresentaram um método no qual analisam a acrilamida por electroforese capilar após derivatização com ácido mercaptobenzóico. Em 2004, este mesmo grupo tinha publicado um trabalho em que a acrilamida era analisada por cromatografia electrocinética de microemulsão. Ambos os métodos foram aplicados a diferentes amostras alimentares (cereais e batatas), mas não é feita referência à sua validação neste tipo de matrizes. Os limites de detecção obtidos são, para a análise por electroforese capilar, de 0,07 µg/mL e de 0,7 µg/mL para a análise com cromatografia electrocinética de emulsão.

5.3.5- Métodos oficiais validados para a determinação da acrilamida

Durante os últimos anos, numerosos métodos têm sido desenvolvidos para determinar o monómero acrilamida em diferentes matrizes alimentares. Para além dos métodos analíticos divulgados pelos jornais científicos, muitas instituições oficiais, departamentos governamentais e universidades publicaram os seus métodos completos, e devidamente validados. Alguns exemplos são o método da Food Standards Agency (FSA, 2002) baseado em GC-MS e LC-MS/MS, o método do Swiss Federal Office of Public Health (SWISS, 2002) baseado em GC-MS e o método desenvolvido pelo Centro para a Segurança Alimentar e Nutrição Aplicada da US FDA (Food and Drug Administration, 2003), que se baseia em LC-MS/MS.



PARTE EXPERIMENTAL



Capítulo 6 - AMOSTRAS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS

6.1- Amostras

Neste trabalho foram analisadas 24 amostras de café torrado em grão e 9 amostras de derivados solúveis de café, apresentadas na Tabela 6.1.

Tabela 6.1-Amostras de café e sucedâneos de café analisadas neste trabalho

<i>Amostra</i>	<i>Tipo de amostra</i>	<i>Nº de amostras</i>
Café torrado em grão	Mistura Aráb + Rob (30:70)	15
	Mistura Aráb + Rob (5:95)	4
	Aráb (100)	1
	Descafeinado	2
	Torrefacto	1
	Mistura torrado + torrefacto (70:30)	1
Café solúvel	Clássico	3
	Descafeinado	2
Sucedâneos de café	Mistura cereais torrados (chicória, cevada e centeio) + café (80:20)	2
	Mistura cereais torrados (chicória, cevada e centeio) (100)	1
	Cappuccino: mistura solúvel de café, leite, açúcar e chocolate.	1
	Total	33

Aráb- Arábica; Rob- Robusta

Foram também analisadas trinta e três amostras de batatas fritas de pacote, que se podem dividir em três grupos de acordo com o formato: 1) fatias muito finas lisas, 2) fatias muito finas onduladas, 3) palitos muito finos, e duas amostras de chocolate: 1) chocolate negro, 2) chocolate de leite.

As diversas amostras foram adquiridas em supermercados, tendo sido escolhidas marcas de consumo corrente.

6.2- Reagentes

Para a preparação das soluções usadas ao longo do trabalho, utilizaram-se reagentes e solventes com o maior grau de pureza comercialmente disponível, apresentados na Tabela 6.2.

Tabela 6.2- Reagentes usados na execução prática do trabalho

Reagentes	Características / Grau de pureza	Fornecedor
Acrilamida*	99%	Aldrich (Steinheim, Alemanha)
Acrilamida 1,2,3- ¹³ C ₃	99% em metanol (1 mg/mL)	Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, EUA)
n-Hexano	Para análise de resíduos	Fluka (Buchs, Suíça)
Acetato de etilo		
Metanol	Ultrapuro	
Acetonitrilo		
Acetona		
Brometo de potássio	Para espectroscopia de IV, calcinado a 450 °C	Merck (Darmstad, Alemanha)
Bromo	Pro analisis	
Cloreto de sódio	Pro analisis	J.T. Baker (Deventer, Holanda)
Hexacianoferrato de potássio tri-hidratado	Pro analisis	Panreac (Barcelona, Espanha)
Sulfato de zinco hepta-hidratado		
Ácido acético glacial		
Etanol absoluto		
Sulfato de sódio anidro	Para análise, calcinado a 450 °C	
Ácido hidrobromico	Para análise	Riedel-de Häen (Seelze, Alemanha)
Tiosulfato de sódio	Solução volumétrica 1 mol/L	
Água ultrapura	Desionizada num sistema Seralpur Pro 90 CN	Belgolabo (Overijse, Bélgica)
Água destilada	Sistema interno	

6.2.1- Material para a Extração em Fase Sólida (SPE)

Usou-se neste trabalho, sorbente C_{18} com partículas de diâmetro entre 55 a 105 μm , da marca Waters (Milford, EUA) na preparação de colunas de SPE.

As colunas de SPE, adquiridas pré-condicionadas, usadas na purificação das soluções, estão agrupadas na Tabela 6.3.

Tabela 6.3- Colunas de SPE

<i>Coluna de SPE</i>	<i>Quantidade</i>	<i>Fornecedor</i>
Isolute Multimode	300 mg	International Sorbent Technology (Hengoed, Mid Glamorgan, Reino Unido)
	500 mg	
	1 g	
	3 g (por encomenda)	
Florisil	1 g	Varian (Palo Alto, CA, EUA)

6.2.2- Gases

Como gás de arrastamento nos processos de cromatografia gasosa usou-se hélio do tipo N60, que corresponde ao mais alto grau de pureza daquele gás que se encontra comercialmente disponível: 99,9999%. Para a evaporação das amostras usou-se azoto N55, com um grau de pureza de 99,9995%. Ambos os gases foram fornecidos pela Ar-Líquido (Maia, Portugal).

6.3- Equipamento

6.3.1- Sistema de GC-MS

Na execução deste trabalho usou-se um aparelho de GC-MS da marca Hewlett-Packard (HP, Palo Alto, CA, EUA), modelo HP GC-6890, equipado com um injetor do tipo *split-splitless* e com um sistema electrónico de controlo de fluxo gasoso e associado

a um detector selectivo de massa, modelo Agilent MSD-5973N (Agilent, Palo Alto, CA, USA). O injector estava equipado com um septo pré-furado de 9 mm de diâmetro, um *liner* de 4 mm de diâmetro e 8 cm de comprimento, com uma constrição em cada uma das extremidades, e um divisor de fluxo revestido por um banho de ouro; as três peças - septo, *liner* e divisor de fluxo - foram substituídas após cada série de injecções - padrões mais amostras em duplicado - o que em regra correspondeu a cerca de 30-40 injecções. A ligação do cromatógrafo de gases ao detector de massa era feita através de uma interface directa sujeita a aquecimento, a 280 °C, no interior da qual era colocada a extremidade da coluna cromatográfica. O controlo do aparelho era assegurado por um sistema de controlo, aquisição e tratamento de dados fornecido pela Agilent - MS Chemstation G2578A - instalado num computador HP Kayak XM 600 PC.

A calibração do detector foi feita de forma automatizada com recurso à perfluorotributilamina, tendo a tensão do multiplicador de electrões sido ajustada para um valor superior em 200 V ao valor obtido no processo. Todos os cromatogramas foram obtidos por impacto electrónico a 70 eV. Outras condições relevantes usadas na obtenção dos cromatogramas, designadamente as massas seleccionadas no processo de monitorização selectiva de iões e os parâmetros mais relevantes em cromatografia gasosa (temperaturas, fluxos, etc.), serão considerados em pormenor aquando da abordagem das metodologias desenvolvidas.

A separação analítica foi efectuada numa coluna capilar de polaridade intermédia DB 1301 (30 m x 0,25 µm, 0,25 mm diâmetro interno) da J&W Scientific (Folsom, CA, EUA).

6.3.2- Outra aparelhagem

As centrifugações foram realizadas numa ultra-centrífuga da marca Eppendorf (Hamburgo, Alemanha) modelo 5810 R e numa centrífuga da marca Heraeus Sepatek, (Osterode, Alemanha), modelo Labofuge Ae.

As extracções por SPE foram feitas num sistema de aspiração a vácuo modelo Visiprep Solid Phase Extraction Manifold da Supelco (Taufkirchen, Alemanha), com

capacidade para 12 colunas.

A evaporação dos solventes foi efectuada num evaporador rotativo da marca Büchi (Flawil, Suíça), modelo Rotavapor RE 111 equipado com um banho de água modelo 461. A evaporação em corrente de azoto foi executada num aparelho da marca Pierce (Rockford, IL, EUA), modelo Reacti-Therm 18790 com capacidade para 9 tubos de vidro.

As pesagens foram realizadas numa balança de precisão da marca Mettler Toledo (Greifensee, Suíça) modelo AG 204 e numa balança analítica da marca Sartorius (Goettingen, Alemanha) modelo PT 310.

Para a limpeza das seringas (feita no final de cada injeção) usou-se um sistema de aquecimento por resistência eléctrica com funcionamento a pressão reduzida, da marca Hamilton Company (Reno, NB, EUA).

As pipetas usadas ao longo do trabalho foram da marca Jencons (East Grinstead, West Sussex, Reino Unido), modelo Sealpette, com capacidades de 1-5 mL, 100-1000 µL e 20-200 µL, tendo-se usado pontas descartáveis da mesma marca.

A homogeneização das amostras foi efectuada com um triturador Ultra-Turrax modelo T25 da marca Janke e Kunkel Labortechnik (Staufen, Alemanha).

As purificações a altas temperaturas foram realizadas numa mufla da marca Thermolyne (Ottawa, ON, Canadá), modelo 48000 Furnace, programada para 450 °C.

Os grãos de café torrados foram moídos num moinho de café incorporado numa máquina de café Philips (Algés, Portugal), modelo Espresso Professional seleccionado para moagem fina.

As restantes amostras foram pulverizados numa picadora da marca Moulinex (Ecully, França).

6.3.3- Consumíveis

As etapas iniciais da preparação das amostras foram realizadas em tubos de Teflon® FEP (Fluorinated Ethylene Propylene resin) de fundo redondo, próprios para centrífugas com 50 mL de capacidade, da marca Oak Ridge (Nova Iorque, EUA) e em

tubos Falcon em polipropileno, também próprios para centrífugas, da marca BD Bioscience (Madrid, Espanha).

As reacções de derivatização e posteriores evaporações foram efectuadas em frascos de vidro silanizado de 40, 22 e 4 mL, com tampas em polifenol, internamente revestidas com Teflon®, da marca Supelco (Bellefonte, PA, EUA).

As filtrações foram efectuadas através de reservatórios de 25 mL com filtros de polietileno com poros de 10 μm da marca Symta (Madrid, Espanha). Estes mesmos reservatórios também foram usados para preparar colunas de SPE com o sorbente C_{18} .

Para a injeção no sistema cromatográfico usaram-se seringas da marca Hamilton (Bonaduz, Suíça) de 10 μL de volume total, com uma agulha de 7 cm de comprimento e ponta em bisel.

No sistema de injeção do aparelho de GC-MS usaram-se septos pré-furados da Supelco, modelo Thermogreen LB-2. Todos os restantes consumíveis do aparelho de GC-MS foram da marca HP/Agilent.

Capítulo 7 - PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

7.1- Preparação das soluções reagentes

7.1.1- Preparação das soluções de padrões

Preparou-se uma solução-mãe de acrilamida com a concentração de 2 g/L, por dissolução do composto em acetonitrilo. Diluiu-se esta solução para preparar uma solução de trabalho com uma concentração de 4 mg/L.

A solução-mãe de $^{13}\text{C}_3$ -acrilamida foi adquirida já preparada com uma concentração de 1 mg/mL em metanol. Preparou-se uma solução de trabalho de padrão interno com uma concentração de 40 mg/L, por diluição da solução-mãe.

Todas as soluções foram guardadas a 4 °C.

7.1.2- Preparação das soluções de Carrez

As soluções de Carrez I e II foram preparadas por dissolução de 15 g de hexacianoferrato de potássio (II) em 100 mL de água (150 g/L) e 30 g de sulfato de zinco heptahidratado em 100 mL de água (300 g/L), respectivamente.

7.1.3- Preparação da solução saturada de bromo

Preparou-se a solução saturada de bromo por adição de 3 mL de bromo a 200 mL de água mantendo uma agitação constante. De maneira a que a solução se mantivesse saturada, periodicamente era adicionada uma pequena quantidade de bromo.

7.2- Preparação das amostras: batatas fritas e chocolate

Trituraram-se cerca de 5 g de cada uma das amostras de batatas fritas num almofariz tendo o cuidado de incluir pedaços com diferentes características: coloração

mais ou menos escura, pedaços queimados, etc. Os chocolates foram colocados a cerca de 4 °C durante uma hora e pulverizados numa picadora eléctrica.

7.2.1- Extracção da acrilamida das batatas fritas e do chocolate

Pesaram-se dois gramas de amostra previamente pulverizada para um tubo de centrífuga de 50 mL e adicionaram-se 20,0 mL de água ultra-pura. A solução resultante foi homogeneizada no Ultra-turrax durante 30 segundos. Adicionou-se 1 µg de padrão interno (25 µL da solução de $^{13}\text{C}_3\text{-AA}$ a 40 mg/L) e a solução foi colocada em banho de água a 65 °C durante 15 minutos. Acidificou-se com ácido acético glacial (0,1-0,2 mL) até pH 4-5 e adicionou-se 1+1 mL das soluções de Carrez I e II. Deixou-se repousar por 15 minutos. Centrifugou-se a 15000 g (15 minutos, 4 °C) e colocou-se a amostra a -20 °C durante 10-15 minutos. O sobrenadante aquoso foi filtrado para um frasco de vidro silanizado de 40 mL por um filtro de polietileno de 10 µm. Repetiu-se o processo de extracção com mais 10 mL de água e centrifugou-se de novo, filtrando-se o sobrenadante pelo mesmo conjunto funil/filtro. Juntaram-se as duas fases aquosas. O volume do sobrenadante foi reduzido a 8-10 mL no evaporador rotativo, a 65 °C, durante 4-5 minutos, e transferiu-se o extracto líquido para os frascos de vidro de 40 mL, tendo o cuidado de lavar o balão do evaporador com 5-6 mL de água.

7.2.2- Processo de derivatização das amostras

Ao extracto aquoso resultante do processo anterior, adicionou-se 1 g de brometo de potássio calcinado (KBr). Acidificou-se a solução com ácido hidrobromico (HBr) até pH 1-3 (100-150 µL) e adicionaram-se 2 mL de solução saturada de bromo. Colocou-se a solução num banho de gelo ao abrigo da luz, durante pelo menos 1 h. Em seguida, o excesso de bromo foi eliminado e a reacção travada pela adição de solução de tiosulfato de sódio 1 M até ao desaparecimento da cor amarela do bromo (50-150 µL). Saturou-se o extracto com 4 g de cloreto de sódio (NaCl) e extraiu-se com duas porções de 10 mL e 5 mL de acetato de etilo/n-hexano 4:1 (v/v). O volume da fase orgânica foi

reduzido a 3 mL numa corrente de azoto a 55 °C e adicionou-se uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). Finalmente, a solução foi centrifugada a 3000 rpm durante 3 minutos, transferida para um frasco de vidro de 4 mL e evaporada a 0,5 mL sob a corrente de azoto. 1 µL de solução foi finalmente injectado no cromatógrafo gasoso.

7.2.3- Preparação das soluções de calibração

Retiraram-se alíquotas da solução padrão de acrilamida (4 mg/L) equivalentes a 0,0, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0 a 3,0 µg de acrilamida, e colocaram-se nos tubos de centrifuga de 50 mL. Adicionou-se 1 µg de padrão interno (25 µL da solução de $^{13}\text{C}_3$ -AA a 40 mg/L) e completou-se o volume com 20 mL de água. Submeteram-se então as soluções a todo o processo descrito nos pontos 7.2.1 e 7.2.2.

7.3- Preparação das amostras: café e derivados.

Os cafés “expresso” foram preparados em duplicado na máquina de café “expresso” da Philips da seguinte forma: extraíram-se 7 g de café moído (no moinho da máquina) com água quente durante 30 ± 5 s (cerca de 30 a 35 mL de água) a uma pressão de 9 ± 2 bar.

O café solúvel e os outros sucedâneos de café foram preparados por dissolução de 2 g de produto em 10 mL de água desionizada. Pesaram-se 2 g de café torrado e moído para um frasco de centrifuga com 10 mL de água e colocou-se a 65 °C durante 15 minutos.

7.3.1- Extração da acrilamida das amostras de café e derivados

A 10 mL de café “expresso” ou de outro derivado adicionou-se 15 mL de etanol absoluto e agitou-se a solução durante aproximadamente 1 minuto num tubo Falcon de

50 mL. Juntou-se 1 µg de padrão interno (25 µL da solução de $^{13}\text{C}_3\text{-AA}$ a 40 mg/L), e a solução foi agitada de novo e colocada a -20 °C durante 15 minutos. Centrifugou-se a 15000 g (5 minutos, 4 °C) e o sobrenadante foi transferido para um tubo de centrifuga. Acidificou-se a suspensão com ácido acético glacial (0,1-0,2 mL) até pH 4-5. Adicionou-se 1 mL das soluções de Carrez I e II, agitou-se a solução e deixou-se actuar por 15 minutos a 4 °C. Centrifugou-se de novo a 15000 g (15 minutos, 4 °C) e filtrou-se o sobrenadante para um frasco de vidro silanizado de 40 mL por um filtro de polietileno de 10 µm. O volume da solução foi reduzido a 2-3 mL no evaporador rotativo, a 55 °C, e transferido para um frasco de vidro de 22 mL. O balão do evaporador foi lavado com 2 mL de água, que foi adicionada à solução. Quando necessário, efectuou-se uma centrifugação a 3000 g para eliminar sólidos em suspensão antes da purificação por SPE.

7.3.2- Processo de purificação das amostras de café

Preparou-se uma coluna combinada por adição de 1 g de C_{18} e uma membrana de polietileno a uma coluna original de 3 g de Isolute de fase mista. A coluna foi condicionada com 20 mL de metanol seguidos de 20 mL de água. O extracto ($\pm 5\text{mL}$) foi percolado através da coluna combinada para um frasco de 40 mL, rejeitando-se os primeiros 2 mL que eluíram. Lavou-se a coluna com 10 mL de água que se juntou ao extracto recolhido no tubo de 40 mL.

No caso dos cafés solúveis, procedeu-se previamente a uma purificação adicional com uma coluna de 3 g de C_{18} . Os primeiros 2 mL eluidos foram rejeitados e a coluna lavada com 1 mL de água. A solução recolhida foi de seguida purificada na coluna combinada do modo descrito anteriormente.

7.3.3- Processo de derivatização das amostras

A derivatização das amostras foi executada de acordo com o descrito no ponto 7.2.2.

7.4.4- Preparação das soluções de calibração

As soluções de calibração foram preparadas da forma descrita no ponto 7.2.3. Estas soluções foram submetidas a todo o processo descrito nos pontos 7.4.1, 7.4.2 e 7.4.3.

7.4- Condições operatórias do GC-MS

7.4.1- Cromatógrafo gasoso

Gás de arrastamento: hélio com um fluxo constante de 1 mL/min. Volume de injeção de amostra: 1 μ L (*splitless*, pulso de pressão 32 psi, 60 s). Temperatura do injetor: 280 °C. Temperatura do forno: 85 °C (1 min), 15 °C/min até 280 °C, mantida durante 10 minutos (tempo total 24 min); linha de transferência: 280 °C.

7.4.2- Espectrómetro de massa

Energia electrónica: 70 eV (modo de impacto electrónico). Modo de aquisição: monitorização de iões seleccionados (SIM), m/z 106, 108, 150 e 152 para a 2,3-dibromopropionamida (2,3-DBPA) e m/z 110, 153, 155 para o 2,3- $^{13}\text{C}_3$ -dibromopropionamida (2,3- $^{13}\text{C}_3$ -DBPA). Os iões m/z 150 do 2,3-DBPA e m/z 155 do 2,3-DBPA ($^{13}\text{C}_3$) foram usados para a quantificação e os outros para confirmação da identidade do composto. A acrilamida foi determinada a partir da razão das áreas entre o ião m/z 150 da 2,3-DBPA e o ião m/z 155 da 2,3- $^{13}\text{C}_3$ -DBPA. A identidade do composto foi confirmada pelo tempo de retenção.

Capítulo 8 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1- Amostras de batatas fritas e de chocolate

8.1.1-Desenvolvimento do método analítico

O método analítico descrito para a análise de batatas fritas e chocolate foi desenvolvido no laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia com o objectivo de analisar acrilamida em produtos de grande consumo em Portugal (Fernandes *et. al.*, 2005). Este método dá origem nestas matrizes a extractos relativamente livres de interferentes, permitindo a correcta quantificação da acrilamida (Figura 8.1).

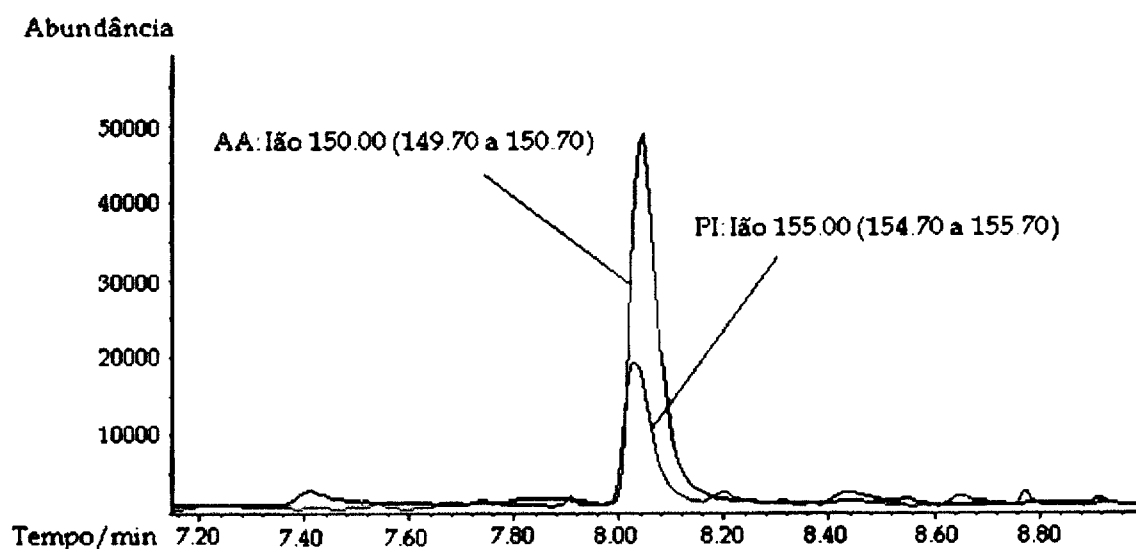


Figura 8.1- Cromatograma de uma amostra de batatas fritas com uma concentração de 1370 µg/kg de acrilamida (AA) e 500 µg/kg de padrão interno (PI).

A quantificação da acrilamida nestas amostras foi efectuada a partir de curvas de calibração para cuja construção se usaram soluções padrão de acrilamida preparadas com água e submetidas em simultâneo com as amostras à totalidade do método analítico descrito. Em regra, prepararam-se sete padrões sendo o intervalo de concentrações escolhido concordante com a quantidade de acrilamida esperada nas

amostras, tipicamente na ordem dos 0 - 1500 µg/kg de acrilamida. A quantidade de padrão interno adicionada correspondeu a 500 µg/kg para todas as amostras e padrões.

As curvas de calibração foram construídas a partir da razão das áreas do íon m/z 150 do derivado da acrilamida e do íon m/z 155 do derivado do padrão interno em função da concentração de padrão adicionado (Figura 8.2). Os coeficientes de correlação obtidos foram usualmente superiores a 0,997.

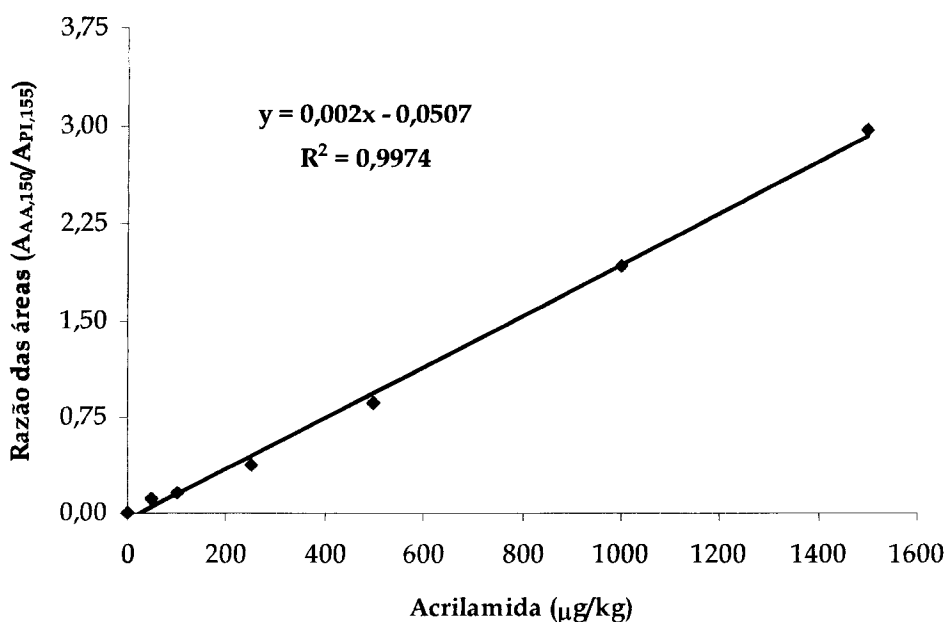


Figura 8.2- Curva de calibração usada na quantificação de acrilamida em batatas fritas

8.1.2- Resultados e discussão: amostras de batatas fritas

As amostras de batatas fritas analisadas foram divididas em 3 grupos distintos de acordo com o seu formato. Comercialmente as batatas de pacote são vendidas como batata “palha”, batata lisa e batata ondulada. Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 8.1.

Tabela 8.1- Concentração de acrilamida em batatas fritas com diversos formatos

<i>Amostras</i>	<i>Cor</i>	<i>Nº de amostras</i>	<i>AA µg/kg</i>	<i>AA µg/kg (média)</i>
Batata "palha"	Escuras	5	1048	1609
			1088	
			1856	
			1870	
			2185	
Lisas	Claras	12	494	714
			501	
			590	
			592	
			651	
			682	
			695	
			741	
			837	
			882	
			905	
			997	
	Com pedaços queimados	5	1190	1339
			1236	
			1328	
			1366	
			1577	
	Escuras	4	1064	1446
			1110	
			1312	
			2298	
Onduladas	Claras	2	593	931
			1268	
	Com pedaços queimados	3	926	1104
			1100	
			1286	
	Escuras	1	1386	1386
Total		33		

Escuras- castanho-claro; Claras- amarelo

Os resultados encontrados para as amostras de batatas são concordantes com os valores de outros autores que divulgaram resultados entre os 200 e os 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de acrilamida em produtos à base de batata fritas (Nemoto *et. al.*, 2002; Tareke *et. al.*, 2002; Ono *et. al.*, 2003).

O elevado teor de acrilamida neste tipo de produtos pode ser justificado pelo facto de a matéria-prima utilizada ser rica em açúcares redutores e em asparagina (ver Capítulo 3) e de o processamento ocorrer a 170 - 180 °C, precisamente aquelas a que corresponde a uma maior formação de substância (ver Capítulo 4).

Na Figura 8.3, os resultados obtidos neste trabalho estão organizados de acordo com o formato do corte das batatas e da coloração apresentada pelas batatas fritas analisadas.

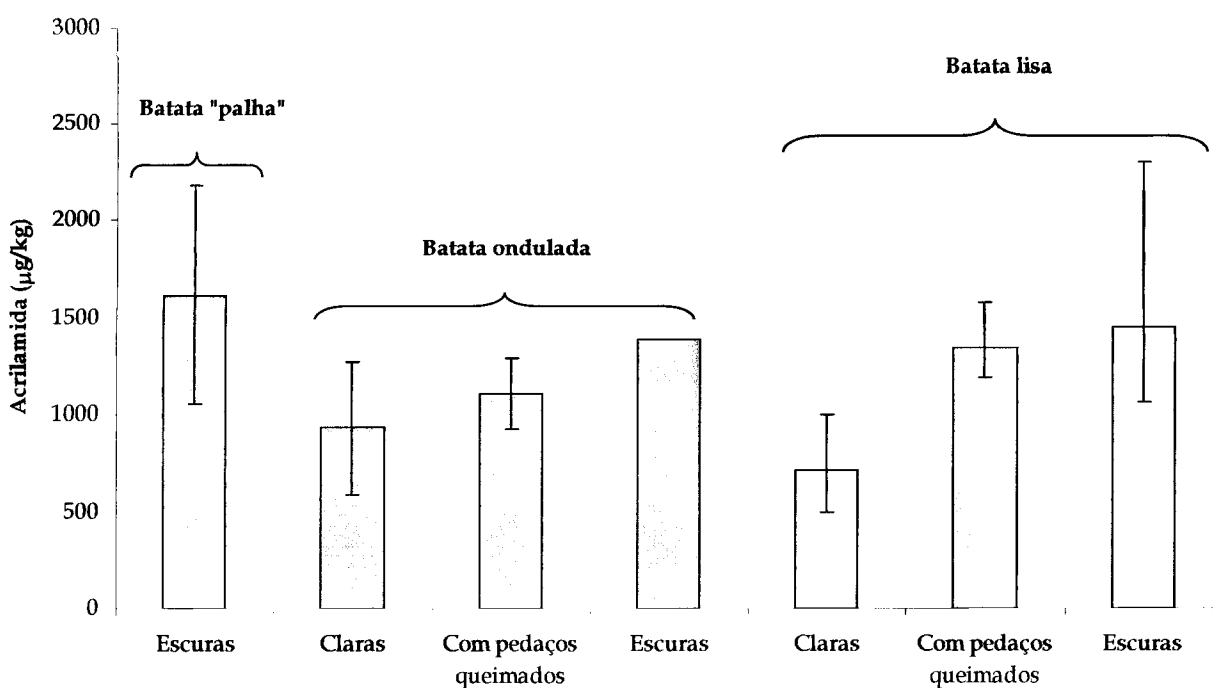


Figura 8.3- Concentração média de acrilamida em batatas fritas. Relação entre a cor e a forma das batatas com a quantidade de acrilamida

Como se pode verificar pela análise do gráfico anterior, as batatas fritas mais escuras apresentam, em regra, uma maior quantidade de acrilamida do que as batatas mais claras o que é consistente com os resultados da generalidade dos autores (Gertz e Klostermann, 2002; Taubert *et. al.*, 2004; Gökmen *et. al.*, 2006a; Pedreschi *et. al.*, 2005, 2006 e 2007). Este facto será resultado naturalmente do uso de tempos de fritura mais longos, mas também, muito provavelmente, do uso de matéria-prima (batatas cruas) rica em açúcares redutores, as quais originam sempre produtos mais escuros mesmo com temperaturas de fritura normais (Fiselier e Grob, 2005).

Quanto à forma das batatas, as batatas “palha” apresentam uma quantidade de acrilamida ligeiramente mais elevada, mas isso deve-se possivelmente ao facto de apresentarem uma cor relativamente mais escura do que os outros tipos de batata. As batatas lisas e as batatas onduladas não apresentam diferenças significativas em nenhum dos valores obtidos. Como as batatas palha, cortadas em palitos muito finos, apresentam uma maior área de exposição ao óleo quente (menor espessura e tamanho das porções), estão sujeitas a um processo de fritura muito mais rápido e eficaz, o que explica a cor mais acentuada e a maior quantidade de acrilamida encontrada.

8.1.3- Resultados e discussão: amostras de chocolate

As amostras de chocolate analisadas foram apenas duas, uma de chocolate negro e outra de chocolate de leite. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 8.2.

Tabela 8.2- Concentração de acrilamida em chocolates

Amostra	Nº de amostras	AA $\mu\text{g/kg}$
Chocolate de leite	1	48
Chocolate negro	1	91
Total	2	

A concentração de acrilamida encontrada nas duas amostras analisadas é da mesma ordem de grandeza dos resultados obtidos por Ren *et. al.* (2006) que

desenvolveram uma metodologia baseada em LC-MS específica para chocolate. Este autor analisou duas amostras de chocolate de leite, duas amostras de chocolate negro, uma amostra de chocolate oriental, uma de chocolate com amêndoas ou nozes, chocolate com trigo e barras de chocolate fortificadas, encontrando 23 a 126, 181 a 537, 100, 250, 279, 48 e 254 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de acrilamida, respectivamente. Delafour *et. al.* (2004) analisaram diversos tipos de chocolate: chocolate solúvel, cacau em pó e chocolate em barra com amêndoas e obtiveram 54, 180 e 94 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de acrilamida, respectivamente.

A quantidade de acrilamida encontrada não é muito elevada comparativamente às batatas fritas. Esta observação deve-se, possivelmente, ao facto dos grãos de cacau apresentarem uma quantidade de precursores muito inferior às batatas cruas (ver Capítulo 3).

Para além disso, a produção do chocolate em barra, aqui analisado e discutida no Capítulo 3, implica a mistura da massa de cacau, obtida a partir dos grãos de cacau torrados, com leite e manteiga para além de outros ingredientes (Tabela 3.4). A massa de cacau adicionada corresponde geralmente a menos de 50% da massa total de chocolate o que provoca um efeito de diluição dos compostos químicos presentes no cacau, incluindo a acrilamida. Nos casos do chocolate negro a massa de cacau adicionada é bastante mais elevada, cerca de 60%, sendo por isso de esperar uma maior quantidade de acrilamida nestes produtos.

8.2- Amostras de café e derivados

8.2.1-Desenvolvimento do método analítico

As dificuldades apresentadas na análise de acrilamida em matrizes complexas, como por exemplo café, foram amplamente descritas por diversos autores que usaram métodos com GC-MS, mas cujos resultados foram prejudicados pela presença de interferentes que eram co-extraídos com a acrilamida (Delatour *et. al.*, 2004; Andrzejewski *et. al.*, 2004). No nosso caso, a aplicação da metodologia descrita para as

batatas fritas na análise de acrilamida em cafés revelou problemas semelhantes aos descritos por aqueles autores. O extracto aquoso obtido a partir das amostras de café era fortemente corado o que provocava diversas dificuldades analíticas. O processo de derivatização, por exemplo, era dificultado uma vez que a coloração característica da solução aquosa de bromo ficava disfarçada. Outro problema que os nossos extractos apresentavam era a formação de uma grande quantidade de espuma durante a agitação, o que provocava a contaminação do equipamento e a formação de emulsões durante a extracção com solventes orgânicos. Também se verificou que uma parte dos compostos corados era solúvel nos solventes orgânicos o que dava origem a extractos finais de cor castanha. A análise destes extractos não permitia quantificar a acrilamida uma vez que se verificava uma grande sobreposição de interferentes. Na Figura 8.4 é apresentado, a título de exemplo, um cromatograma de um dos extractos aquosos de uma amostra de café submetido ao processo anterior. O insucesso deste método levou à introdução de alterações profundas no mesmo.

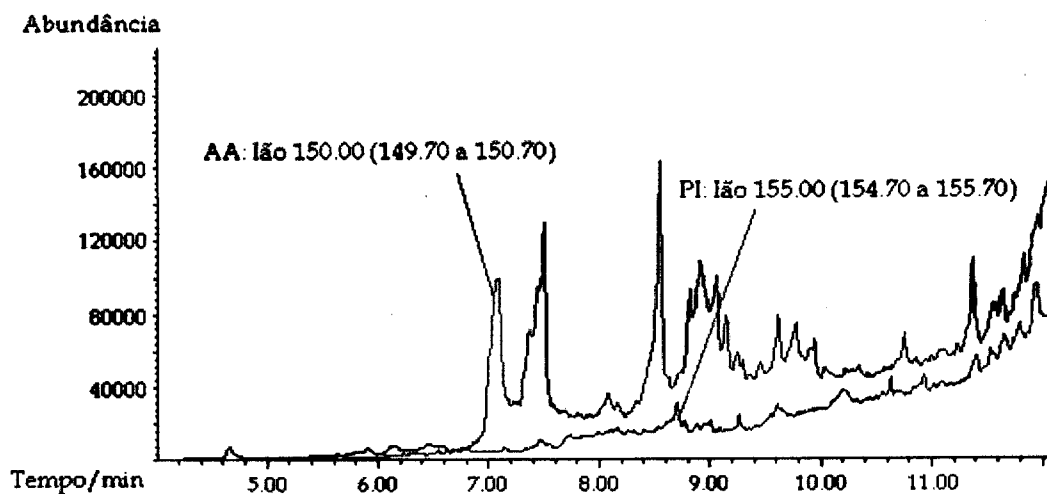


Figura 8.4- Cromatograma de uma amostra de café submetida ao processo de análise desenvolvido para quantificar acrilamida em batatas fritas. (AA- acrilamida; PI- padrão interno)

Um dos problemas já referidos na análise de café é a formação de um volume considerável de espuma durante a agitação o que provoca a contaminação dos equipamentos de trabalho e perdas significativas de amostra. O problema mostrou-se

particularmente grave durante o passo de evaporação da água uma vez que a espuma era facilmente projectada para o sistema de refrigeração do evaporador rotativo.

A formação de espuma neste tipo de matrizes é, no entanto, inevitável, uma vez que a sua presença é um dos parâmetros de qualidade de um bom “expresso”. Alguns autores, que estudaram a espuma do café, identificaram os polissacarídeos solúveis como os principais responsáveis pela sua formação e estabilidade.

O isolamento e caracterização de polissacarídeos podem ser conseguidos por diferentes técnicas de precipitação. Nunes e Coimbra (1997 e 1998) isolaram os polissacarídeos presentes no café “expresso” com soluções aquosas de etanol a 50% e a 75% em dois passos consecutivos, com agitação constante a 4 °C durante uma hora. Navarini *et. al.* (1999) e D’Agostina *et. al.* (2004) usaram n-hexano para eliminar os lípidos presentes no café e provocaram a precipitação dos polissacarídeos com uma solução de sulfato de amónio a uma temperatura de 4 °C. Redgwell *et. al.* (2002) usaram apenas um passo com etanol a 80% à temperatura ambiente. Oosterveld *et. al.* (2003) conseguiram isolar diferentes fracções de polissacarídeos, com diversas massas moleculares, de amostras de café por um processo que envolveu a eliminação de gorduras, a extracção com água, a precipitação com EDTA e tratamentos com soluções altamente alcalinas. No entanto, verificaram que o método não era muito eficaz, apresentando um rendimento de apenas 7% no café verde e de 29% no café torrado.

A solução encontrada para limitar a formação de espuma nas nossas amostras, consistiu na adição de etanol, tendo sido adaptada do trabalho de Nunes e Coimbra (1997). Após ensaios com 5, 10, 15, 20, 25 mL de etanol adicionados a 10 mL de amostra, verificou-se que a partir de 15 mL não havia diferenças significativas na eliminação de espuma tendo-se escolhido este como o valor a adicionar. A realização da operação a -20 °C em vez dos 4 °C constantes da proposta inicial permitiu reduzir o tempo da operação de 60 para 15 minutos.

Verificou-se, entretanto, que a adição de etanol levava à formação de um precipitado negro que colmatava os filtros e as colunas de SPE usadas a seguir. Este problema foi resolvido pela inclusão de um passo de centrifugação a 3000 *rpm* logo após a evaporação dos extractos.

A eliminação da espuma, todavia, não se mostrou como uma solução totalmente eficaz para a resolução dos problemas analíticos. Os extractos obtidos ainda apresentavam uma coloração acentuada continuando a verificar-se dificuldades a nível da separação cromatográfica.

Alguns autores, que analisaram com sucesso amostras de café por LC-MS/MS, propuseram a purificação dos extractos pela técnica de SPE, por a mesma permitir a eliminação da grande maioria dos compostos corados, para além de outros interferentes. Roach *et. al.* (2003) usaram uma combinação de diferentes colunas de fase mista e de troca iónica e catiónica. Granby e Fagt (2004) efectuaram a purificação com colunas de 300 mg de Isolute de fase mista. Şenyuva and Gökmen (2005) extraíram a acrilamida de café moído com metanol e efectuaram a purificação com sorbentes de troca iónica e troca catiónica. Delatour *et. al.* (2004) usaram colunas de 500 mg de Isolute de fase mista para purificar cerca de 2 mL de extracto.

No nosso trabalho, começamos por testar o Florisil, que é um sorbente aplicado ao extracto orgânico obtido após a derivatização das amostras. No entanto, verificamos que não era possível obter resultados positivos que nos levaram a rejeitar este método. Foi utilizado, em segundo lugar, o sorbente Isolute Fase-Mista nas purificações por SPE das amostras de café. O Isolute Fase-Mista é um sorbente constituído por uma mistura de sorbentes (apolar (C₁₈), troca catiónica e troca aniónica) o que permite obter amostras purificadas graças às multi-interacções que oferecem, sendo normalmente usado para purificar matrizes aquosas. O processo de purificação é aplicado aos extractos aquosos após a evaporação parcial da água no evaporador rotativo e antes de se efectuar a derivatização das amostras a 2,3-dibromopropionamida.

Testaram-se inicialmente colunas de Isolute relativamente pequenas, com 500 mg e 1 g de fase sólida. Em ambos os casos verificou-se perdas de analito uma vez que o Isolute saturava facilmente com cerca de 0,5-1 mL de amostra de café, fazendo com que a purificação não fosse eficiente quando se aplicava um volume de amostra superior. Outro problema era o facto de ser necessário rejeitar uma grande parte da amostra, o que levava a perda de sensibilidade do método uma vez que era impossível atingir volumes de 1 mL durante o passo de evaporação deste tipo de amostras, tal como já foi

referido (Capítulo 5). Quando a evaporação dos extractos de café era demasiado prolongada, precipitava uma grande quantidade de sólidos insolúveis o que dificultava a recuperação da amostra do balão de evaporador. Com o fim de ultrapassar este problema, utilizaram-se posteriormente, colunas de Isolute com 3 g de sorbente, mas, apesar de se poder usar uma quantidade maior de amostra, o sorbente continuava a saturar facilmente, não eliminando os compostos corados e os cromatogramas apresentavam algumas interferências que suprimiam o sinal analítico.

Algumas experiências realizadas no laboratório com colunas de C_{18} demonstraram que este sorbente retinha, de forma bastante eficaz, os compostos corados do café. Prepararam-se colunas com 2 e 3 g de C_{18} e verificou-se que o seu uso permitia a eliminação de praticamente toda a coloração do café. No entanto, independentemente da quantidade de sorbente usada, não eram removidos alguns compostos que se sobrepunham ao pico do 2,3-DBPA. A título de exemplo apresenta-se na Figura 8.5 um cromatograma de uma amostra de café purificada com uma coluna de 3 g de C_{18} .

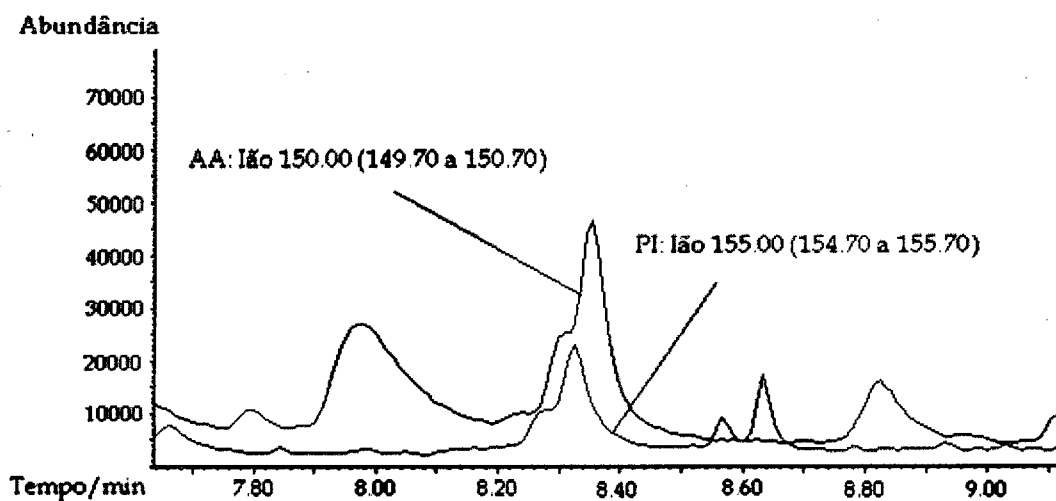


Figura 8.5- Amostra de café submetida a uma purificação com uma coluna de C_{18} . Os derivados da acrilamida (AA) e do padrão interno (PI), com tempo de retenção de aproximadamente 8,3 min apresentam um interferente.

A presença do contaminante que eluía com o derivado da acrilamida, dificultava o processo de quantificação. A solução encontrada foi a combinação, numa só coluna,

das duas fases estacionárias (a C_{18} e a fase-mista) tendo-se verificado que uma razão de 1:3 de C_{18} : Isolute era ideal para eliminar os contaminantes mais relevantes nas amostras de café.

Na Figura 8.6 é apresentado um cromatograma de uma amostra de café submetida ao método de purificação com a coluna combinada.

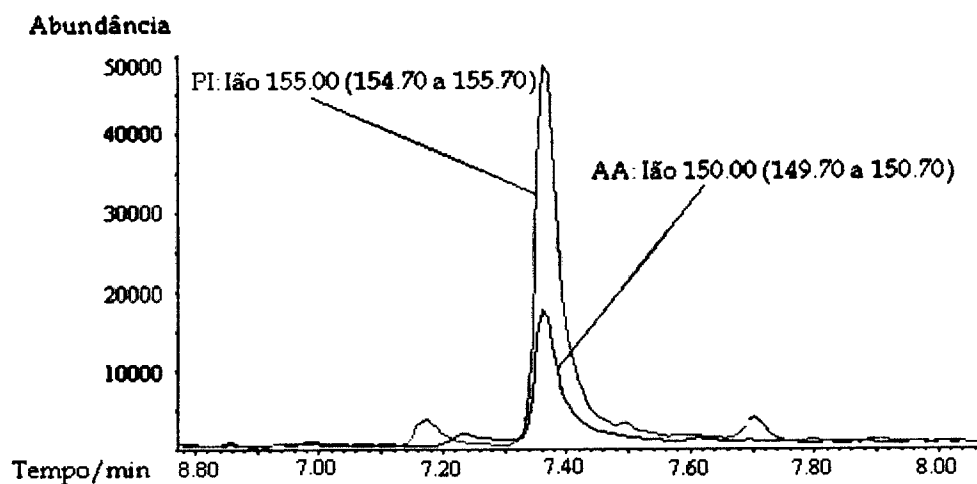


Figura 8.6- Cromatograma de uma amostra de café "expresso" com 104 $\mu\text{g/kg}$ de acrilamida e adição de 1 μg de $^{13}\text{C}_3$ -acrilamida correspondente a uma concentração de 500 $\mu\text{g/kg}$ acrilamida.

Os cafés solúveis, no entanto, revelaram ser uma matriz ainda mais difícil do que as amostras de café torrado devido à sua alta percentagem de polissacarídeos que originavam uma grande quantidade de espuma. A adição de etanol não era suficiente para eliminar a maioria da espuma e a coluna combinada de Isolute e C_{18} não eliminava alguns dos interferentes mais importantes observados nos cromatogramas. Para além disso, estas amostras provocavam a contaminação do injetor e consequentemente do topo da coluna, o que exigia mudanças constantes do liner, às vezes após 3-4 injeções. A adição de uma maior quantidade de C_{18} mostrou-se impraticável devido à dimensão dos reservatórios utilizados e a solução encontrada foi a inclusão de um passo adicional de purificação com uma coluna de 3 g de C_{18} antes da purificação com a coluna combinada. Esta etapa adicional permitiu a eliminação da maior parte dos compostos corados. Esta técnica permitiu obter resultados cromatográficos de boa qualidade verificando-se, apenas, uma ligeira diminuição do sinal analítico.

Na Figura 8.7 representa-se esquematicamente o procedimento utilizado durante a purificação por SPE. Após a evaporação, até cerca de 5 mL, das amostras de café, as colunas de SPE (Isolute MM ou C₁₈) foram solvatadas com metanol e depois com água para equilibrar a fase estacionária. Depois de colocada a amostra, rejeitaram-se os primeiros mililitros que eluíram (uma vez que ainda era a água usada na equilibração da coluna) e recolheu-se o volume restante da solução. De seguida a coluna foi lavada com 10 mL de água para garantir a eluição completa de toda a acrilamida, os quais se juntaram à solução recolhida anteriormente. Entre todos estes passos foi essencial evitar que a coluna secasse.

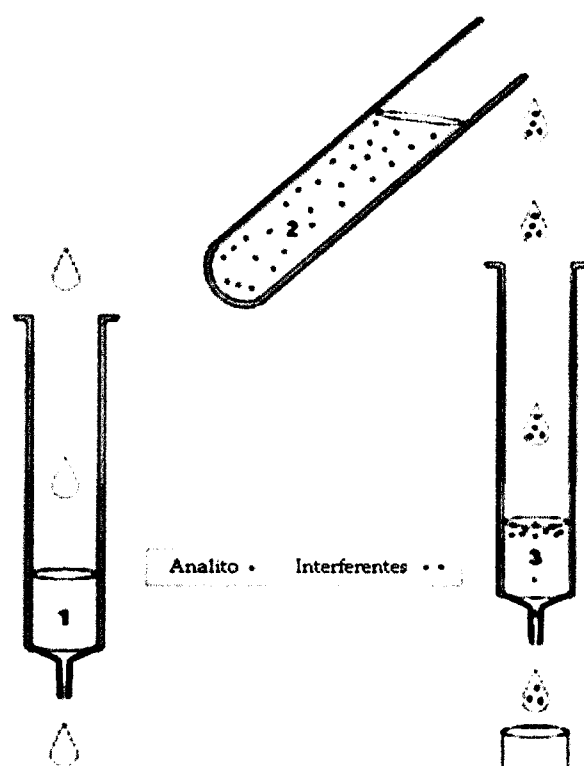


Figura 8.7- Técnica de SPE utilizada neste trabalho (Adaptado de Argonaut, 2004)

1- Condicionamento da coluna; 2- Extracto aquoso da amostra; 3- Percolação da amostra através da coluna.

Nesta técnica, a presença de partículas insolúveis na amostra pode impedir e bloquear o fluxo por colmatção da fase sólida, uma vez que podem ocupar os espaços entre as partículas do sorbente. A eliminação destas partículas foi efectuada por centrifugação dos extractos aquosos de café após a evaporação do solvente em excesso.

Isto é importante em questões de manutenção de fluxo, mas também pelo facto de as partículas poderem actuar como fase descontínua no topo da coluna levando a variabilidade nas recuperações (Barker, 2000).

8.2.2- Validação do método

8.2.2.1- Selectividade

A selectividade do método foi obtida a partir da comparação dos tempos de retenção dos picos presentes nos padrões com os picos obtidos para as amostras. A confirmação foi efectuada através da sobreposição dos sinais analíticos dos iões $m/z=150$ e $m/z=152$ do derivado da acrilamida e $m/z=153$ e $m/z=155$ do derivado do padrão interno. Nas figuras seguintes apresentam-se exemplos dos cromatogramas obtidos para um dos padrões (Figura 8.8) e para uma amostra (Figura 8.9).

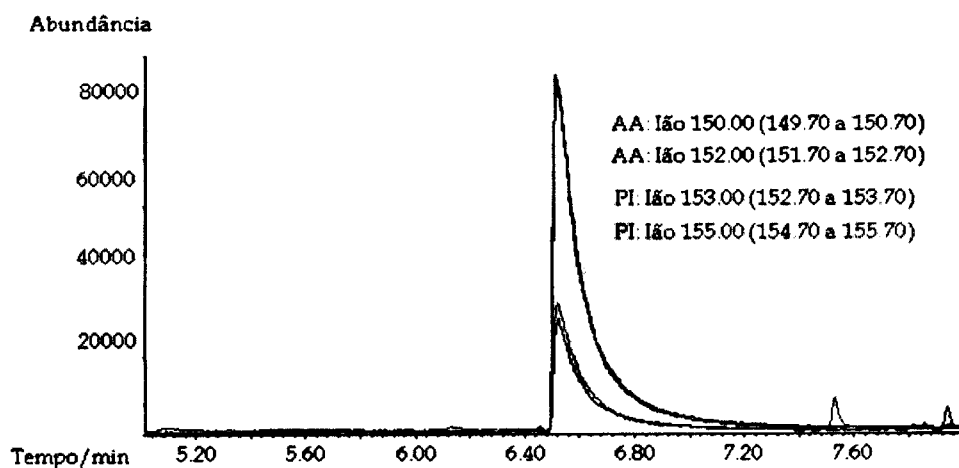


Figura 8.8- Sobreposição dos iões dos derivados da acrilamida e do padrão interno de uma solução padrão de acrilamida com concentração 1500 µg/kg.

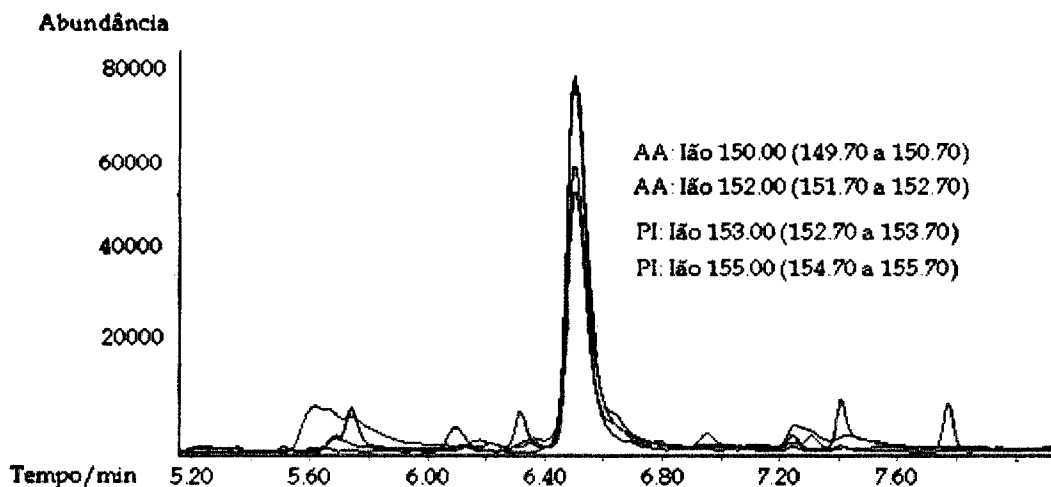


Figura 8.9- Sobreposição dos iões dos derivados da acrilamida e do padrão interno de uma amostra de um sucedâneo de café solúvel com a concentração de 685 µg/kg.

Como se pode verificar, e ao contrário do que seria de esperar numa interpretação mais superficial, os cromatogramas dos padrões apresentavam invariavelmente menor qualidade do que os cromatogramas das amostras. Segundo Anastassiades *et. al.* (2003), este resultado deve-se ao chamado efeito de “melhoria da resposta cromatográfica induzida pela matriz”. Neste caso, o *tailing* apresentado pelos picos obtidos nos padrões é devido a interações indesejáveis entre o analito e locais activos na coluna e no injector. Quando estão presentes componentes da matriz há melhorias significativas na qualidade dos cromatogramas, uma vez que preenchem os locais activos, reduzindo assim as interações entre estes e o analito. Têm sido propostas várias estratégias para minimizar o fenómeno de distorção dos picos nos padrões e para compensar os efeitos induzidos pela matriz. Estes autores sugerem a adição, a padrões e amostras, de “protectores do analito” substâncias que apresentem capacidades de formar ligações de hidrogénio de modo a potenciar um melhor comportamento cromatográfico dos compostos de interesse.

Durante a realização do trabalho experimental descrito nesta dissertação, esta técnica não foi testada, mas possivelmente será alvo de trabalhos futuros. No entanto, verificou-se melhorias cromatográficas dos padrões quando estes eram injectados intercaladamente com as amostras, o que provavelmente, é devido a um efeito de matriz semelhante ao descrito.

8.2.2.2- Linearidade

A linearidade do método foi testada diversas vezes usando soluções padrão preparadas com água e submetidas aos métodos desenvolvidos para as amostras. Prepararam-se sete padrões em simultâneo com as amostras. O intervalo de concentrações escolhido foi concordante com a quantidade de acrilamida esperada nas amostras, tipicamente na ordem dos 0-1500 µg/kg de acrilamida. A quantidade de padrão interno foi de 1 µg para uma toma de 10 mL correspondente a 500 µg/kg na amostra para todas as amostras e padrões. As curvas de calibração foram construídas a partir da razão das áreas do ião m/z 150 do derivado da acrilamida e do ião m/z 155 do derivado do padrão interno em função da concentração do padrão (Figura 8.10). Os coeficientes de correlação obtidos foram usualmente superiores a 0,997.

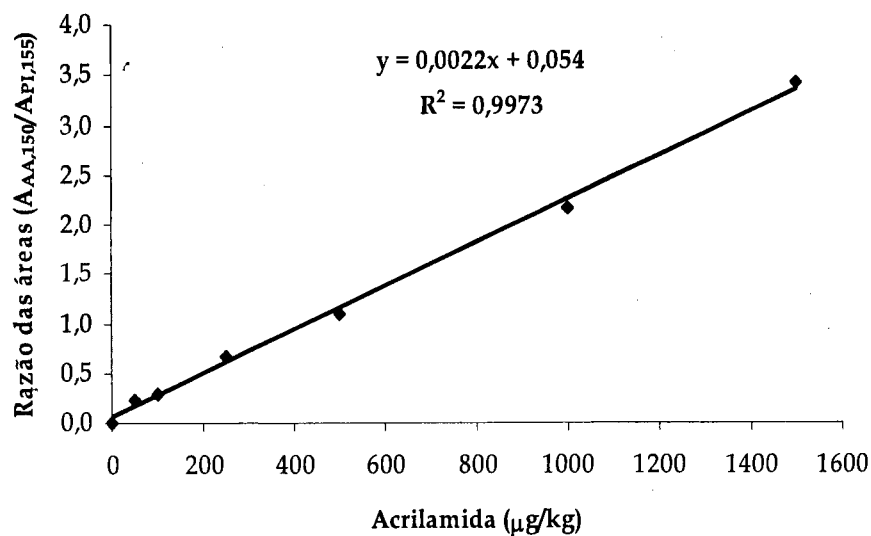


Figura 8.10- Curva de calibração da acrilamida

A linearidade do método também foi testada em matrizes reais através do método de adição de padrão. Preparou-se uma solução com um derivado solúvel de café que continha 1004 µg/kg de acrilamida, a partir de 8 g de amostra dissolvido em 40 mL de água e dividida em quatro alíquotas de 10 mL cada. Foi adicionada acrilamida a cada uma delas na quantidade de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 µg correspondente a 250, 500, 750 e 1000 µg/kg de acrilamida. Após a adição do padrão interno (1 µg), as amostras foram

analisadas pelo método descrito.

Apresenta-se a título de exemplo, na Figura 8.11, a curva de adição de padrão para uma amostra solúvel de café.

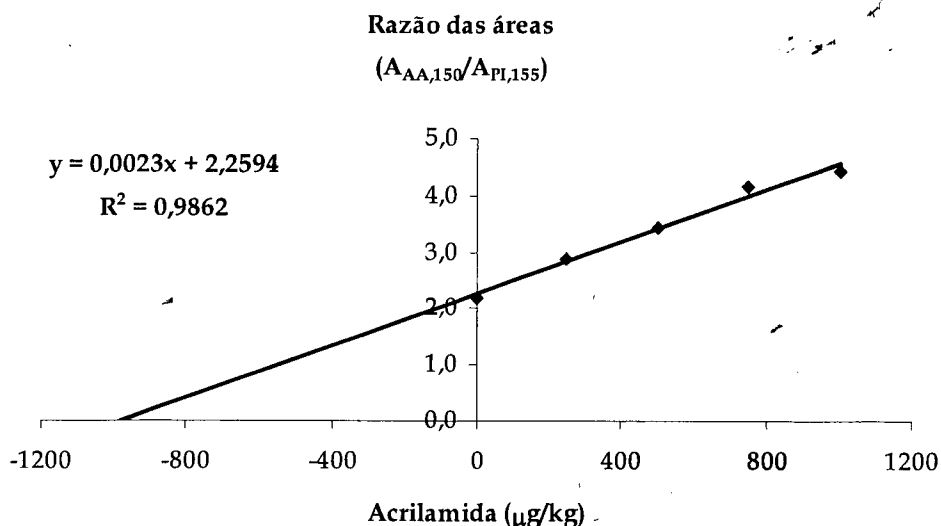


Figura 8.11- Curva de calibração da acrilamida numa amostra de um derivado de café solúvel obtida através do método de adição de padrão.

8.2.2.3- Precisão

Para estudar a precisão do método, uma amostra de café "expresso" (~30 mL) foi dividida em três alíquotas de 10 mL cada, que foram submetidas ao método analítico desenvolvido e injectadas duas vezes cada uma. O valor médio encontrado foi de 102,5 $\mu\text{g/kg}$ com um RSD de 6,3%.

8.2.2.4- Recuperação

Para o estudo da recuperação, usaram-se as soluções preparadas para o método de adição de padrão: diluíram-se 8 g de uma amostra de um derivado solúvel de café que continha 1004 $\mu\text{g/kg}$ de acrilamida, em 40 mL de água e dividiu-se em quatro alíquotas de 10 mL cada. Foi adicionada acrilamida a cada uma delas entre 0,5 e 2,0 μg correspondente a 250-1000 $\mu\text{g/kg}$. Após a adição do padrão interno (1 μg), as amostras

foram analisadas pelo método descrito. A recuperação da acrilamida das amostras fortificadas variou entre 97,4 e 108,4% (Tabela 8.3).

Tabela 8.3- Recuperação da acrilamida em amostras fortificadas

Quantidade inicial $\mu\text{g/L}$	Quantidade adicionada $\mu\text{g/kg}$	Quantidade encontrada $\mu\text{g/kg}$	Recuperação %
1004,0	250	1222,0	97,4
	500	1631,0	108,4
	750	1738,0	99,1
	1000	2023,0	100,9

8.2.2.5- Limite de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LD) do método foi calculado a partir dos parâmetros da equação da recta (Miller e Miller, 1998; Ribani *et. al.*, 2004). Assim o $LD = 3,3 \times (s/S)$, onde s é o desvio padrão da ordenada da origem e S é o declive da recta. O limite de quantificação (LQ) foi calculado da mesma forma utilizando a equação $LQ = 10 \times (s/S)$.

O limite de detecção obtido desta forma foi de $7,5 \mu\text{g/kg}$ e o limite de quantificação de $22,5 \mu\text{g/kg}$.

8.2.2.6- Estabilidade dos padrões e das amostras

As amostras e os padrões foram armazenados a 4°C e a sua análise efectuada um mês depois não apresentou diferenças analíticas significativas.

8.2.3- Resultados obtidos e discussão: amostras de café e sucedâneos

Os resultados obtidos para a análise da acrilamida em café e derivados usando o método descrito, são apresentados na Tabela 8.4. A concentração de acrilamida é apresentada em $\mu\text{g/kg}$, indicando-se o valor médio para cada categoria de produtos. As amostras de café torrado foram analisadas como bebida, neste caso como “expresso”, e

para preparar os extractos dos derivados solúveis de café dissolveram-se 2 g de amostra em 10 mL de água.

Tabela 8.4- Concentração de acrilamida em café torrado e em derivados

<i>Amostras</i>	<i>Tipo de amostra</i>	<i>Nº de amostras</i>	<i>AA µg/kg</i>	<i>AA µg/kg (média)</i>
Café torrado em grão	Aráb (100)	4	55,0	60,5
			61,0	
			61,0	
			65,0	
	Misturas Aráb e Rob (30:70)	15	61,0	108,3
			64,0	
			89,0	
			97,0	
			97,0	
			101,0	
			104,0	
			105,0	
			105,0	
			109,0	
			115,0	
			126,0	
			132,0	
			138,0	
			181,0	
	Mistura Aráb e Rob (5:95)	1	147,0	147,0
	Descafeinados	2	60,0	79,0
			98,0	
	Café torrefacto	1	57,0	57,0
	Mistura de café torrefacto e torrado (30:70)	1	103,0	103,0
Café solúvel	Clássico	3	237,0	318,0
			354,0	
			363,0	
	Descafeinado	2	382,0	429,0
			476,0	
Sucedâneos de café	Mistura de 20% de café com cereais torrados	2	1004,0	1075,5
			1147,0	
	Mistura 100% cereais torrados	1	685,0	685,0
	Cappuccino	1	32,0	32,0
Total		33		
Aráb- Arábicas; Rob- Robustas				

Na Figura 8.12 são apresentados os resultados obtidos apenas para os cafés torrados e moídos de diversas qualidades analisados como “expresso”. Pode verificar-se que os cafés que apresentam uma menor quantidade de acrilamida são os cafés 100% Arábica e o café torrefacto.

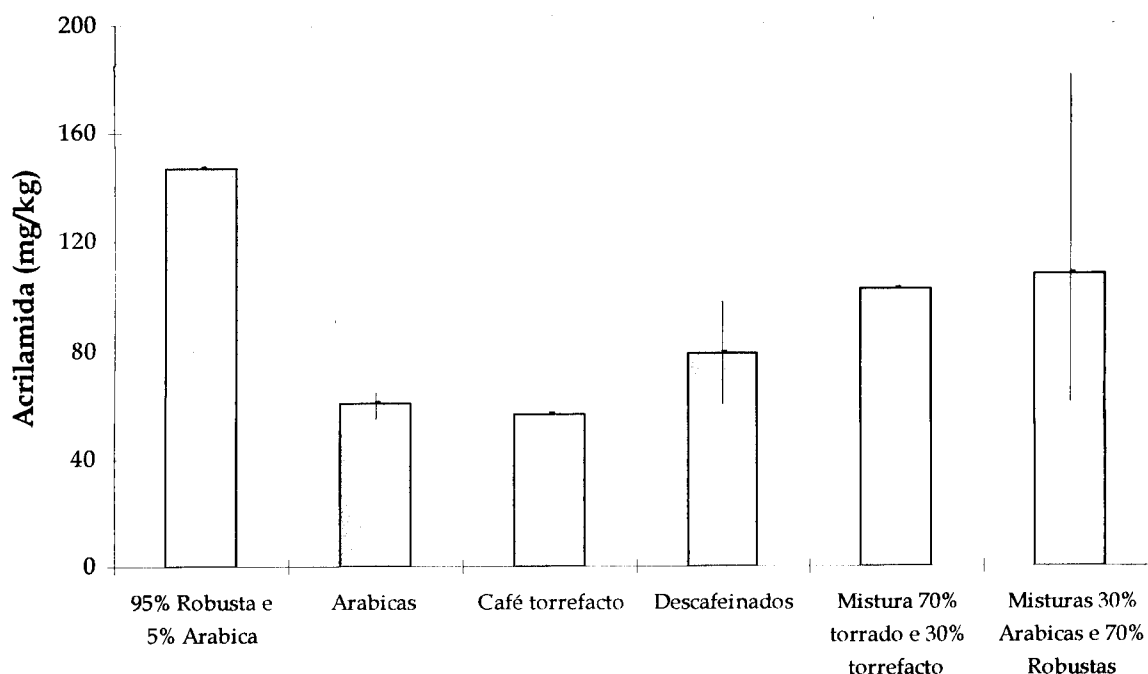


Figura 8.12- Concentração de acrilamida obtida para cafés torrados e moídos

No caso dos cafés Arábica, e tal como já foi referido no Capítulo 3, estes resultados estão relacionados com a presença dos precursores da acrilamida, asparagina e açúcares redutores, que estão presentes em maior quantidade nos cafés Robusta. A quantidade de acrilamida que potencialmente se pode formar depende da interacção destes compostos durante a reacção de Maillard que ocorre durante o processo de torra dos cafés. À medida que a percentagem de café Robusta aumenta nas misturas, também aumenta a quantidade de acrilamida observada.

Quanto ao café torrefacto, a adição de açúcar durante a torra corresponde a cerca de 15% do volume total deste tipo de cafés. Andueza *et. al.* (2004) verificaram que no caso deste tipo de café, se forma um maior número de produtos de Maillard,

principalmente melanoidinas. Seria então de esperar uma maior concentração de acrilamida formada durante a torra, tendo em conta a participação dos açúcares como precursores na formação da substância. No entanto, o açúcar adicionado, não parece reagir em grande extensão com outros compostos presentes no café, sofrendo principalmente caramelizações na superfície dos grãos ao ser submetido a temperaturas de cerca de 200 °C (Capítulo 3). Ao extrair-se o café torrefacto para preparar um “expresso”, apenas 85% são realmente café havendo por isso um efeito de “diluição” dos compostos presentes incluindo da acrilamida.

Para além da análise de “expressos”, o café torrado também foi analisado directamente por infusão em água quente usando o método desenvolvido neste trabalho. Os cafés torrados foram submetidos a uma extracção mais prolongada por infusão de 2 g de pó em 10 mL de água e mantidos a uma temperatura de 65 °C durante 15 minutos. As soluções resultantes foram sujeitas ao mesmo processo de purificação e derivatização antes da análise por GC-MS. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 8.5.

Tabela 8.5- Comparação entre a concentração da acrilamida no café “expresso” e no pó de café

<i>Amostra</i>	<i>Concentração de acrilamida no café “expresso” (µg/kg)</i>	<i>Concentração de acrilamida no pó de café (µg/kg)</i>	<i>Quantidade extraída (%)</i>
1. Café torrefacto	57,0	64,3	89
2. Café torrefacto e torrado (30:70)	103,4	185,3	56
3-12. Misturas de café Arábica Robusta (30:70)	64,0	92,9	69
	89,3	135,0	66
	97,4	184,3	53
	96,6	179,4	54
	103,8	176,0	59
	105,2	171,9	61
	109,3	157,7	69
	115,0	156,0	74
	126,1	195,4	65
	132,0	246,0	54
Média	99,8	161,9	64

Na Figura 8.13 apresentam-se os resultados obtidos, comparando-os com os das mesmas amostras de café analisadas como “expresso”.

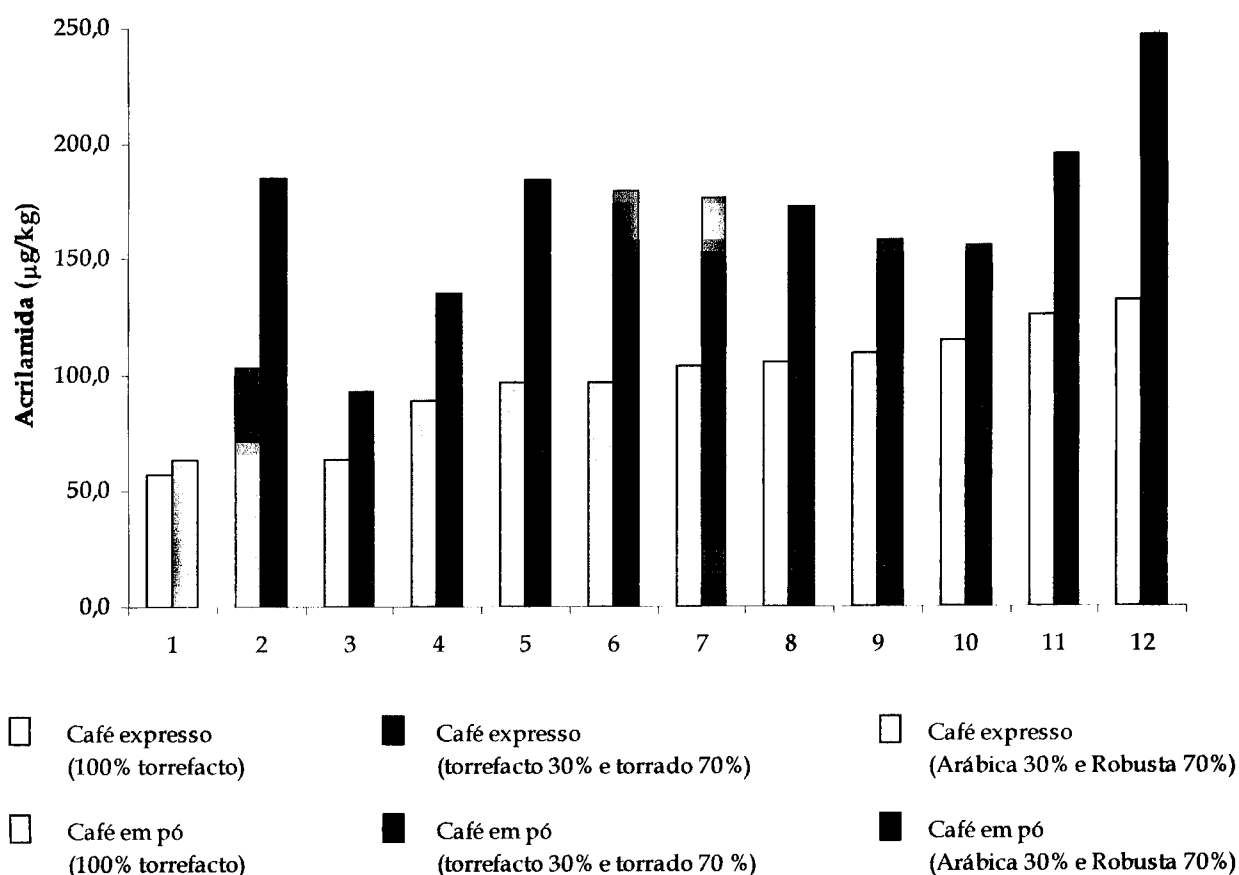


Figura 8.13- Comparação entre a quantidade de acrilamida observada num “expresso” e obtida a partir da infusão prolongada do pó de café em água quente.

A análise dos resultados permite concluir que o processo “expresso” extrai entre 50 a 90% da acrilamida do pó de café. A compactação característica do pó de café e o tempo mínimo de percolação (cerca de 30 segundos) não permite uma difusão eficiente da água através do “bolo” de café, limitando assim a extracção da acrilamida apesar do tamanho mínimo dos grãos. Andrzejewski *et. al.* (2004) apresentaram resultados na

análise do pó do café moído na ordem dos 209,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e Delatour *et. al.* (2004) de cerca de 203 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de acrilamida. O resultado médio obtido neste trabalho, para o café torrado foi de cerca de 162 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Na Figura 8.14 são apresentados os resultados para os derivados de café estudados neste trabalho. De um modo geral os derivados apresentam uma maior quantidade de acrilamida do que os “expressos” apresentados anteriormente.

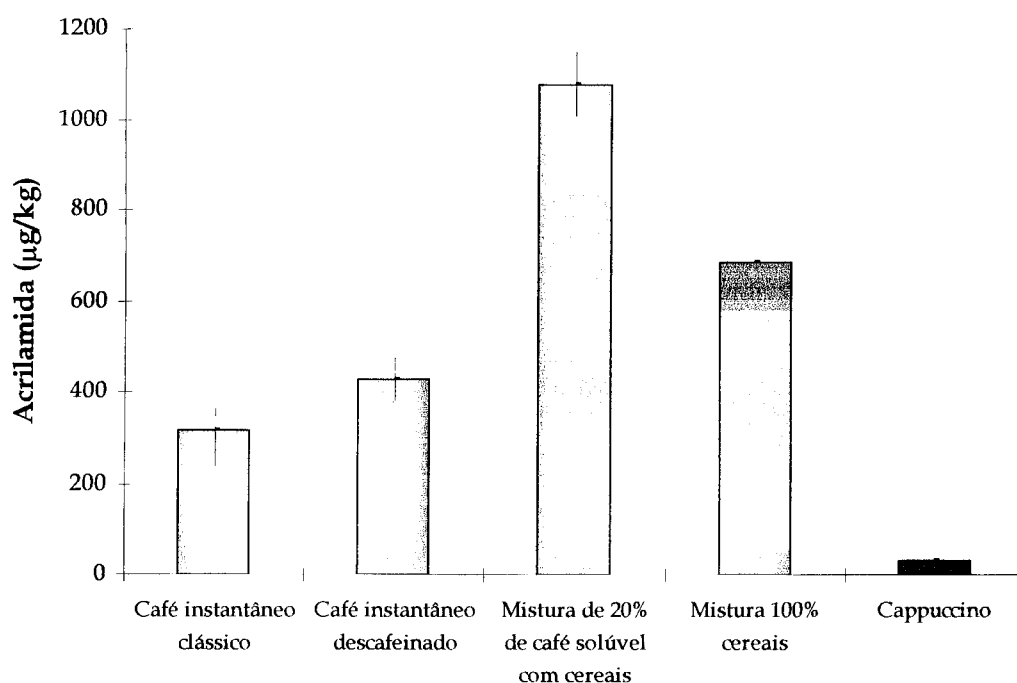


Figura 8.14- Concentração de acrilamida em derivados de café

O café solúvel apresenta uma maior quantidade de acrilamida do que o café torrado. Este facto deve-se, possivelmente, ao processo de preparação deste tipo de café, que implica a preparação de uma infusão concentrada de café, usualmente da variedade Robusta, que posteriormente é desidratada e liofilizada (Ver Capítulo 3). Andrzejewski *et. al.* (2004) analisaram diversas marcas de café solúvel e encontraram valores na ordem dos 441,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. No nosso trabalho, obtivemos um valor médio, para este tipo de amostra, de 373 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Os cereais torrados com e sem café são os que apresentam os resultados mais elevados. Os cereais são ricos nos precursores da acrilamida e, durante o processo de

torra a que são sujeitos, com temperaturas entre 180 e 200 °C (Capítulo 3), pode formar-se uma grande quantidade de acrilamida. Delatour *et. al.* (2004) verificaram que a cevada torrada apresenta cerca de 200 µg/kg de acrilamida e a chicória torrada cerca de 4000 µg/kg.

Em Portugal, o café é altamente consumido como “expresso”, o qual, tal como foi explicado anteriormente no Capítulo 3, tem uma técnica de preparação peculiar: uma pequena quantidade de água quente (± 30 mL) é percolada num curto período de tempo a uma pressão elevada através de uma camada de café finamente moído ($\pm 6-7$ g), o “bolo” de café, para produzir bastante eficientemente uma infusão muito concentrada com cerca de 200 g de café moído por litro de água (Nunes e Coimbra, 1997).

A partir desta relação massa de café/volume de água, torna-se possível converter os resultados anteriores de µg/kg em µg/L. Assim os cafés “expresso” analisados neste trabalho apresentaram em média 21,6 µg/L de acrilamida. Os resultados obtidos podem ser comparados com outros estudos efectuados em diversos países da Europa e nós Estados Unidos. Na Suíça, o conteúdo de acrilamida em café bebida ronda os 20 µg/L (Brunner *et. al.*, 2002), mas não há referência à forma como o café é preparado. Granby e Fagt (2004) na Dinamarca, encontraram no seu estudo, 8 µg/L de acrilamida em infusão de café preparada com 40 g de café moído por litro de água. Andrzejewski *et. al.* (2004) analisaram diversas marcas de café comercializadas nos EUA e encontraram valores na ordem dos 11 µg/L de acrilamida em café de filtro, preparado com 20 g de café/L. Como se pode verificar, os resultados obtidos no nosso trabalho são superiores aos de outros autores que também analisaram a bebida de café, o que não é de surpreender tendo em conta a quantidade de café usada na preparação dos “expressos”. Aliás, seria de esperar, no nosso caso, valores ainda mais elevados mas tal como foi demonstrado, o processo de extracção dos “expressos” extrai apenas cerca de 65% da acrilamida presente nas amostras. Se a extracção fosse completa, a quantidade de acrilamida presente na nossa bebida de café seria, em média, cerca de 33 µg/L.

De forma a simplificar um possível estudo da contribuição do café para a ingestão diária da acrilamida, pode calcular-se a quantidade da substância presente em

cada chávena. Considerando que são usados os 6 g de café moído extraídos com cerca de 30 mL de água para preparar um "expresso", a concentração de acrilamida por chávena varia entre 0,33 a 1,09 $\mu\text{g}/30\text{ mL}$. Para preparar uma chávena de café solúvel a medida usual é 2 g por dose individual o que resulta em 0,47 a 0,95 μg de acrilamida por 30 mL de bebida. Se as misturas com cereais forem preparadas como o café solúvel (2 g/ 30 mL chávena) a concentração de acrilamida por chávena corresponderá a 1,37 a 2,09 μg por 30 mL. O *cappuccino* é uma mistura solúvel de café, leite em pó, chocolate em pó e açúcar e cada dose individual corresponde a 14 g, resultando numa concentração de acrilamida de 0,45 μg por 30 mL.

O consumo de café em alguns países europeus contribui com cerca de 30% para a ingestão diária de acrilamida (Dybing *et. al.*, 2005), mas até este momento nenhum estudo sobre a contribuição dos diferentes alimentos foi realizado em Portugal.

Capítulo 9 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A acrilamida é uma substância sintética com diversas aplicações, que está classificada como sendo um provável agente carcinogénico para o homem. A detecção, em 2002, de quantidades apreciáveis da substância em alimentos de grande consumo, constituiu mais um episódio da saga de problemas de insegurança alimentar, na qual os últimos anos têm sido pródigos.

Desde então, muitos têm sido os esforços da comunidade científica no sentido de compreender o problema e minorar as suas consequências. Uma das áreas com maior actividade corresponde naturalmente à do desenvolvimento de metodologias analíticas adequadas para a correcta quantificação da substância nas diferentes matrizes alimentares envolvidas. A maior parte das metodologias até agora desenvolvidas baseiam-se em técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massa, nomeadamente cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS). Em regra permitem a obtenção de bons resultados na análise de batatas fritas e alimentos derivados de cereais, mas apresentam inúmeros problemas na análise de matrizes mais complexas como o café e o chocolate. Para este tipo de produtos, é normal o recurso à técnica de cromatografia líquida/ espectrometria de massa/espectrometria de massa (LC/MS-MS) com as consequências daí recorrentes a nível de custos, atendendo à escassez de equipamentos disponíveis e ao seu elevado preço.

Este trabalho teve como principal objectivo o desenvolvimento de um método para determinar acrilamida em café e derivados por GC-MS. Adicionalmente, pretendeu-se contribuir para o conhecimento da importância do café, bebida largamente consumida no nosso país, como fonte de acrilamida.

No que respeita ao método desenvolvido, o mesmo baseou-se nos métodos habitualmente usados para a determinação de acrilamida por GC-MS noutro tipo de matrizes - extracção aquosa, formação de um derivado bromado seguida por extracção em solvente orgânico e análise final - tendo sido introduzidas e optimizadas

importantes modificações a nível do processo de purificação usado, nomeadamente: 1) adição de etanol ao extracto aquoso, de forma a promover a eliminação de polissacarídeos responsáveis pela formação abundante de espuma e, em consequência, pela ocorrência de diversos problemas com repercussão negativa na eficácia do processo analítico, 2) utilização de reagentes de Carrez, para promover a eliminação de material proteico, 3) utilização de processos adicionais de extracção em fase sólida (SPE), indispensáveis para a remoção de material corado e de interferentes impeditivos de uma correcta separação cromatográfica da acrilamida, com uso de diferentes tipos de sorbentes escolhidos de acordo com a especificidade das matrizes. O método finalmente desenvolvido mostrou-se totalmente adequado para a quantificação de acrilamida nas diferentes amostras de café e derivados de café analisados (café "expresso", café solúvel e diferentes derivados, incluindo misturas de café com cereais torrados)

Os bons resultados obtidos nos ensaios de validação efectuados, nomeadamente no que respeita ao limite de detecção e de quantificação e aos níveis de precisão e de recuperação, permitem-nos pensar que pode ser um método de aplicação generalizada à análise de acrilamida neste tipo de amostras, evitando assim a obrigatoriedade de utilização de técnicas mais dispendiosas, com todas as vantagens daí inerentes.

No que respeita à concretização do segundo objectivo, o método foi aplicado a 33 amostras de café e derivados solúveis. Nas amostras de café torrado verificou-se uma certa proporcionalidade entre os teores de acrilamida e a percentagem de café da variedade Robusta (147 µg/kg de acrilamida no lote com maior percentagem de café Robusta; 60,5 µg/kg numa amostra contendo apenas café da variedade Arábica). O café torrefacto foi o que apresentou a menor quantidade da substância (57 µg/kg).

Estes resultados podem justificar-se com o facto dos cafés Robusta serem reconhecidamente mais ricos nos precursores de acrilamida, asparagina e açúcares redutores. Os baixos teores apresentados pela amostra de café torrefacto analisada poderão ter a sua justificação num efeito de diluição resultante da adição de açúcar, embora se pudesse prever o contrário pelo facto dos açúcares poderem actuar como precursores da acrilamida.

A comparação dos resultados obtidos pela análise das mesmas amostras de café,

submetidas - a) ao processo de extracção normal (extracção com água a 65 °C durante 15 minutos), b) análise do café “expresso” resultante - revelou que o processo usual de preparação de um “expresso” apenas permite a extracção de cerca de 65% da acrilamida presente nas amostras. Este facto poder-se-á dever à compactação do pó e ao pouco tempo de percolação característicos do método de extracção dos “expressos”.

As amostras de café solúvel apresentaram uma maior quantidade de acrilamida do que as amostras de café torrado, com teores geralmente superiores a 300 µg/kg. Este facto deve-se, possivelmente, ao facto de serem preparados a partir de infusões concentradas de café Robusta.

As misturas de cereais torrados apresentaram teores significativamente superiores aos apresentados pelos cafés (da ordem dos 1000 µg/kg). Também, neste caso, a justificação poderá ser a grande riqueza em precursores deste tipo de produtos e provavelmente o facto de serem sujeitos a processamentos de torra indutores da formação de maiores quantidades de acrilamida.

Como complemento ao trabalho executado com as amostras de café e derivados, procedeu-se também à análise de algumas amostras de batatas fritas tendo-se confirmado a constatação de outros autores sobre a existência de uma correlação entre a coloração das amostras e a quantidade de acrilamida presente. A forma como as batatas foram cortadas também parece exercer uma influência na quantidade de acrilamida observada: quanto maior a área de exposição da batata, como no caso da batata palha, maior a quantidade de acrilamida que se forma.

BIBLIOGRAFIA

- Ahn, J.S. *et. al.* - "Verification of the findings of acrylamide in heated foods". *Food Addit. Contam.*, **19**, nº12 (2002) 1116-1124.
- Ahn, Jongsung S.; Castle, Laurence - "Tests of Depolymerization of Polyacrylamides as a Potential Source of Acrylamide in Heated Foods". *J. Agr. Food Chem.*, **51** (2003) 6715-6718.
- Al-Dmoor, Hani M.; Humeid, Mohammad A.; Alawi, Mahmoud A. - "Investigation of acrylamide levels in selected fried and baked foods in Jordan". *JFAE*, **2**, nº2 (2004) 157-165.
- Alldrick, A.J. *et. al.* - "The processing of cereal foods". In Morris, P.C; Bryce, J.H. - "Cereal Biotechnology" Boca raton: Woodhead Publishing Ltd., 2000. ISBN: 0-8493-0899-2. Capítulo 13.
- Almeida, C. *et. al.* - "Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica". *Boletim da SPQ*, **95** (2004) 69-77.
- Amrein, T. *et. al.* - "Potential of Acrylamide Formation, Sugars, and Free speragine in Potatoes: A Comparison of Cultivars and Farming Systems". *J. Agr. Food Chem.*, **51** (2003) 5556-5560.
- Amrein, Thomas - "Systematic Studies on Process Optimization to Minimize Acrylamide Contents in Food". Diss. ETH nº 16311 (2005) Zurich.
- Amrein, Thomas M. *et. al.* - "Acrylamide in Gingerbread: Critical Factors for Formation and Possible Ways for Reduction". *J. Agr. Food Chem.*, **52** (2004b) 4282-4288.
- Amrein, Thomas M. *et. al.* - "Potential for acrylamide formation in potatoes: data from the 2003 harvest". *Eur. Food Res. Technol.*, **219** (2004a) 572-578.
- Anastassiades, Michelangelo; Maštovská, Katerina; Lehotay, Steven J. - "Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides". *J. Chromatogr. A*, **1015** (2003) 163-184.
- Andrawes, F.; Greenhouse, S.; Draney, D. - "Chemistry of acrylamide bromination for trace analysis by Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry". *J. Chromatogr.*, **399** (1987) 269-275.
- Andriot, Isabelle; Le Quéré, Jean-Luc; Guichard, Elisabeth, - "Interactions between coffee melanoidins and flavour compounds: impact of freeze-drying (method and time) and roasting degree of coffee on melanoidins retention capacity". *Food Chem.*, **85** (2004) 289-294.
- Andrzejewski, Denis *et. al.* - "Analysis of Coffee for the presence of Acrylamide by LC-MS/MS". *J. Agr. Food Chem.*, **52** (2004) 1996-2002.
- Andueza, Susana; de Peña, M. Paz, Cid, Concepción. - "Chemical and Sensorial Characteristics of Espresso Coffee As Affected by Grinding and Torrefacto Roast". *J. Agr. Food Chem.*, **51** (2003) 7034-7039.
- Apgar, Joan L.; Tarka Jr., Stanley M. - "Methylxantine Composition and Consumption patterns of cocoa and Chocolate Products." In Spiller, Gene A., ed. - "Caffeine". Boca Raton: CRC Press, 1998b. ISBN: 0-8493-2647-8. Capítulo 7.
- Argonaut- "SPE Modes of Operation". Technical Note 110. Foster City: Argonaut Technologies, 2004.
- Awad, A.C. - "Reduction of acrylamide formation in cooked starchy foods". Patente nº US2004086597 (2004). Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Consultado em 2006/02/21.
- Baardseth, P. *et. al.* - "Reduction of acrylamide formation in coffee-based food processing". Patente nº WO2005094591 (2005). Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Consultado em 2006/02/21.
- Baardseth, P. *et. al.* - "Reduction of acrylamide formation in food processing". Patente nº WO2004028277 (2004). Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Consultado em 2006/02/21.

- Baardseth, Pernille *et. al.* - "Lactic Acid Fermentation Reduces Acrylamide Formation and Other Maillard Reactions in French Fries". *J. Food Sci.*, **71** (2006) C28-C33. Disponível em: www.ift.org. Consultado em 2005/05/15.
- Bagdonaite, K. *et. al.* - "Analysis of 3-aminopropionamide: A potential precursor of acrylamide". *J. Biochem. Bioph. Meth.*, **69** (2006) 215-221.
- Bagdonaite, K.; Murkovic, M. - "Factors Affecting the Formation of Acrylamide in Coffee". *Czech J. Food Sci.*, **22** (2004) 22-24 (Special Issue).
- Barberà, Pedro. - "El café expreso". Fórum Cultural del Café, 2005. Disponível online em: http://www.forum-cafe.com/documents/f3_expres.pdf. Consultado em 2005/11/10.
- Barker, S.A. - "Matrix solid-phase dispersion". *J. Chromatogr. A*, **885** (2000) 115-127.
- Barry, D. L. *et. al.* - "Method for reducing acrylamide formation in thermally processed foods". Patente nº KR20050107757 (2005). Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Consultado em 2006/02/21.
- Becalski, Adam *et. al.* - "Acrylamide in French Fries: Influence of Free Amino Acids and Sugars". *J. Agr. Food Chem.*, **52** (2004) 3801-3806.
- Becalski, Adam, *et. al.* - "Acrylamide in Foods: Occurrence, Sources, and Modeling". *J. Agr. Food Chem.*, **51** (2003) 802-808.
- Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. - "Food Chemistry". 3ªEd. Berlin: Springer-Verlag, 2004c. ISBN: 3-540-40817-7. Capítulo 15.
- Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. - "Food Chemistry". 3ªEd. Berlin: Springer-Verlag, 2004b. ISBN: 3-540-40817-7. Capítulo 21, p. 959-968.
- Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. - "Food Chemistry". 3ªEd. Berlin: Springer-Verlag, 2004d. ISBN: 3-540-40817-7. Capítulo 17.
- Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. - "Food Chemistry". 3ªEd. Berlin: Springer-Verlag, 2004a. ISBN: 3-540-40817-7. Capítulo 21, p. 939-951.
- Bermudo, E. *et. al.* - "Analysis of acrylamide in food samples by capillary zone electrophoresis". *J. Chromatogr. A*, **1120** (2006a) 199-204.
- Bermudo, E., *et. al.* - "Determination of acrylamide in foodstuffs by liquid chromatography ion trap tandem mass-spectrometry using an improved purification procedure". *Anal. Chim. Acta*, **559** (2006b) 207-214.
- Bermudo, Elisabet *et. al.* - "Microemulsion electrokinetic chromatography for the analysis of acrylamide in food". *Electrophoresis*, **25** (2004) 3257-3262.
- Biedermann, Maurus *et. al.* - "Two GC-MS Methods for the Analysis of Acrylamide in Foodstuffs". *Mitt. Lebensm. Hyg.*, **93** (2002a) 638-652.
- Biedermann, Maurus; Grob, Koni - "Model Studies on Acrylamide Formation in Potato, Wheat Flour and Corn Starch; Ways to Reduce Acrylamide Contents in Bakery Ware". *Mitt. Lebensm. Hyg.*, **94**, nº 5 (2003) 406-422.
- Biedermann; Maurus *et. al.* - "Experiments on Acrylamide Formation and Possibilities to Decrease the Potential of Acrylamide Formation in Potatoes". *Mitt. Lebensm. Hyg.*, **93** (2002b) 668-687.
- Biedermann; Maurus *et. al.* - "Methods for Determining the Potential of Acrylamide Formation and Its Elimination in Raw Materials for Food Preparation, such as Potatoes". *Mitt. Lebensm. Hyg.*, **93** (2002c) 653-667.

- Biedermann-Brem, Sandra *et. al.* - "How much reducing sugar may potatoes contain to avoid excessive acrylamide formation during roasting and baking?". *Eur. Food Res. Technol.*, **217** (2003) 369-373.
- Bonvehí, J. Serra - "Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder". *Eur. Food Res. Technol.*, **221** (2005) 19-29.
- Boon, Polly E. *et. al.* - "Calculations of dietary exposure to acrylamide". *Mutat. Res.*, **580** (2005) 143-155.
- Bråthen, Erland *et. al.* - "Addition of Glycine Reduces the Content of Acrylamide in Cereal and Potato Products". *J. Agr. Food Chem.*, **53** (2005a) 3259-3264.
- Brierley, E.R.; Bonner, P.L.R; Cobb, A.H. - "Aspects of amino acid metabolism in stored potato tubers (CV *Pentland Dell*)". *Plant Sci.*, **127** (1997) 17-24.
- Brunner, K. *et. al.* - "Assessment of acrylamide intake by duplicate diet study". Swiss Federal Office of Public Health, Berna (2002). Disponível em: http://www.bfr.bund.de/cm/208/assessment_of_acrylamide_intake_by_duplicate_diet_study.pdf. Consultado em 2006/02/20.
- Cabral, João; Cabral, Maria Fernanda. - "Química Analítica: trabalhos práticos". Departamento de Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 1981.
- Cardoso, Salvador Massano - "Alimentação, ambiente e evolução". *Revista de Epidemiologia, ArquiMed*, **16**, supl. 6 (2002), 3-6. ISSN 0871-3413.
- Casal, Susana *et. al.* - "Discrimination between Arabica and Robusta Coffee Species on the Basis of Their Amino Acid Enantiomers". *J. Agr. Food Chem.*, **51** (2003) 6495-6501.
- CAST, Council for Agricultural Science and Technology. - "Acrylamide in Food". Issue Paper **32** (2006). CAST, Ames, Iowa.
- Cavalli, S.; Polesello, S.; Saccani, G. - "Determination of acrylamide in drinking water by large-volume direct injection and ion-exclusion chromatography-mass spectrometry". *J. Chromatogr. A*, **1039** (2004) 155-159.
- Chuda, Yoshihiro *et. al.* - "Effects of Physiological Changes in Potato Tubers (*Solanum tuberosum* L.) after low Temperature Storage on the Level of Acrylamide Formed in Potato Chips". *Biosci. Biotech. Bioch.*, **67**, nº5 (2003) 1188-1190.
- Ciesarová, Z. *et. al.* - "Comparison of Two Methods for Acrylamide Determination and Dietary Intake of Acrylamide from Potato Crisps in Slovakia". *Czech J. Food Sci.*, **22** (2004) 251-254 (Special Issue).
- Claeys, Wendie L.; De Vleeschouwer, Kristel; Hendrickx, Marc E. - "Quantifying the formation of carcinogens during food processing: acrylamide". *Trends Food Sci. Tech.*, **16** (2005a) 181-193.
- Claeys, Wendie L.; De Vleeschouwer, Kristel; Hendrickx, Marc E. - "Effect of Amino Acids on Acrylamide Formation and Elimination Kinetics". *Biotechnol. Prog.*, **21** (2005b) 1525-1530.
- Claeys, Wendie L.; De Vleeschouwer, Kristel; Hendrickx, Marc E. - "Kinetics of Acrylamide Formation and Elimination during Heating of an Asparagine-Sugar Model System". *J. Agr. Food Chem.*, **53** (2005c) 9999-10005.
- Clarke, R.J. - "Roasting and Grinding". In Clarke, R.J. e Macrae, R. - "Coffee. Volume 2: Technology". 1ªEd. Essex: Elsevier Science Publishers, 1985. ISBN: 1-85166-034-8. Capítulo 4.
- Claus, Achim *et. al.* - "A method for the determination of acrylamide in bakery products using ion trap LC-ESI-MS/MS". *Mol. Nutr. Food Res.*, **49** (2005) 918-925.

- Corrigan, P.J. - "Method for reducing acrylamide in Foods, foods having reduced levels of acrylamide, and article of commerce". Patente nº WO2005034649 (2005). Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Consultado em 2006/02/21.
- D'Agostina, Alessandra *et. al.* - "Investigations on the High Molecular Weight Foaming Fractions of Espresso Coffee". *J. Agr. Food Chem.*, **52** (2004) 7118-7125.
- De La Calle, Beatriz *et. al.* - "Report: European Workshop on Analytical Methods for the Determination of Acrylamide in Food Products". *Oud-Tournhout*, 28-29 Abril 2003.
- De Wilde, T. *et. al.* - "Acrylamide Formation during Frying of Potatoes: Thorough Investigation On The Influence of Crop and Process Variables". *Czech J. Food Sci.*, **22** (2004) 15-18 (Special Issue).
- De Wilde, Tineke *et. al.* - "Influence of Fertilization on Acrylamide Formation during Frying of Potatoes Harvested in 2003". *J. Agr. Food Chem.*, **54** (2006a) 404-408.
- De Wilde, Tineke *et. al.* - "Influence of Storage Practices on Acrylamide Formation during Potato Frying". *J. Agr. Food Chem.*, **53** (2005) 6550-6557.
- De Wilde, Tineke *et. al.* - "Selection Criteria for potato Tubers to Minimize Acrylamide during Frying". *J. Agr. Food Chem.*, **54** (2006b) 2199-2205.
- Decreto-Lei nº 53/89. Diário da República (D.R.) nº 44/89, Série I - de 1989-02-22. Disponível em: <http://dre.pt/pdfgratis/1989/02/04400.PDF>. Consultado em 2005/12/12.
- Delatour, Thierry *et. al.* - "Improved Sample Preparation to Determine Acrylamide in Difficult Matrixes Such as Chocolate Powder, Cocoa, and Coffee by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry". *J. Agr. Food Chem.*, **52** (2004) 4625-4631.
- Deshpande, S.S. - "Handbook of Food Technology". Nova Iorque: Marcel Dekker, 2002. ISBN: 0-8247-0760-5. Capítulo 9.
- Devries, Jonathan W.; POST, Brett E. - "Comment on "Soxhlet extraction of acrylamide from potato chips" by J.R. Pedersen and J.O. Olsson, *Analyst*, 2003, 128, 332". *Analyst*, **129** (2004) 93-95.
- Dionex - "Fast Determination of Acrylamide in Food Samples Using Accelerated Solvent Extraction (ASE®) Followed by Ion Chromatography with UV or MS Detection". Application Note 409, 2003.
- Doyle, M. Ellin - "Reported free asparagine levels in foods". Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison. Food Research Institute, Novembro 2002; atualizado em 1/31/03. Disponível em: <http://www.wisc.edu/fri/briefs/asparagine1102.pdf>. Consultado em 2006/01/16.
- DRABL, Direcção Regional de Agricultura da Beira Litoral, Ministério de Agricultura. Documento: "A fritura dos alimentos". Disponível em: http://www.drabl.min-agricultura.pt/drabl/documentos/fritura_alimentos.htm. Consultado em 2006/07/14.
- Dria, G.J. *et. al.* - "Method for reduction of acrylamide in roasted coffee beans, roasted coffee beans having reduced levels of acrylamide, and article of commerce". Patente nº US2004081724 (2004). Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Consultado em 2006/02/21.
- Dunovska, L. *et. al.* - "Changes of Acrylamide Levels in Food Products during Technological Processing". *Czech J. Food Sci.*, **22** (2004) 283-286 (Special Issue).
- Dybing, E. *et. al.* - "Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food". *Food Chem. Toxicol.*, **43** (2005) 365-410.
- Dybing, E.; Sanner, T. - "Risk assessment of acrylamide in foods". *Toxicol. Sci.*, **75** (2003) 7-15.

- Ejeta, G.; Hassen, M.M; Mertz, E.T. -"In vitro digestibility and amino acid composition of pearl millet (*Pennisetum typhoides*) and other cereals". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Applied Biology*, **84** (1987) 6016-6019.
- Elder, V.A. -"Method for enhancing acrylamide decomposition". Patente nº US2005118322 (2005b). Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Consultado em 2006/02/21.
- Elder, V.A. et. al. -"Method for reducing acrylamide formation in thermally processed foods". Patente nº KR20050107441 (2005a). Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Consultado em 2006/02/21.
- Ellenberg, Bernd, et. al. -"A General and Fast Methodology for the Extraction and GC-MS Analysis of Acrylamide from Carbohydrate-Rich Food Samples". Application Note 77. Germany: Varian, 2004.
- Elmore, Stephen J.; Mottram, Donald S. -"Compilation of free amino acid data for various food raw materials, showing the relative contributions of asparagine, glutamine, aspartic acid and glutamic acid to the free amino acid composition." JIFSAN, (2002). Disponível em: www.jifsan.umd.edu/presentations/acrylamide2002/wg1_asparagine_in_foods.pdf. Consultado em 2005/12/12.
- Eriksson, Sune -"Acrylamide in food products: Identification, Formation and analytical methodology". Doctoral Thesis (2005) Sweden.
- Eriksson, Sune; Eriksson, Patrik; Törnquist, Margareta -"Measurement of evaporated acrylamide during heat treatment of food and other biological materials". *LWT*, (2006) em impressão.
- Escrivá, M. Victoria Gilabert; Pezoa Garcia, N. Horácio; Marsaioli Jr., Antonio. -"Comparação das propriedades reológicas da massa de cacau torrada convencionalmente e por microondas". *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **18** (1998) 218-223. ISSN 0101-2061.
- EU/WHO, European Union, Joint Research Center/World Health Organization. Institute for Reference Materials and Measurement. Monitoring database. (2006). Disponível em: <http://www.irmm.jrc.be/html/activities/acrylamide/database.htm>. Consultado em 2006/04/06.
- Fauhl, C. et. al. -"Acrylamide interlaboratory Study 2002". Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, 2003. Disponível em: http://www.bfr.bund.de/cm/245/proficiency_testing_studie.pdf. Consultado em 2005/06/04.
- Fay, Laurent B.; Brevard, Hughes -"Contribution of mass spectrometry to the study of the Maillard reaction in food". *Mass Spectrom. Rev.*, **24** (2005) 487- 507.
- Fennell, T. R. et. al. -"Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans". *Toxicol. Sci.*, **85** (2005) 447-459.
- Fernandes, J. et. al. -"Survey of acrylamide in Portuguese foods by a GC/MS method. Preliminary results". *Book of Abstracts of the 2nd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis*, Prague, Czech Republic, November 2-4, 2005, página 220.
- Ferrão, J.E.M. - "História da Alimentação". In "Tesouros da cozinha tradicional Portuguesa". 1ª ed. Lisboa: Selecções do Reader's Digest, 1984.
- Finotti, Errico; Bertone, Aldo; Vivanti, Vittorio. -"Balance between nutrients and anti-nutrients in nine Italian potato cultivars". *Food Chem.*, **99** (2006) 698-701.
- Fiselier, K.; Grob, K.; Pfeifferle, A. -"Brown potato croquettes low in acrylamide by coating with egg/breadcrumbs". *Eur. Food Res. Technol.*, **219** (2004) 111-115.
- Fiselier, Katell; Grob, Konrad -"Legal limit for reducing sugars in prefabricates targeting 50 µg/kg acrylamide in French fries". *Eur. Food Res. Technol.*, **220** (2005) 451-458.

- Flüeckiger, R.; Salih, E. - "Method to limit acrylamide in heated foods". Patente nº WO2006017526 (2006). Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Consultado em 2006/02/21.
- Fohgelberg, P. e tal. - "The acrylamide intake via some common baby food for children in Sweden during their first year of life- an improved method for analysis of acrylamide". *Food Chem. Toxicol.*, **43** (2005) 951-959.
- Fredriksson, H. et. al. - "Fermentation Reduces Free Asparagine in Dough and Acrylamide Content in Bread". *Cereal Chem.*, **81**, nº 5 (2004) 650-653.
- Friedman, Mendel - "Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review". *J. Agr. Food Chem.*, **51** (2003) 4504-4526.
- Fryer, Peter; Pinschower, Kerstin. - "The Materials Science of Chocolate". *MRS Bulletin*, December 2000, 25-29. Disponível em: www.mrs.org/publications/bulletin. Consultado em 2006/03/30.
- FSA, Food Standards Agency - "Study of Acrylamide in Food. Background Information and Research Findings". Press Briefing 17.05.02.
- Gertz, Christian; Klosterman, Sabine. - "Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products". *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **104** (2002) 762-771.
- Gilbert, John. - "Applications of Quantitative Mass Spectrometry in Food Science". In Gilbert, John, ed. - "Applications of Mass Spectrometry in Food Science". London e Nova Iorque: Elsevier Applied Science, 1987. ISBN: 1-85166-081-X. Capítulo 2.
- Girma, K.B. et. al. - "Coordination chemistry of acrylamide". *Coordin. Chem. Rev.*, **249** (2005) 1283-1293.
- Gökmen, Vural et. al. - "Determination of acrylamide in potato chips and crisps by high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr. A*, **1088** (2005) 193-199.
- Gökmen, Vural; Palazoğlu, Tunç Koray; Şenyuva, Hamide Z. - "Relation between the acrylamide formation and time-temperature history of surface and core regions of french fries". *J. Food Eng.*, **77** (2006a) 972-976.
- Gökmen, Vural; Şenyuva, Hamide Z. - "A generic method for the determination of acrylamide in thermally processed foods". *J. Chromatogr. A*, **1120** (2006b) 194-198.
- Gonzalez, E. - "Estudo da viabilidade de implantação de pequenas unidades de torrefação de café". Trabalho de Projeto Final apresentado à Universidade Estácio de Sá como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos. (2004). Disponível em: <http://br.monografias.com/trabalhos/torrefacao-cafe/torrefacao-cafe.shtml>. Consultado em 2006/05/14.
- Govaert, Y. et. al. - "Optimization of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of acrylamide in foods". *Anal. Chim. Acta*, **556** (2006) 275-280.
- Gräf, Maya et. al. - "Reducing the acrylamide content of a semi-finished biscuit on industrial scale". *LWT*, **39** (2006) 724-728.
- Granby, Kit; Fagt, Sisse - "Analysis of acrylamide in coffee and dietary exposure to acrylamide from coffee". *Anal. Chim. Acta*, **520** (2004) 177-182.
- Granda, C.; Moreira, R.G.; Tichy, S.E. - "Reduction of Acrylamide Formation in Potato Chips by Low-temperature Vacuum Frying". *J. Food Sci.*, **69** (2004) E405-E411. Disponível em: www.ift.org. Consultado em 2005/05/15.
- Granvogl, Michael et. al. - "Quantitation of 3-Aminopropionamide in Potatoes- A Minor but Potent Precursor in Acrylamide Formation". *J. Agr. Food Chem.*, **52** (2004) 4751-4757.

- Grob, Koni *et. al.* - "French fries with less than 100 µg/kg acrylamide. A collaboration between cooks and analysts". *Eur. Food Res. Technol.*, **217** (2003) 185-194.
- Grob, Konrad *et. al.* - "Comment on "Soxhlet extraction of acrylamide from potato chips" by J.R.Pedersen and J.O.Olsson, *Analyst*, 2003, 128, 332". *Analyst*, **129** (2004) 92.
- Grune, G.; Talarico, T. - "Devices and methods for the rapid, reliable detection and determination of acrylamide concentration in food substances and prevention of acrylamide formation in the same". Patente nº US2006029992 (2006). Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Consultado em 2006/02/21.
- Hagmar, L. *et. al.* - "Differences in Hemoglobin Adduct Levels of Acrylamide in the General Population With Respect to Dietary Intake, Smoking Habits and Gender". *Mutat. Res. /Genet. Toxicol. Env. Mutag.*, **580**, nº 1-2 (2005) 157-165.
- Hamlet, C.G.; Jayaratne, S.M.; Sadd, P.A. - "Rapid, Sensitive and Selective Analysis of Acrylamide in Cereal Products Using Bromination and GC/MS/MS". *Czech J. Food Sci.*, **22** (2004) 290-293 (Special Issue).
- Hardas, Nitin R.; Adam, Raymond; Uden, Peter C. - "Alkene determination by bromination and gas chromatography with element-selective atomic plasma spectroscopic detection". *J. Chromatogr. A*, **844** (1999) 249-258.
- Hoenicke, K. *et. al.* - "Analysis of acrylamide in different foodstuffs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry". *Anal. Chim. Acta*, **520** (2004) 207-215.
- Howie, J.K.; Lin, P.Y.T.; Zyzak, D.V. - "Method for reduction of acrylamide in cocoa products, cocoa products having reduced levels of acrylamide, and article of commerce". Patente nº KR20060032149 (2006). Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Consultado em 2006/02/21.
- IARC International Agency for Research on Câncer. - "Acrylamide." IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 60. (1994), International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 389-433. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/>. Consultado em 2006/01/12.
- Illy, Andrea; Viani, Rinantonio, Ed. - "Espresso Coffee: The Chemistry of Quality". London: Academic Press, 1995. ISBN: 0-12-370670-X.
- International Starch Institute (ISI), Dinamarca, 2001. Disponível em: <http://home3.inet.tele.dk/starch/isi/starch/tm5www-potato.htm>. Consultado em 2006/09/20.
- Jezussek, Magnus; Schieberle, Peter. - "A New LC/MS-Method for the Quantification of Acrylamide Based on a Stable Isolute Dilution Assay and Derivatization with 2-Mercaptobenzoic Acid. Comparison with Two GC/MS Methods". *J. Agr. Food Chem.*, **51** (2003) 7866-7871.
- Jiao, Jingjing *et. al.* - "Development of a quantitative method for determination of acrylamide in infant powdered milk and baby foods in jars using isotope dilution liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry". *J. Chromatogr. A*, **1099** (2006) 198-202.
- JIFSAN, Joint Institute for Food Safety and Applied Nutrition Joint Acrylamide in Food - "Workshop: Update - Scientific Issues, Uncertainties, and Research Strategies". April 13-15, 2004, Chicago, Illinois. Disponível em: <http://www.jifsan.umd.edu/acrylamide2004.htm>. Consultado em 2005/07/01.
- Jung, M.Y. - "Method for inhibiting of acrylamide formation". Søe, J.B.; Poulsen, C.H.; Boll, D.L. - "Enzymatic process for acrylamide reduction in foodstuffs". Patente nº KR20040064205 (2004). Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Consultado em 2006/02/21.

- Jung, M.Y.; Choi, D.S.; Ju, J.W. - "A Novel Technique for Limitation of Acrylamide Formation in Fried and Baked Corn Chips and in French Fries". *J. Food Sci.*, **68** (2003) 1287-1290. Disponível em: www.ift.org. Consultado em 2005/05/15.
- Katz, S.N. - "Decaffeination of Coffee". In Clarke, R.J. e Macrae, R. - "Coffee. Volume 2: Technology". 1ª Ed. Essex: Elsevier Science Publishers, 1985. ISBN: 1-85166-034-8. Capítulo 3.
- Kawata, Kuniaki *et. al.* - "Gas chromatography-mass spectrometry determination of hydrophilic compounds in environmental water by solid-phase extraction with activated carbon fiber felt". *J. Chromatogr. A*, **911** (2001) 75-83.
- Kazantsev, O.A.; Shirshin, K.V. - "Spontaneous polymerization of (meth)acrylamides in concentrated aqueous solutions". *Polymer*, **45** (2004) 5021-5029.
- Kim, Cheong Tae; Hwang, Eun-Sun; Lee, Hyong Jo - "Reducing Acrylamide in Fried Snacks Products by Adding Amino Acids". *J. Food Sci.*, **70** (2005) C354-C358. Disponível em: www.ift.org. Consultado em 2005/05/15.
- Kim, Cheong Tae; Hwang, Eun-Sun; Lee, Hyong Joo - "An improved LC-MS/MS method for the quantification of acrylamide in processed foods". *Food Chem.*, **101** (2007) 401-409.
- Kirman, Christopher R. *et. al.* - "A physiologically based pharmacokinetic model for acrylamide and its metabolite, glycidamide, in the rat". *J. Toxicol. Env. Health, Part A*, **66** (2003) 253-274.
- Kita, Agnieszka *et. al.* - "Effective Ways of Decreasing Acrylamide Content in Potato Crisps during Processing". *J. Agr. Food Chem.*, **52** (2004) 7011-7016.
- Knol, Jeroen J. *et. al.* - "Toward a Kinetic Model for Acrylamide Formation in a Glucose-Asparagine Reaction System". *J. Agr. Food Chem.*, **53** (2005) 6133-6139.
- Konings, E.J.M. *et. al.* - "Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risks". *Food Chem. Toxicol.*, **41** (2003) 1569-1579.
- Krokida, M.K. *et. al.* - "Colour changes during deep fat frying". *J. Food Eng.*, **48** (2001) 219-225.
- Krysiak, W. - "Influence of roasting conditions on coloration of roasted cocoa beans". *J. Food Eng.*, **77** (2006) 449-453.
- Kurppa, L. - "A process and composition for preventing or reducing the formation of acrylamide in foods". Patente nº WO2004032647 (2004). Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Consultado em 2006/02/21.
- Lagalante, Anthony F.; FELTER, Matthew A. - "Silylation of Acrylamide for Analysis by Solid-Phase Microextraction/Gas Chromatography/Ion-Trap Mass Spectrometry". *J. Agr. Food Chem.*, **54** (2004) 3744-3748.
- Leung, K.S. *et. al.* - "Acrylamide in Asian foods in Hong-Kong". *Food Addit. Contam.*, **20**, nº12 (2003) 1105-1113.
- Lichon, Michael J. - "Sample preparation". In Mollet, Leo, M.L., Ed. - "Handbook of Food Analysis. Volume 1- Physical characterization and nutrient analysis". Nova Iorque: Marcel-Dekker, 1996. ISBN: 0-8247-982-9. Capítulo 1.
- Linden, Guy; Lorient, Denis. - "New ingredients in food processing. Biochemistry and agriculture". Boca Raton: CRC Press; Cambridge: Woodhead Publishing, 1999. ISBN: 0-8493-0631-0. Capítulo 3.
- Lindsay, R.C.; Jang, S. - "Methods for suppressing acrylamide formation and restoring browned color and flavor". Patente nº US2005214411 (2005). Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Consultado em 2006/02/21.

- Lindsay, R.C.; Jang, S. - "Method for suppressing acrylamide formation". Patente nº US2004224066 (2004). Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Consultado em 2006/02/21.
- Lingnert, Hans *et. al.* - "Acrylamide in food: mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods". *Scand. J. Nutr.*, **46**, nº4 (2002) 159-172.
- Lofstedt, Ragnar; Boholm, Asa - "Off track in Sweden - Scanlink environmental disaster". *Environment*, Maio (1999). Disponível em: http://www.findarticles.com/p/articles/mi_m1076/is_4_41/ai_54711397. Consultado em 2005/11/12.
- LoPachin, Richard M. - "The Changing View of Acrylamide Neurotoxicity". *Neurotoxicology*, **25** (2004) 617-630.
- LoPachin, Richard M.; Canady, Richard A. - "Acrylamide Toxicities and Food Safety: Session IV Summary and Research Needs". *Neurotoxicology*, **25** (2004) 507-509.
- Lundsberg, Lisbet S. - "Caffeine Consumption". In Spiller, Gene A., ed. - "Caffeine". Boca Raton: CRC Press, 1998b. ISBN: 0-8493-2647-8. Capítulo 9.
- Macrae, R. - "Nitrogenous Components". In Clarke, R.J. e Macrae, R., ed. - "Coffee. Volume 1: Chemistry". 1ª Ed. Essex: Elsevier Science Publishers, 1985. ISBN: 0-85334-368-3. Capítulo 4.
- Matthäus, Bertrand; Haase, Norbert U.; Vosmann, Klaus. - "Factors affecting the concentration of acrylamide during deep-fat frying of potatoes". *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **106** (2004) 793-801.
- Matthys, C. *et. al.* - "Risk assessment of dietary acrylamide intake in Flemish adolescents". *Food Chem. Toxicol.*, **43** (2005) 271-278.
- Mestdagh, Frédéric J. *et. al.* - "Influence of Oil Type on the Amounts of Acrylamide Generated in a Model System and in French Fries". *J. Agr. Food Chem.*, **53** (2005) 6170-6174.
- Mestdagh, Frédéric; De Meulenaer, Bruno; Van Peteghem, Carlos - "Influence of oil degradation on the amounts of acrylamide generated in a model system and in French fries". *Food Chem.*, **100** (2007) 1153-1159.
- Miller, J.C.; Miller, J.N. - "Statistics for Analytical Chemistry". 3rd Ed. Chichester: Ellis Horwood Lda, 1993. ISBN: 0-13-030990-7.
- Montavon, Philippe; Mauron, Anne-France; Duruz, Eliane. - "Changes in Green Coffee Protein Profiles during Roasting". *J. Agr. Food Chem.*, **51** (2003) 2335-2343.
- Morris, P. C.; Bryce, J. H. - "Introduction". In Morris, P.C; Bryce, J.H. - "Cereal Biotechnology" Boca raton: Woodhead Publishing Ltd., 2000. ISBN: 0-8493-0899-2. Capítulo 1.
- Mottram, Donald S.; Wedzicha, Bronislaw L.; Dodson, Andrew T. - "Food chemistry: Acrylamide is formed in the Maillard reaction". *Nature*, **419** (2002) 448-449.
- Mucci, L.A. *et. al.* - "Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder; Absence of an association in a population based study in Sweden". *Brit. J. Cancer*, **88** (2003a) 84-89.
- Mucci, L.A. *et. al.* - "Reply: Dietary acrylamide and cancer risk: additional data on coffee". *Brit. J. Cancer*, **89** (2003b) 775-776.
- Mucci, Lorelei A.; Adami, Hans-Olov; Wolk, Alicja - "Prospective study of dietary acrylamide and risk of colorectal cancer among women". *Int. J. Cancer*, **118** (2006) 169-173.
- Mucci, Lorelei *et. al.* - "Dietary Acrylamide and Risk of Renal Cell Cancer". *Int. J. Cancer*, **109** (2004) 774-776.

- Murkovic, M. - "Acrylamide in Austrian foods". *J. Biochem. Bioph. Meth.*, **61** (2004) 161-167.
- Murkovic, Michael; Derler, Karin - "Analysis of amino acids and carbohydrates in green coffee". *J. Biochem. Bioph. Meth.*, **69** (2006) 25-32.
- Navarini, L. et. al. - "Polysaccharides from hot water extracts of roasted *Coffea Arabica* beans: isolation and characterization". *Carbohydr. Polym.*, **40** (1999) 71-81.
- Nawrot, P. et. al. - "Effects of caffeine on human health". *Food Addit. Contam.*, **20**, n° 1 (2003) 1-30.
- Nemoto, Satoru et. al. - "Determination of Acrylamide in Foods by GC/MS Using ¹³C-Labeled Acrylamide as an Internal Standard". *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **43**, n°6 (2002) 371-376.
- Nielsen, Nikoline J. et. al. - "A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of acrylamide and the precursors, asparagine and reducing sugars in bread". *Anal. Chim. Acta*, **557** (2006) 211-220.
- Noti, Anja et. al. - "Storage of potatoes at low temperatures should be avoided to prevent increased acrylamide formation during frying or roasting". *Mitt. Lebensm. Hyg.*, **94** (2003) 167-180.
- Nunes, Carlos Simões; Baptista, António Oliveira - "Implicações da reacção de Maillard nos alimentos e nos sistemas biológicos. Implications of the Maillard reaction in food and in biological systems". *RPCV*, **96** n° 538 (2001) 53-59.
- Nunes, Fernando et. al. - "Foamability, Foam Stability, and Chemical Composition of Espresso Coffee As Affected by the Degree of Roast". *J. Agr. Food Chem.*, **45** (1997) 3238-3243.
- Nunes, Fernando M.; Coimbra, Manuel A. - "Influence of polysaccharide composition in foam stability of espresso coffee". *Carbohydr. Polym.*, **37** (1998) 283-285.
- Ohara-Takada et. al. - "Change in Content of Sugars and free Amino Acids in potato Tubers under Short-term Storage at Low Temperature and the Effect on Acrylamide Level after Frying". *Biosci. Biotech. Bioch.*, **69**, n°7 (2005) 1232-1238.
- Oku, Kazuyuki et. al. - "Suppressive Effect of Trehalose on Acrylamide Formation from Asparagine and reducing Saccharides". *Biosci. Biotech. Bioch.*, **69**, n°8 (2005) 1520-1526.
- Olano, A.; Martínez-Castro, I. - "Nonenzymatic Browning". In Mollet, L.M.L. - "Handbook of Food Analysis". Nova Iorque: Marcel Dekker, 1996. ISBN: 0-8247-9683-2. Volume 2, Capítulo 41.
- Ono, H. et. al. - "Analysis of acrylamide by LC-MS/MS and GC-MS in processed Japanese foods". *Food Addit. Contam.*, **20**, n°3 (2003) 215-220.
- Oosterveld, A. et. al. - "Extraction and characterization of polysaccharides from green and roasted *Coffea Arabica* beans". *Carbohydr. Polym.*, **52** (2003) 285-296.
- Ötles, Semih; Ötles, Serkan. - "Acrylamide in food. Chemical structure of acrylamide". *Electron. J. Environ. Agr. Food Chem.*, **3**, n° 5 (2004). ISSN 1579-4377.
- Pabst, K. et. al. - "Acrylamide-occurrence in mixed concentrate feed for dairy cows and carry-over into milk". *Food Addit. Contam.*, **22**, n°3 (2005) 210-213.
- Paleologos, E.K.; Kontominas, M.G. - "Determination of acrylamide and methacrylamide by normal phase high performance liquid chromatography and UV detection". *J. Chromatogr. A*, **1077** (2005) 128-135.
- Pedersen, Jörgen; Olsson, Jim O. - "Reply to the "Comments on "Soxhlet extraction of acrylamide from potato chips" by K. Grob et. al., *Analyst*, 2004, 129, 92; J.W.DeVries et. al., *Analyst*, 2004, 129, 93; M.Tanakja et. al., *Analyst*, 2004, 129, 96". *Analyst*, **129** (2004) 99.

- Pedersen, Jörgen; Olsson, Jim O. - "Soxhlet extraction of acrylamide from potato chips". *Analyst*, **128** (2003) 332-334.
- Pedreschi, Franco *et. al.* - "Color changes and acrylamide formation in fried potato slices". *Food Res. Int.*, **38** (2005) 1-9.
- Pedreschi, Franco *et. al.* - "Color development and acrylamide content of pre-dried potato chips". *J. Food Eng.*, **79** (2007) 786-793.
- Pedreschi, Franco; Kaack, Karl; Granby, Kit - "Acrylamide content and color development in fried potato strips". *Food Res. Int.*, **39** (2006) 40-46.
- Pedreschi, Franco; Kaack, Karl; Granby, Kit - "Reduction of acrylamide formation in potato slices during frying". *LWT*, **37** (2004) 679-685.
- Pellucci, Claudio *et. al.* - "Dietary acrylamide and human cancer". *Int. J. Cancer*, **118** (2006) 467-471.
- Peng, Liming *et. al.* - "Rapid and Reproducible Extraction of Acrylamide in French Fries Using a Single Solid-Phase Sorbent". Application Note, American Laboratory (2003) 10-14.
- Pérez, Hermes Licea *et. al.* - "Simultaneous Analysis of Hemoglobin Adducts of Acrylamide and Glycidamide by Gas Chromatography-Mass Spectrometry". *Anal. Biochem.*, **274** (1999) 59-68.
- Pérez, Hermes Licea; Osterman-Golkar, Siv. - "A sensitive gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for detection of alkylating agents in water: Application to acrylamide in drinking water, coffee and snuff". *Analyst*, **128** (2003) 1033-1036.
- Petersen, B. - "Acrylamide: Formation, Exposure, Possible Reduction Strategies (slide presentation)". FAO/WHO Seminar on: *Acrylamide in Food: Current State of Affairs*, Arusha, Tanzania, 16 March, 2003. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa/acrylamide/program.htm>. Consultado em 2006/04/06.
- Petersson, Erik V. *et. al.* - "Critical factors and pitfalls affecting the extraction of acrylamide from foods: An optimization study". *Anal. Chim. Acta*, **557** (2006) 287-295.
- Petryk, Norberto E. - "Como Conocer mas el Café". Fórum Cultural del Café, 2005. Disponível em: <http://www.alimentacion-sana.com.ar/informaciones/Chef/conocer%20el%20cafe.dwt>. Consultado em 2005/11/10.
- Pittet, Alain; Périsset, Adrienne; Oberson, Jean-Marie - "Trace level determination of acrylamide in cereal-based foods by gas chromatography-mass spectrometry". *J. Chromatogr. A*, **1035** (2004) 123-130.
- Plank, D.W.; Novak, D.J. - "Method for reducing acrylamide levels in food products and food products produced thereby". Patente nº WO2005018339 (2005). Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Consultado em 2006/02/21.
- Pokorný, J. - "Frying". In Henry, C.J.K. - "The nutrition handbook for food processors". Boca Raton: CRC Press, 2000. ISBN: 0-8493-1543-3. Capítulo 12.
- Pollien, Philippe *et. al.* - "Proton Transfer Recation Mass Spectrometry, a Tool for On-Line Monitoring of acrylamide Formation in the Headspace of Maillard Reaction Systems and Processed Food". *Anal. Chem.*, **75** (2003) 5488-5494.
- Portaria nº 268/80. Diário da República (D.R.) nº 116/80, Série I - de 1980-05-20. Disponível em: <http://dre.pt/pdfgratis/1980/05/11600.PDF>. Consultado em 2005/12/12.
- Proteste - "Acrilamida nas batatas fritas- Uma ligação indesejável". DECO (Defesa do Consumidor) nº 254, Janeiro de 2005.

- Raloff, J. - "FDA launches acrylamide investigations". *Science News Online*, **162**, nº 15 (2002). Disponível em: <http://www.sciencenews.org/20021012/food.asp>. Consultado em 2005/11/12.
- Ramalakshmi, K.; Raghavan, B. - "Caffeine in Coffee: Its Removal. Why and How?". *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **39**, 5, (1999) 441-456.
- Ramli, N. et. al. - "Influence of roasting conditions on volatile flavor of roasted Malaysian cocoa beans". *J. Food Process. Pres.*, **30** (2006).280-298,.
- Redgwell, Robert J. et. al. - "Effect of roasting on degradation and structural features of polysaccharides in Arabica coffee beans". *Carbohydr. Res.*, **337** (2002) 421-431.
- Ren, Yiping et. al. - "Sensitive isotope dilution liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry method for the determination of acrylamide in chocolate". *Food Addit. Contam.*, **23**, nº3 (2006) 228-236.
- Reynolds, Tom - "Acrylamide and Cancer: Tunnel Leak in Sweden Prompted Studies". *J. Natl. Cancer I.*, **94**, nº 12 (2002) 876-878..
- Ribani, Marcelo et. al. - "Validação em métodos cromatográficos e electroforéticos". *Quim. Nova*, **27**, nº 5 (2004) 771-780.
- Riediker, Sonja; Stadler, Richard H. - "Analysis of acrylamide by isotope-dilution liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry". *J. Chromatogr. A*, **1020** (2003) 121-130.
- Roach, John A. et. al. - "Rugged LC-MS/MS Survey Analysis for Acrylamide in Foods". *J. Agr. Food Chem.*, **51** (2003) 7547-7554.
- Robarge, Trisa; Philips, Eric; Conoley, Meredith - "Optimizing the Analysis of Acrylamide in Food by Quadrupole GC/MS". Thermo Electron Application Note AN 9195, 2003b.
- Robarge, Trisa; Philips, Eric; Conoley, Meredith. - "Analysis of Acrylamide in Food by GC-MS". Food and Beverage, The Application Book, 2003a, Thermo Electron Corporation. Disponível em: <http://www.lcgceurope.com/lcgceurope/data/articlestandard/lcgceurope/342003/67336/article.pdf>. Consultado em 2006/01/16.
- Rohsius, C.; Matissek, Reinhard.; Lieberei, R. - "Free amino acid amounts in raw cocoas from different origins". *Eur. Food Res. Technol.*, **222** (2006) 432-438.
- Rosén, Johan; Hellenäs, Karl-Erik - "Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry". *Analyst*, **127** (2002) 880-882.
- Rothweiler, Bernhard; Kuhn, Eberhardt; Prest, Harry. - "GC-MS Approaches to the Analysis of Acrylamide". PittCon 2003 Poster, Agilent Technologies.
- Rovira, Josep. - "El café soluble". Fórum Cultural del Café, 2005. Disponível em: <http://www.forum-cafe.com/documents/128.pdf>. Consultado em 2005/11/10.
- Rufián-Henares, José; Morales, Francisco J. - "Determination of acrylamide in potato chips by a reversed-phase LC-MS method based on a stable isotope dilution assay". *Food Chem.*, **97** (2006) 555-562.
- Rupp, Heidi - "Chemical and physical hazards produced during food processing, storage and preparation". In Schmidt, Ronald H.; Rodrick, Gary E., eds. - "Food safety handbook". New Jersey: John Wiley e Sons, 2003. ISBN: 0-471-21064-1. Capítulo 13.
- Rydberg, Per et. al. - "Investigations of Factors That Influence the Acrylamide Content of Heated Foodstuffs". *J. Agr. Food Chem.*, **51** (2003) 7012-7018.

- Sahagian, M.; Van Eijck, P. - "Method of reducing acrylamide in food products". Patente nº WO2005025330 (2005). Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Consultado em 2006/02/21
- Schabacker, Jens; Schwend, Thomas; Wink, Michael. - "Reduction of Acrylamide Uptake by Dietary Proteins in a Caco-2 Gut Model". *J. Agr. Food Chem.*, **52** (2004) 4021-4025.
- Schwartzberg, H.G. - "Modeling Bean Heating during Batch Roasting of Coffee Beans". In Welti-Chanes, Jorge *et al.* eds. - "Engineering and Food for the 21st Century". Boca Raton: CRC Press, 2002. ISBN: 1-56676-963-9. Capítulo 52.
- Şenyuva, H. Z.; Gökmen, V. - "Survey of acrylamide in Turkish foods by an in-house validated LC-MS method". *Food Addit. Contam.*, **22**, nº3 (2005a) 204-209.
- Şenyuva, Hamide Z.; Gökmen, Vural - "Interference-free determination of acrylamide in potato and cereal-based foods by a laboratory validated liquid chromatography-mass spectrometry method". *Food Chem.*, **97** (2006) 539-545.
- Şenyuva, Hamide Z.; Gökmen, Vural - "Study of acrylamide in coffee using an improved liquid chromatography mass spectrometry method: Investigation of colour changes and acrylamide formation in coffee during roasting". *Food Addit. Contam.*, **22**, nº3 (2005b) 214-220.
- Sikorski, Zdzisław E. - "The Effect of Processing on the Nutritional Value and Toxicity of Foods". In Dąbrowski, Waldemar M.; Sikorski, Zdzisław E., eds. - "Toxins in Food". Boca Raton *et al.*: CRC Press, 2005. ISBN: 0-8493-1904-8. Capítulo 13.
- Silvarolla, Maria B.; Mazzafera, Paulo; Fazuoli, Luiz C. - "Plant biochemistry: A naturally decaffeinated Arabica coffee". *Nature*, **429** (2004) 826.
- Singh, P.C.; Singh, R.K. - "Choosing an appropriate bioseparation technique". *Trends Food Sci. Tech.*, **7** (1996) 49-58.
- Smith, A.W. - "Introduction". In Clarke, R.J. e Macrae, R., ed. - "Coffee. Volume 1: Chemistry". 1ª Ed. Essex: Elsevier Science Publishers, 1985. ISBN: 0-85334-368-3. Capítulo 1.
- Smith, J. Scott; Hui, Y.H.; ed. - "Food Processing. Principles and Applications". 1ª ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2004. ISBN: 0-8138-1942-3.
- Søe, J.B.; Poulsen, C.H.; Boll, D.L. - "Enzymatic process for acrylamide reduction in foodstuffs". Patente nº WO2005096838 (2005). Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Consultado em 2006/02/21.
- Søe, J.B.; Poulsen, C.H.; Boll, D.L. - "Method". Patente nº AU2003276613 (2004). Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Consultado em 2006/02/21.
- Sola, Albert. - "Tostado e molido del Café". Fórum Cultural del Café, 2005. Disponível em: <http://www.forum-cafe.com/documents/129.pdf>. Consultado em 2005/11/10.
- Somoza, Veronika - "Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: An update". *Mol. Nutr. Food Res.*, **49** (2005) 1-10.
- Spiller, Monica Alton - "The Chemical Components of Coffee". In Spiller, Gene A., ed. - "Caffeine". Boca Raton: CRC Press, 1998b. ISBN: 0-8493-2647-8. Capítulo 6.
- Spiller, Monica Alton - "The coffee plant and its processing". In Spiller, Gene A., ed. - "Caffeine". Boca Raton: CRC Press, 1998a. ISBN: 0-8493-2647-8. Capítulo 5.
- Stadler, Richard H. *et al.* - "Acrylamide from Maillard reaction products". *Nature*, **419** (2002) 449-450.
- Stadler, Richard H. *et al.* - "In-Depth Mechanistic Study on the Formation of acrylamide and Other Vinylogous Compounds by the Maillard Reaction". *J. Agr. Food Chem.*, **52** (2004) 5550-5558.

- Stadler, Richard H.; Scholz, Gabriele – "Acrylamide: An Update on Current Knowledge in Analysis, Levels in Food, Mechanisms of Formation, and Potential Strategies of Control". *Nutr. Rev.*, **62**, nº12 (2004) 449-467.
- Studer, A.; Blank, I.; Stadler, R.H. – "Thermal Processing Contaminants in Foodstuffs and Potential Strategies of Control". *Czech J. Food Sci.*, **22** (2004) 1-10 (Special Issue).
- Sugimura, Takashi; Nagao, Minako; Wakabayashi, Keiji – "How we should deal with unavoidable exposure of man to environmental mutagens: cooked food mutagen discovery, facts and lessons for cancer prevention". *Mutat. Res.*, **447** (2000) 15-25.
- Sumner, S. C. J. et. al. – "Acrylamide: A comparison of metabolism and hemoglobin adducts in rodents following dermal, intraperitoneal, oral, or inhalation exposure". *Toxicol Sci.*, **75** (2003) 260-270.
- Sun et. al. – "Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by using Griess Reaction Assay". *Sensors*, **3** (2003) 276-284.
- Surdyk, Nicolas et. al. – "Effects of Asparagine, Fructose, and Baking Conditions on Acrylamide Content in Yeast-Leavened Wheat Bread". *J. Agr. Food Chem.*, **52** (2004) 2047-2051.
- Svensson, K. et. al. – "Dietary intake of acrylamide in Sweden". *Food Chem. Toxicol.*, **41** (2003) 1581-1586.
- SWISS Federal Office of Public Health – "Determination of acrylamide in food". Berna, 2002. Disponível em: http://www.bag.admin.ch/verbrau/newsarchiv/d/AA_methode.pdf. Consultado em 2005/05/15.
- Taeymans, Dominique et. al. – "A Review of Acrylamide: An Industry Perspective on Research, Analysis, Formation and Control". *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **44** (2004) 323-347.
- Tanaka Masaharu et. al. – "Comment on "Soxhlet extraction of acrylamide from potato chips" by J.R.Pedersen and J.O.Olsson, Analyst, 2003, 128, 332". *Analyst*, **129** (2004) 96-98.
- Tareke, E. et. al. – "Acrylamide: A Cooking Carcinogen?". *Chem. Res. Toxicol.*, **13** (2000) 517-522.
- Tareke, Eden et. al. – "Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs". *J. Agr. Food Chem.*, **50** (2002) 4998-5006.
- Taubert, Dirk et. al. – "Influence of Processing Parameters on Acrylamide Formation during Frying of Potatoes". *J. Agr. Food Chem.*, **52** (2004) 2735-2739.
- Taubert, Dirk et. al. – "The garlic ingredient diallyl sulfide inhibits cytochrome P450 2E1 dependent bioactivation of acrylamide to glycidamide". *Toxicol. Lett.*, **164** (2006) 1-5.
- Thompson, S.; Miller, K.; Lopez, A. – "Cocoa and Coffee". In Doyle, M.P. et. al. eds. – "Food Microbiology - Fundamentals and Frontiers". Washington: ASM Press, 2001. ISBN: 1-55581-208-2. Capítulo 35.
- Torbjörn, Albért. – "Acrylamide is formed during the preparation of food and occurs in many foodstuffs". Press release from Livsmedelsverket, National Food Administration, 24 de Abril 2002. Disponível em: http://www.slv.se/templates/SLV_Page.aspx?id=6182. Consultado em 2005/11/12.
- Tricoit, J.; Salucki, L.; Rousset, G. – "Method for preventing acrylamide formation during heat-treatment of food". Patente nº EP1419703 (2004). Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Consultado em 2006/02/21.
- Tritscher, Angelika M. – "Human health risk assessment of processing-related compounds in food". *Toxicol. Lett.*, **149** (2004) 177-186.
- Trugo, L.C. – "Carbohydrates". In Clarke, R.J. e Macrae, R., ed.- "Coffee. Volume 1: Chemistry". 1ªEd. Essex: Elsevier Science Publishers, 1985. ISBN: 0-85334-368-3. Capítulo 3.

- Twaddle, N. C. *et. al.* - "Autoclave sterilization produces acrylamide in rodent diets: Implications for toxicity testing". *J. Agr. Food Chem.*, **52** (2004) 4344-4349.
- US EPA Method 8032A - "Acrylamide by Gas Chromatography". Revisão 1, 1996. Disponível em: <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/8032a.pdf>. Consultado em 2005/05/15.
- US EPA Method 8316 - "Acrylamide, Acrylonitrile and Acrolein by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)". Revisão 0, 2004. Disponível em: <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/8316.pdf>. Consultado em 2005/05/15.
- US FDA Draft Analytical Method - "Detection and Quantification of Acrylamide in Foods". 2003. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/acrylami.html>. Consultado em 2005/05/15.
- USFDA-CFSAN, S. Food and Drug Administration - Center for Food Safety and Applied Nutrition. *Pesticides, Metals, Chemical Contaminants & Natural Toxins*. (2006). Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/pestadd.html#acrylamide>. Consultado em 2006/04/06.
- Van der Meer, H.J.J. - "Process for the roasting of cocoa". Patente nº WO2006008627 (2006). Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Consultado em 2006/02/21.
- Vass, M. *et. al.* - "Ways to Reduce the Acrylamide Formation in Cracker Products". *Czech J. Food Sci.*, **22** (2004) 19-21 (Special Issue).
- Vattem, Dhiraj A.; Shetty, Kalidas - "Acrylamide in food: a model for mechanism of formation and its reduction". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **4** (2003) 331-338.
- Vivanti, Vittorio; Finotti, Enrico; Friedman, Mendel - "Level of Acrylamide Precursors Asparagine, Fructose, Glicose, and Sucrose in Potatoes Sold at Retail in Italy and in the United States". *J. Food Sci.*, **71** (2006) C81-C85. Disponível em: www.ift.org. Consultado em 2005/05/15.
- Warner, K. - "Chemical and Physical Reactions in Oil During Frying". In Gupta, M.K *et. al.*, eds. - "Frying Technologies and practices". Champaign: AOCS Press, 2004. ISBN: 1-893997-31-6. Capítulo 2.
- Wenzl, T.; De La Calle, Beatriz; Anklam, E. - "Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review". *Food Addit. Contam.*, **20** (2003) 885-902.
- Wenzl, Thomas *et. al.* - "Evaluation of the results from an inter-laboratory comparison study of the determination of acrylamide in crispbread and butter cookies". *Anal. Bioanal. Chem.*, **379** (2004) 449-457.
- Williams, J.S.E. - "Influence of variety and processing conditions on acrylamide levels in fried potato crisps". *Food Chem.*, **90** (2005) 875-881.
- Yang, C.S. *et. al.* - "Mechanisms of inhibition of chemical toxicity and carcinogenesis by diallyl sulfide (DAS) and related compounds from garlic". *J. Nutr.*, **131** (2001) 1041S-1045S.
- Yasuhara, Akiō *et. al.* - "Gas Chromatographic Investigation of Acrylamide Formation in Browning Model Systems". *J. Agr. Food Chem.*, **51** (2003) 3999-4003.
- Yaylayan, V. A. *et. al.* - "The role of creatine in the generation of N-methylacrylamide: A New toxicant in cooked meat". *J. Agr. Food Chem.*, **52** (2004) 5559-5565.
- Yaylayan, Varoujan; Wnorowski, Andrzej; Locas, Carolina Perez - "Why Asparagine Needs Carbohydrates to Generate Acrylamide". *J. Agr. Food Chem.*, **51** (2003) 1753-1757.
- Young, Michael S.; Jenkins, Kevin M.; Mallet, Claude R. - "Solid-Phase Extraction and Cleanup Procedures for Determination of Acrylamide in Fried Potato Products by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry". *JAOAC*, **87**, nº4 (2004) 961-964.

- Yusá, V. *et. al.* -"Determination of acrylamide in foods by pressurized fluid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry used for a survey of Spanish cereal-based foods". *Food Addit. Contam.*, **23**, nº3 (2006) 237-244.
- Zhang, Y.; Zhang, G.; Zhang, Y.; "Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods: Review and recent developments". *J. Chromatogr. A*, **1075** (2005a) 1-21.
- Zhang, Yu, *et. al.* -"Determination of acrylamide in infant cereal-based foods by isotope dilution liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry". *Anal. Chim. Acta*, **551** (2005b) 150-158.
- Zlobine, Michael. -"El café descafeinado". Fórum Cultural del Café, 2005. Disponível em <http://www.forum-cafe.com/documents/143.pdf>. Consultado em 2005/11/10.
- Zyzak, D.V. *et. al.* -"Method for reducing acrylamide in foods, foods having reduced levels of acrylamide". Patente nº WO2004047560 (2004). Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Consultado em 2006/02/21.
- Zyzak, David *et. al.* -"Acrylamide Formation Mechanism in Heated Foods". *J. Agr. Food Chem.*, **51** (2003) 4782-4787.

