

Susana Isabel Pereira Casal

COMPOSTOS NITROGENADOS DO CAFÉ

Desenvolvimento de metodologias analíticas
e sua aplicação na discriminação de espécies
e no controlo da intensidade da torra



PORTO
2004

Susana Isabel Pereira Casal

Licenciada em Ciências Farmacêuticas

COMPOSTOS NITROGENADOS DO CAFÉ

Desenvolvimento de metodologias analíticas
e sua aplicação na discriminação de espécies
e no controlo da intensidade da torra

Porto

2004

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

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e Tecnologia e do Fundo Social Europeu, no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio (PRAXIS XXI/BD/9580/96 e PBIC/TPR/2565/95).

Foi realizado no Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, sob orientação da Professora Doutora Margarida Alice Ferreira e co-orientação da Professora Doutora Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira e da Professora Doutora Maria de Lurdes Bastos.

À Rita
Ao Pedro
Ao Paulo

Resumo

A discriminação das espécies de café comercialmente mais importantes, arábica e robusta, e da sua proveniência geográfica, bem como do tipo de torra (intensidade) à qual são sujeitos, tem constituído um tema de grande interesse para todos os sectores envolvidos no comércio e consumo de café.

Encontrar marcadores químicos que permitam tais discriminações, foi um dos objectivos do trabalho que se apresenta, incidindo essa pesquisa essencialmente sobre a fracção nitrogenada deste produto, nomeadamente sobre os compostos cafeína, trigonelina, ácido nicotínico, D-aminoácidos, aminas biogénicas, aminas heterocíclicas aromáticas e 4-metilimidazol.

Para concretizar esse objectivo desenvolveram-se, numa primeira fase, metodologias analíticas para quantificação destes compostos na matriz café, utilizando vários processos extractivos e diferentes métodos de derivatização. Recorreu-se sempre à quantificação por métodos cromatográficos, acoplados a diversos tipos de detectores, nomeadamente HPLC/DAD, HPLC/DAD/FL, GC/FID e GC/MS.

Dos estudos efectuados, os D/L-aminoácidos e as aminas biogénicas, principalmente a putrescina, parecem ser os que merecem maior destaque na discriminação das duas espécies botânicas. Estes compostos permitiram ainda distinguir o tipo de tratamento a que as bagas de café são submetidas, com vista à obtenção do café verde comercial, isto é, o processamento a seco ou a húmido. Nenhum dos grupos de compostos avaliados permitiu, só por si, a discriminação geográfica dos cafés, não sendo de excluir que o tratamento estatístico da globalidade dos dados obtidos possa dar uma achega valiosa a esse propósito.

Para controlo da intensidade do processo de torra avaliaram-se os diferentes compostos em amostras de café sujeitas a torras experimentais. Merecem destaque:

- i) a degradação da trigonelina, dos aminoácidos livres e das aminas biogénicas;
- ii) a formação de ácido nicotínico, de D-aminoácidos, de harmane, norharmane e de 4-metilimidazol;
- iii) o diferente comportamento verificado nas espécies estudadas.

Dos parâmetros avaliados, o 4-metilimidazol parece ser o composto que melhor poderá vir a elucidar quanto à intensidade da torra, devido à sua aparente independência quanto à espécie, justificando-se mais estudos neste sentido.

Résumé

La discrimination des espèces de café, commercialement plus importantes, arabica et robusta, ainsi que leur origine géographique et le type de torréfaction auquel ils sont soumis (son intensité), constituent une matière de grand intérêt pour tous les secteurs liés au commerce et à la consommation du café.

Trouver des marqueurs chimiques, permettant telles discriminations, a été un des objectifs de cette recherche qui traite, surtout, de la fraction nitrogenée de ce produit, principalement sur les composés suivants: caféine, trigonelline, acide nicotinique, D-acides aminés, amines biogéniques, amines hétérocycliques aromatiques et méthyl-4-imidazole.

Pour atteindre cet objectif, des méthodologies analytiques ont été développées, dans une première étape, pour quantifier ces composés dans la matrice du café, en utilisant de divers processus extractifs et des méthodes de dérivation. On a toujours utilisé des méthodes chromatographiques, accouplées à divers types de détecteurs, en particulier HPLC/DAD, HPLC/DAD/FL, GC/FID et GC/MS.

Des études effectuées, les D/L-acides aminés et les amines biogéniques, surtout la putrescine, semblent être ceux qui méritent être le plus distingués dans la discrimination des deux espèces botaniques. Ces composés ont aussi permis de distinguer le type de traitement auquel les cerises de café sont soumises, pour obtenir du café vert commercial, c'est-à-dire, le procédé à sec ou humide. Aucun des paramètres-type évalués a permis, tout seul, la discrimination géographique des cafés, sans oublier, cependant, que le traitement statistique, de l'ensemble des données obtenues, peut être un important apport sur ce sujet.

Pour le contrôle de l'intensité du procédé de la torréfaction, on a évalué les différents composés des échantillons de café, soumis à des torréfactions expérimentales. On peut distinguer:

- i) la dégradation de la trigonelline, des acides aminés libres et des amines biogéniques;
- ii) la formation de l'acide nicotinique, des D-acides aminés, de l'harmane, de l'norharmane et du méthyl-4-imidazole.
- iii) le différent comportement observé dans les espèces étudiées.

Des paramètres évalués, le méthyl-4-imidazole, semble être le composé qui pourra le mieux élucider quant à l'intensité de la torréfaction, étant donné son apparente indépendance de l'espèce, ce qui peut justifier d'autres études dans ce domaine.

Abstract

The discrimination of arabica and robusta coffee, the most representative coffee species, their geographical origins, as well as the roast performed (intensity), is a subject of major importance for those involved on coffee commerce and consume.

To search for chemical markers helpful in those discriminations has been one of the objectives of the work presented herein, devoted mainly to the nitrogenic fraction of this product, namely caffeine, trigonelline, nicotinic acid, D-aminoacids, biogenic amines, heterocyclic aromatic amines and 4-methylimidazole.

In order to fulfill this objective, accurate analytical methodologies for quantification of these compounds in coffee were developed, using several extraction methodologies and derivatization procedures. Quantification was achieved by chromatographic techniques coupled to several detectors, namely: HPLC/DAD, HPLC/DAD/FL, GC/FID and GC/MS.

From the studies performed, the D/L-aminoacids and the biogenic amines, namely putrescine, seem to be the ones deserving more attention in the discrimination of the two mentioned botanical species. These compounds were also able to distinguish the processing type performed on the coffee cherries in order to obtain the green commercial coffee, dry or wet. The geographical origin discrimination based on the compounds individually was not possible, but this possibility should not be discarded before a statistical treatment of the total data.

For the roasting process control, the different compounds were analyzed on several coffee samples submitted to experimental roasts. It is worth mentioning:

- i) the degradation of trigonelline, free aminoacids and biogenic amines;
- ii) the formation of nicotinic acid, D-aminoacids, harmine, norharmine and 4-methylimidazole;
- iii) the different behavior observed in the two species under evaluation.

From the evaluated compounds, the 4-methylimidazole seems to be the one that could give more insight as to the roast degree measurement, due to its apparent independency from the coffee species, requiring more studied on this filed.

**Trabalhos desenvolvidos no decurso da preparação desta dissertação:
publicações/resumos/comunicações**

Publicações em revistas estrangeiras:

1. Development of an HPLC/Diode-array detector method for simultaneous determination of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee
S. Casal, M.B. Oliveira and M.A. Ferreira
Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 21 (20), 3187-3195, 1998
2. HPLC/Diode-array Applied to the Thermal Degradation of Trigonelline, Nicotinic Acid and Caffeine in Coffee
S. Casal, M. Beatriz Oliveira and Margarida A. Ferreira
Food Chemistry, 68, 481-485, 2000
3. Discriminante Analysis of Roasted Coffees Varieties for Trigonelline, Nicotinic acid and Caffeine content
S. Casal, M.B. Oliveira, M.R. Alves and M.A. Ferreira
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 3420-3424, 2000
4. Rapid gas chromatographic quantification of amino acid enantiomers in food matrices by their N(O,S)-ethoxycarbonyl heptafluorobutyl esters derivatives
S. Casal, M. Beatriz Oliveira and Margarida A. Ferreira
Journal of Chromatography A, 866, 221-230, 2000
5. Determination of biogenic amines in coffee by an optimised liquid chromatographic method
S. Casal, M.B.P.P. Oliveira, M. A. Ferreira
Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 25 (16), 2535-2549, 2002
6. Gas chromatographic-mass spectrometric quantification of 4-(5-)-methylimidazole in roasted coffee after ion-pair extraction
S. Casal, J.O. Fernandes, M.B.P.P. Oliveira, M.A. Ferreira
Journal of Chromatography A, 976, 285-291, 2002
7. Discrimination between arabica and robusta coffee species on the basis of their amino acid enantiomers
S. Casal, M. Rui Alves, Eulália Mendes, M. Beatriz P.P. Oliveira, Margarida A. Ferreira
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 6495-6501, 2003

-
8. Analysis of heterocyclic aromatic amines in food by gas-chromatography-mass spectrometry as their *tert*-butyldimethylsilyl derivatives
S. Casal, E. Mendes, J.O. Fernandes, M.B.P.P. Oliveira, M.A. Ferreira
Journal of Chromatography A, 1040, 105-114, 2004
 9. Roast effects on coffee amino acid enantiomers
S. Casal, E. Mendes, M.B.P.P. Oliveira, M.A. Ferreira
Food Chemistry, in press, 2004
 10. Discrimination between arabica and robusta coffee based on their free and conjugated biogenic amines.
S. Casal, Eulália Mendes, M.R. Alves, R.C. Alves, M.B.P.P. Oliveira and M.A. Ferreira.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, submetido
 11. Roast effects on coffee free and conjugated polyamines
S. Casal, Eulália Mendes, M. Beatriz Oliveira, Margarida A. Ferreira
Food Chemistry, submetido

Publicações em revistas nacionais:

1. A importância dos D-aminoácidos no controlo de qualidade dos produtos alimentares
Susana Casal, M. Beatriz Oliveira e Margarida A. Ferreira
Revista Portuguesa de Farmácia, XLIX(2), 81-86, 1999
2. Aminas heterocíclicas aromáticas: implicações da sua presença nos alimentos tratados termicamente
Susana Casal, M. Beatriz Oliveira e Margarida A. Ferreira
Revista Portuguesa de Farmácia, XLX(2), 65-79, 2000

Resumos:

1. Development of a chiral HRGC method for rapid quantification of amino acids enantiomers in food matrices by ethylchloroformate derivatization in aqueous media
S. Casal, J. O. Fernandes, M. B. Oliveira e M. A. Ferreira
Amino Acids, 17, 62, 1999

Comunicações:

1. Thermodegradation Study of Trigonelline, Caffeine and Nicotinic acid in *Coffea arabica* and *Coffea canephora* var. *robusta*
Susana Casal, M. Beatriz Oliveira and Margarida A. Ferreira
Poster - XXVII Reunión Int. Grupo de Cromatografía e Técn. Afines, Lugo, Julho, 1998
2. Simultaneous determination of trigonelline, caffeine and nicotinic acid in roasted coffee by HPLC/Diode-array detector
Susana Casal, M. Beatriz Oliveira and Margarida A. Ferreira
Oral - IV Congresso Int. de Química de la ANQUE, Lugo, Setembro, 1998
3. Trigonelline, Nicotinic acid and Caffeine in Coffee Varieties discrimination and Roasting Quality Control
S. Casal, M.B. Oliveira and M.A. Ferreira
Poster - I Meeting of REQUINTE, Porto, Fevereiro, 1999
4. Café: relação entre possíveis marcadores de autenticidade (ácidos gordos, cafeína e trigonelina)
Rui Alves, Beatriz Oliveira, Susana Casal e Margarida A. Ferreira
Poster - 4º Encontro de Química dos Alimentos, Coimbra, Junho, 1999
5. Development of a chiral HRGC method for rapid quantification of amino acids enantiomers in food matrices by ethylchloroformate derivatization in aqueous media
S. Casal, J.O Fernandes, M.B. Oliveira and M.A. Ferreira
Oral - 6th International Congress on Amino Acids, Bonn, Germany, Agosto, 1999
6. Determinação de enantiómeros de aminoácidos em alimentos na forma de ésteres N(O,S)-etoxicarbonil heptafluorobutílicos
Susana Casal, J.O. Fernandes, M.Beatriz Oliveira e Margarida A. Ferreira
Poster - 1º Encontro Nacional de Cromatografia, Dezembro, Lisboa, 1999
7. Nutritional and technological significance of amino acid enantiomers in foods
S. Casal, M.B. Oliveira and M.A. Ferreira
Oral - "NMFST 2000", Abril, Porto, 2000
8. Coffee amino acid enantiomers profile: evolution with roast
S. Casal, B. Macedo, J.O. Fernandes, M.B.P.P. Oliveira and M.A. Ferreira
Poster - 11th World Congress Food Science and Technology, Seoul, Coreia, Abril, 2001

-
9. Optimização de uma metodologia de HPLC para determina o de aminas biogénicas em café
S. Casal, I. Judas e M.B.P.P. Oliveira
Poster - 5^o Encontro de Química dos Alimentos, Porto, Maio, 2001
 10. Characterization of free amino acid enantiomers of arabica and robusta coffee varieties
S. Casal, M.B.P.P.Oliveira, M.R. Alves, and M.A. Ferreira
Oral - 19th international Conference on Coffee Science, Trieste, Itália, Maio, 2001
 11. Characterization of amino acid enantiomers in coffee
S. Casal, E. Mendes, R. Alves, I.M.L.P.V.O. Ferreira, M.B. Oliveira
Poster - International Congress on Amino Acids, Viena, Austria, Agosto, 2001
 12. Free amino acid enantiomers in arabica and robusta coffee beans
S. Casal, M.R. Alves, M.B.P.P. Oliveira e M.A. Ferreira
Poster - II Meeting of REQUIMTE, Monte da Caparica, Setembro, 2001
 13. 4(5)methylimidazole in roasted coffee: GC-MS quantification after ion-pair extraction
S. Casal, J.O. Fernandes, M.B.P.P. Oliveira and M.A. Ferreira
Poster - 7-HTC, Brugges, Bélgica, Fevereiro, 2002
 14. For a Greener Coffee
S. Casal, J.O. Fernandes, M.B.P.P. Oliveira and M.A. Ferreira
Oral – III Meeting of REQUIMTE, Fátima, Janeiro, 2004

Objectivos

Iniciais

Este trabalho teve por objectivo principal contribuir para um melhor conhecimento da fracção nitrogenada do café, visando encontrar marcadores químicos que permitam: i) discriminar as espécies comercialmente mais importantes, arábica e robusta; ii) controlar a intensidade do processo de torra.

Decorrentes do desenvolvimento do trabalho

Na sequência dos trabalhos desenvolvidos surgiu ainda a possibilidade de distinguir o tipo de processamento empregue na obtenção do café verde a partir das sementes em natureza, a seco ou a húmido. A possibilidade da discriminação geográfica foi também abordada em certos casos.

Organização do trabalho

A presente dissertação encontra-se estruturada em 3 partes. A parte teórica, onde se faz uma introdução ao tema café e a cada grupo de compostos estudados. Uma segunda parte experimental, onde são apresentados todos os trabalhos realizados e publicados e, finalmente, uma terceira parte onde se discutem os resultados obtidos e se retiram possíveis conclusões.

A parte teórica é apresentada em português e encontra-se subdividida em dois capítulos. No primeiro, intitulado de introdução geral, apresenta-se o café, a sua importância comercial e os processamentos a que é sujeito nos países produtores. Refere-se com algum detalhe o processo de torra, bem como as várias aproximações descritas na literatura com vista ao controlo de qualidade do café.

Num segundo capítulo faz-se uma revisão da literatura no que concerne aos grupos de compostos estudados. As revisões levaram em conta o efeito biológico que resulta da sua ingestão, bem como a função biológica que desempenham no café verde. Destacam-se ainda as metodologias analíticas descritas na literatura para o seu doseamento.

Os resultados desta tese, que compreendem a parte experimental, apresentam-se na forma de publicações, antecedidos por um capítulo que trata da amostragem (capítulo 3). A decisão de apresentar a parte experimental desta forma resumida prende-se, essencialmente, com o facto de praticamente todos os resultados obtidos terem sido descritos nos artigos em causa, evitando, desta forma, repetições.

Os artigos correspondentes a cada composto, ou classe de compostos, encontram-se associados em diferentes capítulos (capítulos 4-8). De uma forma geral, cada capítulo é constituído por três artigos. O primeiro é dedicado ao desenvolvimento e optimização de métodos analíticos capazes de permitir uma correcta quantificação dos compostos na matriz café, caracterizada por uma elevada complexidade química, principalmente após a torra. Em alguns casos, dado o interesse de certas metodologias na determinação dos mesmos compostos noutros produtos, os métodos foram aplicados a outras matrizes.

O segundo trata da aplicação das metodologias desenvolvidas às diferentes amostras, visando a sua utilização como parâmetro discriminador dos cafés arábica e robusta. O terceiro artigo é dedicado ao estudo do comportamento dos referidos compostos durante o processo de torra.

Nos capítulos 7 e 8 da parte experimental apenas foi realizada a validação da técnica.

A última parte da tese compreende uma discussão geral dos resultados apresentados, concluindo-se da utilidade da fracção nitrogenada do café na discriminação das espécies e controlo da intensidade da torra.

Por forma a facilitar a consulta da bibliografia, apresentada naturalmente de forma pouco homogénea em cada artigo, apresenta-se, no final, uma listagem completa das referências bibliográficas citadas ao longo do texto.

Dado que a publicação dos artigos se iniciou em 1998 é inevitável que, por vezes, alguma informação ou comentário careça de actualização. O desenrolar da parte experimental na forma de artigos demonstra a evolução nos conhecimentos e experiência adquiridos ao longo do tempo. Como exemplo, cita-se a primeira técnica analítica desenvolvida, uma metodologia simples para determinação simultânea de três compostos por HPLC, e o desenvolvimento de um novo processo de derivatização para determinação de aminas heterocíclicas aromáticas por GC-MS.

Agradecimentos

À Professora Doutora Margarida expresso a minha admiração e reconhecimento pelos valiosos ensinamentos científicos transmitidos, pela oportunidade concedida de me iniciar na investigação científica na Bromatologia, e pela forma como sempre me responsabilizou, permitindo-me a liberdade de seguir o meu caminho.

À Professora Doutora Beatriz gostaria de agradecer a sincera amizade com que me distingue, e aos meus, o empenho e encorajamento que demonstrou ao longo deste trabalho, bem como as barreiras que, ao longo do meu percurso, foi levantando.

Agradeço ainda a todos os colaboradores do Serviço de Bromatologia que contribuíram para que este trabalho fosse uma realidade, em especial à Dra. Eulália, ao Doutor Zé e ao Dr. Rui Alves, mais directamente envolvidos.

Não poderia deixar de agradecer à empresa Brasileira, pela cedência das amostras, bem como à Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo apoio financeiro concretizado, na concessão da bolsa de doutoramento.

Aos meus Pais desejo exprimir a minha profunda gratidão pelas portas que sempre me abriram, pelas “asas” que me concederam, pelos sacrifícios que realizaram e pelo incentivo e apoio dedicados.

Ao meu irmão agradeço a sua amizade, carinho, preocupação e apoio sempre demonstrados.

Ao Paulo agradeço a sua preocupação constante, bem como a ajuda disponibilizada ao longo da execução deste trabalho.

Aos meus filhos peço desculpa pelas longas horas de ausência, não tanto física mas sobretudo em espírito.

A todos quantos, embora não expressamente referidos, deram o seu contributo, o meu muito obrigada.

Nem todos teremos percepção de como o café mudou o mundo...

Bebido por milhões de pessoas, tornou-se, segundo alguns, a segunda bebida mais consumida no mundo, a seguir à água. Foram mais de 5000 os expressos que, ao longo desta tese, fui saboreando...

Se assim é, deverá trazer-nos extraordinários benefícios: gostos e aromas deliciosos, virtudes estimulantes para o corpo e para o espírito e, acima de tudo, um admirável factor de convivialidade.

O café é um mensageiro...

Será o café uma complexa mistura de potenciais “nutracêuticos”?

...o tempo o dirá.

Preâmbulo

Resumo	VII
Résumé	VIII
Abstract	XIX
Publicações e comunicações	XI
Objectivos e organização do trabalho	XV
Agradecimentos	XVII
Índice	XIX
Abreviaturas	XXIII

Parte teórica

Capítulo 1 - Introdução geral	3
1.1. O café verde	5
1.1.1. A planta: classificação e origem	5
1.1.2. A importância económica do café	7
1.1.3. Tecnologia do café	10
1.1.3.1. Processamento a seco	12
1.1.3.2. Processamento a húmido	13
1.1.3.3. Benefício	14
1.1.4. Composição química	17
1.2. O café torrado	18
1.2.1. A torra	19
1.2.2. Alterações provocadas pela torra	23
1.2.2.1. Alterações físicas	24
1.2.2.2. Alterações químicas	26
1.3. Controlo de qualidade	28
1.3.1. Autenticidade	30
1.3.1.1. Origem botânica do café	32
1.3.1.2. Origem geográfica	36
1.3.2. Controlo da torra	37

Capítulo 2 – Compostos azotados avaliados no café	41
2.1. Cafeína	
2.1.1. Introdução	43
2.1.2. Fontes e consumo	44
2.1.3. Efeito biológico	45
2.1.4. Metodologias analíticas	51
2.2. Trigonelina e ácido nicotínico	
2.2.1. Introdução	53
2.2.2. Efeito nos humanos	54
2.2.3. Efeito nas plantas	55
2.2.4. Estudos no café	56
2.2.5. Metodologias analíticas	59
2.3. D/L-Aminoácidos	
2.3.1. Introdução	61
2.3.2. Origem	62
2.3.3. Efeito biológico	64
2.3.4. Importância dos D-AAs no controlo de qualidade	65
2.3.5. Metodologias analíticas	67
2.4. Aminas biogénicas	
2.4.1. Introdução	69
2.4.2. Origem	70
2.4.3. Importância fisiológica nos humanos	71
2.4.4. Importância fisiológica nas plantas	74
2.4.5. Metodologias analíticas	75
2.5. Aminas heterocíclicas aromáticas	
2.5.1. Introdução	77
2.5.2. Alimentação <i>versus</i> incidência de cancro	77
2.5.3. As aminas heterocíclicas aromáticas	78
2.5.4. Metabolismo e toxicidade das HAs	80
2.5.5. Factores que afectam a formação e a sua inibição	83
2.5.6. HAs <i>versus</i> café	85
2.5.7. Metodologias analíticas	86

2.6. 4-Metilimidazol	
2.6.1. Introdução	90
2.6.2. Ingestão pelos humanos	91
2.6.3. Ingestão pelos ruminantes	93
2.6.4. Toxicocinética, mutagenicidade e carcinogenicidade	94
2.6.5. Metodologias analíticas	95

Parte experimental

Capítulo 3 – Amostragem	99
3.1. Amostragem	101
3.2. Caracterização geral das amostras	102
3.3. Processos extractivos	103
Capítulo 4 – Cafeína, trigonelina e ácido nicotínico	105
Capítulo 5 – D, L- Aminoácidos	129
Capítulo 6 – Aminas biogénicas	157
Capítulo 7 – Aminas heterocíclicas aromáticas	195
Capítulo 8 – Metilimidazol	205
Discussão geral	215
Conclusões finais	231
Bibliografia	235

Abreviaturas

AA	- aminoácido
ADC	- descarboxilase da arginina (arginine decarboxilase)
asx	- ácido aspártico + asparagina
BEHPA	- hidrogenofosfato de bis(2-etil-hexilo) (bis(ethylhexyl)phosphate)
Cad	- cadaverina
CBD	- antracnose dos frutos verdes (Coffee Berry Disease)
5-CQA	- ácido 5-cafeoilquínico ou ácido clorogénico
CV%	- coeficiente de variação
CVA	- análise de variáveis canónicas (canonical variate analysis)
CZE	- electroforese capilar de zona (capillary-zone electrophoresis)
DA	- análise discriminante (discriminate analysis)
D-AA	- D-aminoácido
DAAO	- oxidase dos D-aminoácidos (D-aminoacid oxidase)
DAD	- detector de díodos
DAO	- diamino-oxidase
db, dw	- peso seco
DiMeIQx	- 2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina
ECF	- cloroformato de etilo (ethylchloroformate)
EI	- etilimidazol
EI-MS	- espectrometria de massa por impacto de electrões (electronic impact mass spectrometry)
ELSD	- detector evaporativo de dispersão de luz (evaporative light scattering detector)
EtOH	- etanol
FID	- detector de ionização em chama (flame ionization detector)
FL	- detector de fluorescência
FTIR	- espectroscopia de infra-vermelho por transformada de Fourier (Fourier-transform infrared spectroscopy)
GC x GC	- cromatografia gasosa multidimensional (comprehensive multidimensional GC)
Glu-P-1	- 2-amino-5-metildipirido[1,2- α :3',2'-d]imidazol
Glu-P-2	- 2-aminodipirido[1,2- α :3',2'-d]imidazol
glx	- ácido glutâmico + glutamina
H	- harmane
HAs	- aminas heterocíclicas aromáticas (heterocyclic aromatic amines)
HCAAs	- amidas de ácidos hidroxicinâmicos (hydroxycinnamic acid amides)
HFB	- heptafluorobutanol

HMF	- 5-hidroxi metilfurfuraldeído
HPSEC	- cromatografia líquida por exclusão de tamanho
IARC	- Agência Internacional para a Investigação do Cancro (International Agency for Research on Cancer)
iBuCF	- cloroformato de isobutilo (isobutilchloroformate)
iBuOH	- álcool isobutilico (isobutanol)
IC	- cromatografia iónica (ionic chromatography)
ICO	- Organização Internacional do Café (International Coffee Organization)
ICP-AES	- espectrometria de emissão atómica com plasma acoplado indutivamente (inductively coupled plasma atomic emission spectrometry)
ICP-MS	- espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (inductively coupled plasma mass spectrometry)
INC	- sistema internacional de numeração dos aditivos alimentares (International Numbering System)
IQ	- 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolina
IQx	- 2-amino-3-metilimidazo [4,5-f]quinoxalina
IRMS	- espectrometria de massa de razões isotópicas (isotope ratio mass spectrometry)
ITCA	- Associação Internacional de Técnicos de Caramelo (International Technical Caramel Association)
RMN	- ressonância magnética nuclear
IS	- padrão interno (internal standard)
L-AA	- L-aminoácido
LC-GC	- cromatografia líquida acoplada a cromatografia gasosa
LD ₅₀	- dose letal 50 (lethal dose, 50%)
<i>m/z</i>	- relação massa/carga dos fragmentos iónicos formados num espectro de massa
M ⁺	- ião molecular, pico de um espectro de massa que corresponde à molécula ionizada
MAO	- monoamino-oxidase
MECC	- cromatografia micelar electrocinética (micellar electrokinetic capillary chromatography)
MeIQ	- 2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]quinolina
MeIQx	- 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina
4-MI	- 4-(5-)metilimidazol ou 4-metil-1 <i>H</i> -imidazol
MS	- espectrometria de massa (mass spectrometry)
MSA	- ácido metilsulfónico (methylsulphonic acid)
MTBSTFA	- <i>N</i> -metil- <i>N</i> -tert-butildimetilsililtrifluoroacetamida

nc	- não calculado
nd	- não detectado
NH	- norharmane
NOAEL	- dose mais elevada para o qual não há efeito adverso observável (No Observable Adverse Effect Level)
NPD	- detector de azoto-fósforo (nitrogen-phosphorus detector)
ns	- não separado
ODC	- descarboxilase da ornitina (ornithine decarboxilase)
OMC	- 16-O-metilcafestol
OMS	- Organização Mundial de Saúde (WHO, World Health Organization)
OPA	- ortoftaldialdeído
ORL	- perda de massa com a torra (organic roast loss)
PAO	- poliamino-oxidases
PAs	- poliaminas
PCA	- ácido perclórico (perchloric acid)
PhIP	- 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina
Pip	- ácido pipecólico
PRS	- sílica, para extracção em fase sólida, com terminais de ácido propilsulfónico
PTR-MS	- reacção de transferência protónica - espectrometria de massa (proton-transfer-reaction mass spectrometry)
Put	- putrescina
Py	- piridina
R^2, r^2	- coeficiente de correlação (correlation coefficient)
RH	- fracção conjugada insolúvel das aminas biogénicas
RI	- detector de índice de refracção
RMR	- resposta molar relativa (relative molar response)
rpm	- rotações por minuto
RRTs	- tempos de retenção relativos (relative retention times)
RSD%	- desvio padrão relativo (relative standard deviation)
RT ou t_R	- tempo de retenção (retention time)
SAM	- S-adenosil-L-metionina
SCX	- coluna de extracção em fase sólida com propriedades de troca catiónica forte
SD	- desvio padrão (standard deviation)
Ser	- serotonina
SH	- fracção conjugada solúvel das aminas biogénicas
SIM	- monitorização selectiva de iões (selected ion monitoring)
SNC	- sistema nervoso central (CNS – central nervous system)
Spd	- espermidina (spermidine)

SPE	- extração em fase sólida (solid-phase extraction)
Spm	- espermina (spermine)
SPME	- microextração em fase sólida (solid-phase microextraction)
SSA	- ácido sulfosalicílico (sulfosalicylic acid)
TBDMCS	- <i>tert</i> -butildimetilclorosilano
TCA	- ácido tricloroacético (trichloroacetic acid)
TD50	- dose tóxica 50 (toxic dose, 50%)
THI	- 2-acetil-4-tetrahidroxibutilimidazol
Trp-P-1	- 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indol
Trp-P-2	- 3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-b]indol
Wt	- peso (weight)
β-Ala	- beta-alanina

PARTE TEÓRICA

Capítulo 1- Introdução geral

1.1. O café verde

1.1.1. A planta: classificação e origem

1.1.2. A importância económica do café

1.1.3. Tecnologia do café

1.1.3.1. Processamento a seco

1.1.3.2. Processamento a húmido

1.1.3.3. Benefício

1.1.4. Composição química

1.2. O café torrado

1.2.1. A torra

1.2.2. Alterações provocadas pela torra

1.2.2.1. Alterações físicas

1.2.2.2. Alterações químicas

1.3. Controlo de qualidade

1.3.1. Autenticidade

1.3.1.1. Origem botânica do café

1.3.1.2. Origem geográfica do café

1.3.2. Controlo da torra

1.1. O café verde

1.1.1. A planta: classificação e origem

O cafeeiro é um arbusto relativamente pequeno, originário de África, cultivado apenas nas regiões tropicais e subtropicais. A palavra café deriva do nome em latim do género a que pertence, *Coffea* L., um membro da família *Rubiaceae*. Das centenas de espécies de *Coffea*, apenas duas assumem importância económica: *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre. As variedades Típica e a Bourbon são as mais conhecidas da *C. arabica*. A variedade de *C. canephora* cultivada em maior escala é a Robusta. Existem ainda duas outras espécies comercializadas, embora com pouca expressão: a *C. liberica* e a *C. excelsa*. Para simplificar e tornar mais fácil a compreensão, os termos “arábica” e “robusta” serão utilizados ao longo desta dissertação, reportando-se respectivamente a *C. arabica* e *C. canephora robusta*.

Os países da América Central e do Sul produzem principalmente café arábica enquanto que os países africanos e do sudoeste asiático são os maiores produtores de robusta. O Brasil, líder na produção de arábica, tornou-se recentemente também o segundo produtor de robusta, a seguir à Indonésia (Illy, 1995).

O café arábica é o resultado de um cruzamento entre duas espécies selvagens de café, seguido de uma duplicação cromossómica espontânea. É uma espécie com características únicas dentro do género *Coffea* já que se apresenta alotetraplóide e autogâmica, contrariamente a todas as outras, diplóides e heterogâmicas. A autogamia permite a esta espécie manter mutações recessivas na sua população. Esta característica permitiu seleccionar as linhas genéticas mais interessantes, ao nível agronómico, bioquímico e organoléptico, explicando assim, em parte, o valor acrescentado desta espécie. As espécies arábica e robusta possuem, para além da diferença referida, muitas outras características distintas, nomeadamente de natureza botânica, agronómica e morfológica, resumidas na Tabela 1.1.

A obtenção de novas variedades por hibridação, tem por intuito combinar as melhores qualidades do café arábica e robusta, procurar melhores rendimentos na produção, grãos maiores e mais uniformes, melhor “flavour” da infusão, melhor adaptabilidade ao solo, variantes no teor de cafeína, entre outras características. Apesar de tudo, o maior desafio nesta área continua a ser o aumento da resistência a pragas e doenças (Banks, 1999).

Tabela 1.1 - Características do café verde*

Parâmetro	arábica	robusta
Clima ideal	temperado	húmido e quente
Altitude (m)	600-2200	0-800
Temperatura (°C)	15-24	16-36
Pluviosidade (mm/ano)	1200-2200	2200-3000
Cromossomas	44	22
Folha	pequena, oval	grande, larga
Flor, de branca a rosa	pequena	grande
Forma do fruto (cereja)	elipsoidal oblongo, 15mm	elipsoidal, 12 mm
Amadurecimento	7-9 meses	9-11 meses
Semente (mm)	5-13, oval convexa	4-8, arredondada

* Adaptado de Illy, 1995

Embora actualmente os híbridos sejam obtidos principalmente por via artificial, também existem alguns naturais, caso do “Híbrido de Timor”. Pensa-se ser oriundo do cruzamento interespecífico natural, entre café arábica e robusta, conferindo-lhe resistência contra a “ferrugem alaranjada” e alguma resistência à antracnose dos frutos verdes, ou CBD (Coffee Berry Disease) (Vossen, 2001).

A “ferrugem alaranjada” é a doença do cafeeiro mais comum em todo o mundo, sendo provocada pelo *Hemileia vastatrix*, um fungo parasita foliar. Por norma, provoca quebras de produção consideráveis e levou, em meados do século XIX, à devastação das culturas de café no Sri Lanka e Índia, que foram posteriormente substituídas por chá. Este fungo continua a ser uma ameaça para a produção de café sendo controlado preventivamente com fungicidas.

A CBD é provocada por uma forma virulenta do fungo *Colletotrichum kahawae*, e afecta directamente as bagas do café, estando praticamente restrita a África (Waller, 1985).

Para além destas importantes doenças há ainda a considerar as pragas, principalmente de insectos, conhecendo-se cerca de 900 espécies capazes de infestar esta colheita (Bardner, 1985).

Os grãos de café correspondem às sementes do cafeeiro. Estas encontram-se envolvidas por uma polpa, constituindo uma baga que vai adquirindo um tom avermelhado à medida que amadurece. Por esse facto é usualmente denominada de cereja ou baga do café (ver Figura 1.1). Por baixo da casca vermelha, existe uma polpa carnuda péctico-gelatinosa, o mesocarpo, a que se segue uma camada viscosa, o endocarpo ou pergaminho. O conjunto destas 3 camadas constitui o pericarpo (Prodolliet, 1996). No

interior de todas estas camadas existem geralmente duas sementes, os grãos de café propriamente ditos, que podem variar em tamanho, tonalidade, forma e densidade, de acordo com as condições de crescimento e o genótipo. A estrutura celular do grão de café é caracterizada por paredes muito grossas que tornam as sementes extremamente duras.

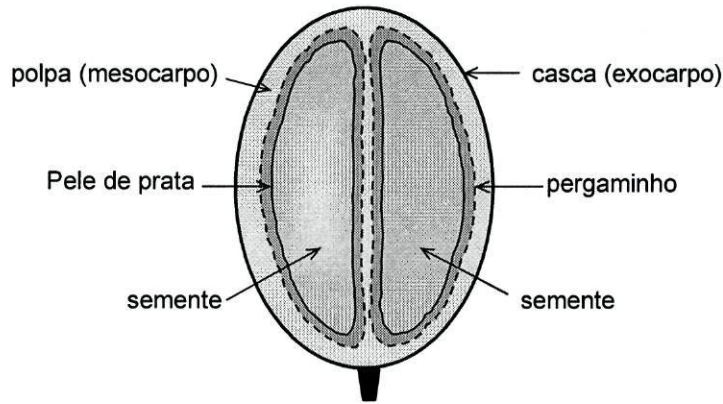


Figura 1.1 – Esquema de uma baga de café

1.1.2. A importância económica do café

O café, principalmente os sectores de produção e comercialização, desempenham um papel primordial na economia mundial. Embora não pertença ao grupo dos principais produtos agrícolas, caso do trigo, arroz, óleos ou açúcar, com volumes de produção mundial muito superiores, o café ocupa um lugar de relevo no comércio internacional, sendo apenas antecedido pelo petróleo (Smith, A., 1985).

A produção mundial é da ordem de 5 milhões de toneladas de café verde (Thorn, 1995), o que equivale a uma exportação de quase 90 milhões de “sacos”, unidade em que este comércio é definido, e que corresponde a 60 kg.

A sua produção é uma importante fonte de rendimento para mais de 70 países, constituindo, em alguns deles, mais de 80% das exportações. As actividades relacionadas com o café, nomeadamente o seu cultivo, processamento, transporte e comércio providenciam trabalho para milhões de pessoas em todo o mundo (ICO, 2004).

Em Portugal a indústria do café restringe-se à torrefacção, tendo uma importância reduzida no conjunto das indústrias alimentares e de bebidas. Contudo, na óptica das trocas externas, este produto tem um peso significativo, representando uma importante parcela das importações alimentares nacionais (Cidec, 1991). Em 2002 foram transaccionados cerca de

900 mil sacos, correspondendo ao dobro do café importado há quinze anos atrás (ICO, 2004).

Contrariamente à maioria dos países, Portugal importa uma maior percentagem de café robusta, verificando-se uma tendência para diminuir e aproximar-se dos padrões europeus. O seu principal fornecedor tem sido Angola, outrora uma grande potência na produção de café. Actualmente ocorre a sua substituição progressiva por café robusta do Brasil, onde é denominado “Conilon”. Também a Indonésia / Timor Leste tem surgido como um importante fornecedor de café robusta.

Portugal, além de consumir internamente, exporta ainda café torrado, principalmente para Espanha e Reino Unido.

O consumo *per capita* de café varia muito de país para país (ver Tabela 1.2), assumindo um valor de 1,1 kg/ano a nível mundial. Os países nórdicos são os maiores consumidores de café, com cerca de 9-11 kg/ano (4-5 chávenas/dia). Em Portugal o consumo aumentou de cerca de 2 kg/ano, há 20 anos atrás, para 4,2 kg/ano em 2001. Este valor, equivalente ao de Espanha, é já superior à média europeia, que se situa nos 3,9 kg/ano (FAOSTAT, 2004).

Tabela 1.2 - Consumo mundial de café *per capita* em 2001 (kg/ano)*

	média	Principais consumidores (consumos médios)
África	0,6	Argélia (2,8)
América do Norte e Central	3,4	Costa Rica e Honduras (8,4) USA (4,0)
América do Sul	1,7	Venezuela (3,7) Bolívia (2,8) Brasil e Colômbia (1,7)
Ásia	0,3	Líbano (7,8) Chipre (4,4) Japão (3,5)
Europa	3,9	Dinamarca (11,1) Noruega, Suécia, Dinamarca (9,6)
Oceania	2,2	Nova Zelândia (3,1)

* Fonte: FAOSTAT, 2004

A produção mundial de café no último século sofreu inúmeras oscilações, desde situações de procura superior à oferta, a períodos de produção excedentária, com a inevitável descida acentuada dos preços e falência de muitos produtores. Para estabilizar o mercado do café e evitar tais situações nasceu, em 1962, por iniciativa de alguns países e sob a égide das Nações Unidas, o Primeiro Acordo Internacional do Café. Para o gerir foi

criada a Organização Internacional do Café (ICO), sediada em Londres, sendo ainda hoje a principal organização intergovernamental que junta países produtores e consumidores, entre os quais Portugal (Dubois, 2001).

No entanto, o comércio do café está novamente em crise. Não obstante o volume de transações estar a aumentar nos países consumidores desenvolvidos, os preços actuais do café verde nos mercados internacionais são os mais baixos, em termos reais, desde há 100 anos. Esta situação é devida a mais um desequilíbrio entre oferta e procura. Verifica-se que a produção mundial tem vindo a aumentar anualmente em cerca de 3,6%, enquanto que a procura apenas tem aumentado 1,5% (ICO, 2004). Na origem deste problema parece estar a rápida expansão da produção no Vietname e as novas plantações brasileiras que, nas colheitas actuais, têm atingido valores acima do normal.

O mais recente Convénio Internacional do Café foi assinado em 2001 e publicado, em Portugal, no D.R. nº 59 de 11 de Março de 2003. Resumidamente, neste documento, é constatada, pelos governantes signatários:

- a excepcional importância do café para as economias de muitos países que dependem consideravelmente deste produto para as suas receitas de exportação;
- a importância do sector cafeeiro para a subsistência de milhões de pessoas, sobretudo nos países em desenvolvimento;
- a necessidade de fomentar o desenvolvimento dos recursos produtivos e de elevar/manter os níveis de emprego e de rendimento no sector cafeeiro;
- o interesse em evitar desequilíbrios entre a produção e o consumo, com consequentes flutuações de preço.

Verificou-se ainda a necessidade de:

- promover a cooperação internacional em questões cafeeiras;
- facilitar a expansão e a transparência do comércio internacional de café;
- constituir um centro para: i) recolha, difusão e publicação de informações económicas e técnicas, dados estatísticos e estudos; ii) pesquisa e desenvolvimento no domínio do café; iii) e fomento de todas essas actividades;
- incentivar os membros a desenvolverem uma economia cafeeira sustentável;
- promover, incentivar e ampliar o consumo de café;
- fomentar a sua qualidade.

Independentemente dos acordos, e apesar de controlados pela ICO, os preços do café vão variando ao longo do ano e de ano para ano (Marshall, 1985). Para facilitar a atribuição dos preços, o café verde foi dividido, pela ICO, em quatro grandes grupos:

- 1 - Suaves Colombianos (ou “Milds”, incluindo Quênia e Tanzânia)
- 2 - Outros suaves (que incluem todos os arábicas lavados)
- 3 - Brasil e outros arábicas naturais (todos os arábicas não lavados)
- 4 - Robustas

O café arábica representa actualmente cerca de 70% da produção mundial. A produção de café robusta tem vindo a aumentar, contribuindo para tal a maior produtividade desta espécie e, talvez ainda mais importante, a maior resistência à doença que a caracteriza.

O café robusta é utilizado maioritariamente em misturas, conferindo “corpo” à bebida, propriedade especialmente apreciada. É também matéria-prima na indústria de produção de café solúvel e instantâneo, correspondendo o seu preço em certas alturas do ano, a menos de metade do valor atribuído ao arábica lavado (ICO, 2004). É ainda largamente consumido em misturas em países como França, Itália, Espanha e Portugal (Clarke, 2003a), sendo fundamental para um bom café expresso (Illy, 1995).

1.1.3. Tecnologia do café

“Tecnologia do café” é a designação vulgarmente utilizada para um conjunto de operações, mais ou menos complexas, levadas a cabo nos países produtores e que, no essencial, visam a obtenção do café verde comercial. O café verde é, tal como definido na ISO 3509 (1989): “o termo comercial para a semente seca do cafeeiro” (Clarke, 2003a).

Embora ao longo dos anos cada país ou região tenha desenvolvido e aperfeiçoado o seu processo, a verdade é que todos os parâmetros em jogo se podem resumir a duas vias alternativas: a via seca e a via húmida.

O processamento a seco é usado geralmente no café robusta e em 90% dos cafés arábica do Brasil, Etiópia e Haiti (Clarke, 2003a). O processamento a húmido, por outro lado, é quase exclusivamente usado nos cafés arábica (Vincent, 1987).

Em qualquer dos casos a colheita é a primeira operação a executar, sendo necessário que, para isso, as bagas amadureçam na planta, ou seja, adquiram um vermelho lustroso.

Este processo sazonal poderá ocorrer de duas formas.

A primeira consiste na apanha manual ou mecânica de todas as bagas, sendo a colheita efectuada numa só passagem pela plantação. Obtém-se assim bagas em diversos estados de maturação.

O outro método, só praticado quando se utiliza o processamento a húmido, é a apanha manual selectiva, em que apenas são colhidas as bagas maduras, obrigando a diversas passagens intervaladas pela plantação.

As fases do processamento do café que se seguem à colheita são efectuadas ainda nos locais de produção do café, visando o transporte e conservação do café verde. Os factores que determinam o tipo de processamento a utilizar são, essencialmente, de ordem cultural (do país) ou económica (Illy, 1995).

Os dois tipos de processamento, a seguir abordados com mais detalhe, estão esquematizados na Figura 1.2.

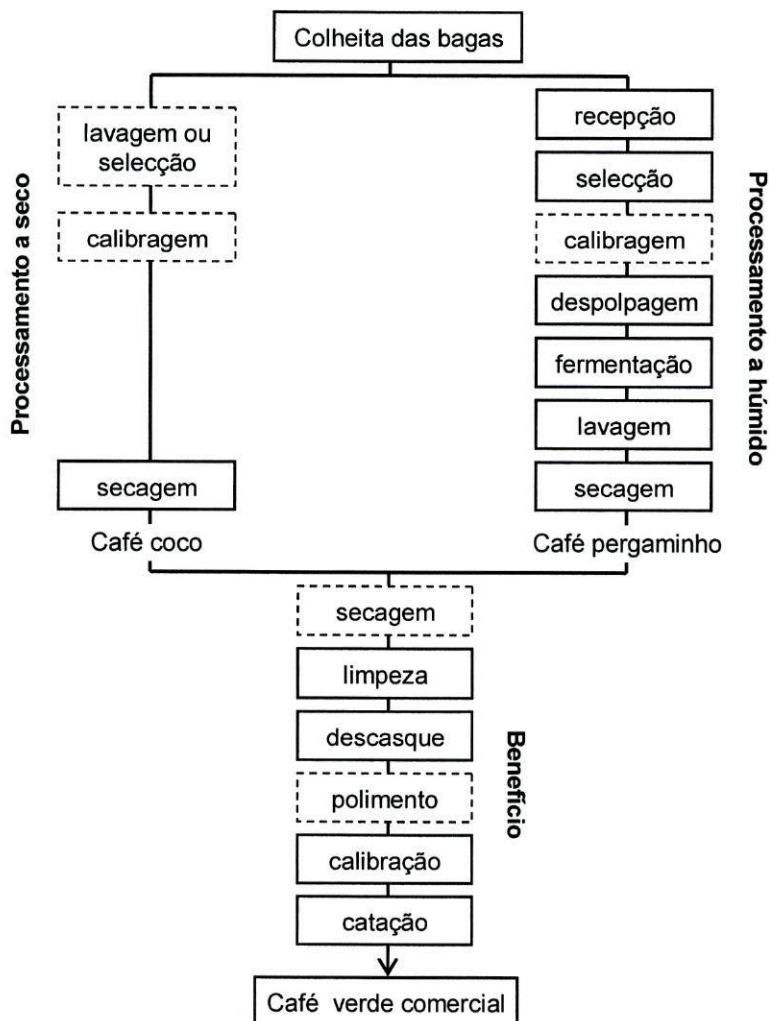


Figura 1.2 – Esquema dos processamentos mais comuns no café verde

A terminologia aplicada ao café nos diferentes estádios do processamento difere entre países, pelo que a simples tradução dos termos gera, por vezes, alguma confusão. Assim, apresenta-se na Tabela 1.3, alguma da terminologia utilizada, de acordo com a ICO.

Tabela 1.3 – Terminologia utilizada no processamento do café verde

Processamento a seco	Antes do descasque	Café verde final
Português	Café coco (cereja seca)	Café de terreiro
Inglês	Dry cherry (husk coffee)	Unwashed coffee, Natural coffee
Francês	Café en coque	Café non lavé, Café naturel
Processamento a húmido	Despolpado	Café verde final
Português	Café pergaminho (café bóia)	Café despolpado
Inglês	Parchment coffee	Washed coffee
Francês	Café en parche	Café lavé

1.1.3.1. Processamento a seco

Trata-se da tecnologia mais simples e menos dispendiosa. Consiste basicamente na secagem dos frutos inteiros, logo após a colheita, seguida do seu descasque. Este método é ideal em situações de escassez de mão-de-obra e/ou de água. Antes da secagem propriamente dita, poderá ocorrer uma selecção/calibragem prévia das bagas, usando sistemas de ar comprimido e lavagem, por forma a eliminar os frutos não maduros ou deteriorados e obter uma matéria-prima mais uniforme.

A secagem pode ser feita de forma “natural”, ao sol, ou artificialmente, em máquinas próprias para o efeito.

A primeira requer grandes superfícies bem ventiladas, os “terreiros”, onde os frutos são espalhados em camadas de 3 a 4 cm de espessura (Vincent, 1987). Para evitar situações indesejáveis, como fermentações, crescimento de fungos ou sobreaquecimentos, que causariam descolorações e uma bebida sem os requisitos esperados, é fundamental revolver os grãos frequentemente, especialmente na fase inicial quando a humidade é elevada. O período de secagem varia de 3 a 4 semanas e o teor de humidade final é da ordem de 11-12%, valor aceitável para a execução do descasque e manuseamento dos grãos sem alteração das características do café.

A secagem artificial, como a própria designação indica, recorre a equipamento apropriado, implicando maior investimento e menos mão-de-obra. A temperatura utilizada na

secagem é o factor limitante da velocidade do processo, tendo sido alvo de inúmeros estudos (Vincent, 1987).

No final da secagem por via seca obtêm-se o chamado “café coco”, que será posteriormente descascado. O pericarpo e a pele de prata representam cerca de metade da matéria seca da baga, em peso (Prodolliet, 1996).

1.1.3.2. Processamento a húmido

Esta técnica de processamento, ou método de lavagem, exige investimentos de maior vulto, sendo mais sofisticada e cuidada. A grande vantagem é a preservação das qualidades intrínsecas do grão (Thorn, 1995) e, segundo a maioria dos conhecedores, originar um café de qualidade superior. Requer equipamento específico, um consumo de água abundante e a colheita selectiva dos grãos maduros, como já foi referido. Envolve múltiplas etapas tais como: recepção e selecção (por flutuação em água), despulpagem (remoção do exocarpo e da parte fresca do mesocarpo), fermentação, lavagem e secagem (Vincent, 1987).

A grande diferença relativamente à via seca reside no facto de, após colheita e selecção dos frutos por lavagem, estes serem imediatamente despulpados mecanicamente, e as mucilagens que ficam ainda aderentes serem desagregadas por fermentação. A secagem posterior ocorrerá nas sementes envolvidas do endocarpo (café pergaminho), e não no fruto inteiro como no método anterior.

A fermentação é, talvez, a etapa mais característica deste processo, tendo por objectivo hidrolisar a mucilagem, por forma a facilitar a sua completa remoção. Consensualmente atribuíam-se esta hidrólise à acção das pectinases do fruto e de certos microrganismos (Vincent, 1987). Recentemente, os trabalhos de Avallone *et al.* (1999, 2001a, 2001b, 2002) parecem concluir que a despolimerização da substância péctica pela microflora pectolítica é negligenciável. Na realidade, as estirpes usualmente presentes possuem actividade muito reduzida ao pH em que ocorre a fermentação (5,3-3,5) e as observações microscópicas da mucilagem demonstram que esta permanece rica em polissacarídeos, incluindo substâncias pécticas, após a fermentação. Pelo contrário, a degradação da mucilagem parece estar mais relacionada com a acidificação do meio, devida ao crescimento da flora láctica.

A fermentação é usualmente realizada em tanques e pode ocorrer sem adição de água (fermentação a seco), húmida (Clarke, 2003a), ou mista. Neste último caso, ocorre inicialmente fermentação seca, visando promover uma rápida acidificação para evitar o

desenvolvimento de fungos e leveduras, seguindo-se um período de molho em água (Correia, 1995).

O tempo gasto nesta etapa de fermentação depende de vários factores, sendo de destacar a temperatura ambiente, a altitude, a espessura da camada de mucilagem e as enzimas presentes. Pode demorar apenas 12 horas, em zonas de baixa altitude, ou 48 horas a altitude elevada (Vincent, 1987).

O controlo do pH é importante para evitar a formação em excesso de certos ácidos, caso do propiónico (Clarke, 2003a, Vincent, 1987). Deve igualmente evitar-se sobre-fermentações que levam à putrefacção dos grãos, com consequências pejorativas em todo o fornecimento.

A etapa da fermentação pode ser ultrapassada recorrendo a substâncias químicas, ou a máquinas mais modernas que conseguem retirar, durante a despulpagem, praticamente toda a mucilagem aderente (Correia, 1995).

Segue-se a lavagem dos frutos despulpados, por forma a eliminar a mucilagem liquefeita. A sua posterior secagem, manual ou mecânica, visa atingir teores de humidade da ordem dos 12%, como foi referido para a via seca, obtendo-se o “café pergaminho”.

Existe ainda um outro processo, recentemente introduzido no Brasil, denominado semi-seco (Illy, 1995). Neste caso os grãos são despulpados mecanicamente e a fermentação omitida passando-se directamente à secagem (Clarke, 2003a). Este processo deverá realizar-se apenas em regiões bastante secas nesse período, por forma a evitar fermentações descontroladas (Cortez e Menezes, 1995).

Após a fase inicial de processamento, a seco ou a húmido, obtêm-se o café coco ou o café pergaminho, respectivamente. As diferenças fundamentais residem nas camadas exteriores que ainda os envolvem; contrariamente ao processamento a seco, no processamento a húmido praticamente todas as camadas exteriores do grão de café são removidas antes da secagem.

Esta é a forma ideal de conservação dos grãos até à exportação. O teor de humidade não deverá ultrapassar os 12%, para que o crescimento de bolores e a actividade enzimática sejam mínimos.

1.1.3.3. Benefício

O benefício é o conjunto de operações a que os cafés coco e/ou pergaminho são

submetidos, visando a obtenção do café cru, café comercial, ou café verde “curado”.

Os grãos voltam a ser novamente secos até teores de humidade de cerca de 11%, etapa que, além de promover a sua estabilidade, facilita a remoção das camadas residuais, casca e pergaminho. O café é então descascado e novamente separado de impurezas que ainda possa conter, ficando os grãos apenas com a sua última camada, a “pele de prata”. Em cafés de qualidade superior esta última camada pode ainda ser removida com auxílio de um equipamento adicional, denominado “polidor”. Na maior parte dos casos esta camada é eliminada durante a torra do café (Clarke, 2003a).

Depois de removidas as cascas, os grãos de café são calibrados e seleccionados, obtendo-se um produto final mais uniforme e de maior valor comercial.

Finalmente, segue-se uma fase de eliminação de sementes defeituosas e matérias estranhas, manual ou electrónica (“catação”), principalmente nos cafés processados por via seca.

Duas das razões fundamentais para que o café lavado seja de superior qualidade são, segundo Correia (1995): i) a matéria-prima, dado que se trabalha apenas com bagas maduras; ii) a maior probabilidade do café preparado por via seca desenvolver microrganismos, pois é seco na forma de fruto inteiro (mantém-se húmido durante mais tempo).

O café preparado por via seca adquire, no entanto, uma característica muito apreciada por certos consumidores: a sensação de “corpo”, essencial para a obtenção do café expresso (Illy, 1995). Este resulta directamente de um aumento dos sólidos solúveis extraídos para a bebida, devido ao facto das sementes estarem mais tempo rodeadas pela substância péctica do mesocarpo. Por seu lado, o café lavado, obtido por via húmida, perde cerca de 1,4 % dos sólidos solúveis, principalmente açúcares, durante as etapas de fermentação e lavagem (Illy, 1995). O conteúdo mineral também sofre redução.

Na presença de dois cafés de qualidade similar, o arábica apresentará sempre um “flavour” mais desenvolvido e agradável, enquanto que o robusta terá um “flavour” atenuado, embora apresente maior corpo. A aceitação generalizada de que o café arábica conduz à obtenção de uma infusão de melhor qualidade, faz com que aumente a sua procura e consequentemente o custo. Porém, dada a especificidade do café robusta para a produção de cafés solúveis e misturas apropriadas para café expresso, bem como a sua menor oferta em alguns meses do ano, faz com que a sua valorização se aproxime, em certos períodos, da do arábica (Correia, 1995).

Não se deverá, no entanto, assumir que todos os cafés processados a seco são de

qualidade inferior. Pelo contrário, os arábicas da Etiópia são muito bem cotados (café “Moca”), bem como os arábicas brasileiros de Santos (Correia, 1995).

Pelo descrito, todas estas etapas vão ter implicações ambientais de alguma gravidade, sendo de salientar os resíduos resultantes da despulpagem, do descasque e as águas de lavagem. A acrescentar ainda os resíduos resultantes da posterior extracção do café bebida, que no seu total constituem mais de dois milhões de toneladas anuais (Pandey *et al.*, 2000a).

Existe cada vez mais a preocupação em produzir o café recorrendo a métodos sustentáveis. Desde os anos noventa, têm vindo a ser implementados sistemas de recompensa para os café produzidos em plantações social e ambientalmente responsáveis. As que contribuem para a conservação do solo, dos recursos hídricos e da diversidade biológica, empregando tecnologias energéticas eficientes e renováveis, minimizando ou eliminando os produtos agroquímicos e manuseando os detritos em consonância com os princípios da redução, reutilização e reciclagem (ver Tabela 1.4).

Tabela 1.4 – Minimização do impacto ambiental na produção de café*

Manejo do solo	Controle eficaz da erosão, melhorando a estrutura do solo e aumentando sua fertilidade, com base no recursos a fertilizantes orgânicos, cultivos de cobertura, palha de protecção e adubos compostados.
Redução do consumo de água	Beneficiamento por métodos que reduzam o consumo de água.
Água limpa	No benefício do café devem ser utilizados métodos que impeçam a poluição da água de superfície e do subsolo.
Zona de protecção dos recursos hídricos	Deve haver zonas de vegetação protectora adjacentes a todas as fontes de água. Não alterar os corpos aquáticos de superfície.
Conservação florestal e da biodiversidade	Devem manter e ampliar a diversidade biológica das propriedades agrícolas e áreas circundantes, sem perturbar as florestas naturais.
Uso de sombra	As propriedades de café existentes em regiões de floresta deve manter ou ampliar a cobertura das copadas, com árvores de variadas espécies que preservem a biodiversidade local.
Uso de energia	O cultivo, processamento e secagem de café devem usar energia eficientemente e empregar fontes renováveis de energia. Sempre que praticável, o café deve ser seco em terreiros e ao sol.
Manejo de pragas:	Utilizar sistemas de manejo integrado de pragas, limitando a aplicação de pesticidas a casos extremos, para impedir perdas severas e declínio económico de grandes proporções.

* Fonte: ICO, 2004

As águas são usualmente tratadas antes de serem eliminadas para os rios e os resíduos sólidos reciclados. Nesta área, diversas tentativas têm sido feitas no sentido de converter estes resíduos agro-industriais em produtos economicamente rentáveis. Entre elas citam-se a conversão em alimento para gado, fertilizantes ou adubo orgânico. O sucesso na utilização como ração animal tem sido muito limitado devido à presença de factores anti-nutricionais que reduzem o ganho de peso dos animais quando utilizados em percentagens

superiores a 10%. Entre os compostos responsabilizados encontram-se a cafeína, o potássio e os taninos, mas os mecanismos de acção ainda não foram completamente esclarecidos. Mais recentemente, têm sido feitas aplicações biotecnológicas no sentido de bioconverter estes produtos, nomeadamente por fermentação. Desta forma, torna-se possível não só destoxificar o produto, para uma melhor aplicação como ração, mas também produzir muitos outros produtos tais como enzimas, ácidos orgânicos, compostos aromáticos, ou mesmo servir de substrato para a produção de cogumelos (Pandey *et al.*, 2000a).

1.1.4. Composição química

O café verde tem na sua composição hidratos de carbono, proteínas, lípidos e minerais, à semelhança dos demais produtos de origem vegetal. Os componentes que efectivamente o caracterizam são, maioritariamente, a cafeína, os ácidos clorogénicos e a trigonelina (Clarke, 2003a).

As duas espécies principais do género *Coffea*, referidas ao longo do texto, diferem em numerosos aspectos da sua composição. Como todas as substâncias naturais, a sua composição química sofre variações, às quais há que juntar as devidas ao processamento e ao armazenamento. A Tabela 1.5 resume a composição média, em termos muito gerais, destas duas espécies.

Tabela 1.5 - Composição média de café verde (% matéria seca)*

Constituinte	Arábica	Robusta
Cafeína	1,2	2,2
Trigonelina	1,0	0,7
Proteína (aminoácidos totais)	11,0	11,0
Aminoácidos livres	0,5	0,8
Hidratos de carbono		
sacarose	8,0	4,0
açúcares redutores	0,1	0,4
arabinogalactana, manana e glucana	44,0	48,0
outros	1,0	2,0
Ácidos		
clorogénicos totais	6,5	10,0
alifáticos	1,0	1,0
quínico	0,4	0,4
Lípidos totais	16,0	10,0
Minerais (41% K)	4,2	4,4
Lenhina	3,0	3,0
Pectinas	2,0	2,0
Compostos orgânicos voláteis	< 0,1	< 0,1

* Adaptado de Clarke, 2003a

1.2. O café torrado

Os países importadores adquirem o café verde com base numa série de especificações que incluem, no mínimo, referências à espécie, país de origem, tipo de processamento, peso do saco e, usualmente, o tamanho médio do grão. Outras características poderão ainda ser exigidas, tais como: forma dos grãos, cor, defeitos, densidade, ano de colheita, características da torra, e características da bebida que produz. Para facilitar as transações comerciais e normalizar a apresentação das características do café verde utiliza-se, frequentemente, a norma ISO 3509 (1989), que contém a terminologia adequada.

Antes da torra é ainda necessário realizar alguns procedimentos, que poderão incluir a selecção do café, a mistura de diferentes grãos, ou mesmo tratamentos especiais, caso da remoção da cafeína ou das ceras.

Em numerosos consumidores, o café provoca alguma irritação gastrointestinal geralmente definida como “indigestibilidade” do café. Em resposta a este problema são comercializados cafés “saudáveis” ou “suaves”, principalmente na Alemanha, nos quais são removidos os componentes que se julga serem responsáveis por esta situação (Clarke, 1987a). Entre essas substâncias citam-se derivados da serotonina, as 5-hidroxitriptaminas dos ácidos gordos, presentes principalmente na camada cerosa que recobre o grão. Esta substância é, na realidade, uma mistura de 5-hidroxitriptaminas de três ácidos gordos: araquídico, beénico e lignocérico, numa razão 12:12:1. O seu teor, inicialmente de 800-2000 mg/kg no café verde, é reduzido para 600-1000mg/kg no café torrado (Folstar, 1985, Kele e Ohmacht, 1996, Nebesny e Budryn, 2002). Tal como os diterpenos, que contribuem para o aumento do colesterol, também estes derivados da serotonina estão presentes em menor quantidade no café filtrado. O humedecimento dos grãos antes da torra (ou uma lavagem rápida com solventes clorados), parece reduzir os teores destes compostos no produto final (Clarke, 1987a).

A selecção inicial do café verde a utilizar na torra visa escolher a mistura que melhor satisfaça o gosto dos consumidores, a um custo aceitável (Clarke, 1987a). Alguns torrefactores comercializam ainda cafés estremos designados pelo país de origem (ex. Café 100% colombiano).

Comercialmente interessa que o “flavour” dos cafés mantenha uma qualidade constante. Para isso, os torrefactores utilizam misturas de diferentes cafés, ultrapassando assim as oscilações na disponibilidade de matéria-prima ao longo do ano, nas modificações do “flavour” com a colheita e armazenamento, bem como nas cotações. As formulações são

normalmente confidenciais, embora o teor de arábica seja usualmente declarado. A mistura dos cafés ocorre usualmente antes da torra, embora em alguns casos os cafés sejam torrados individualmente e posteriormente misturados.

Os gostos nacionais, ou mesmo regionais, influenciam fortemente a selecção das misturas. São exemplo, as misturas ricas em cafés robusta, usualmente com torra mais escura, muito populares em França, Itália e Portugal. Pelo contrário, os suecos, finlandeses e alemães consomem a maior percentagem de cafés arábica estreme de qualidade (Correia, 1995).

1.2.1. A torra

Os principais atributos sensoriais que tornam o café tão apreciado em todo o mundo só se desenvolvem com a torra.

Do ponto de vista técnico, a torra é uma operação complexa, em que há influência mútua de variadíssimos parâmetros.

A torra do café é reconhecida como uma arte refinada, cuja prática exige formação e, acima de tudo, muita experiência. Para além de ser um processo rápido (9-15 minutos nas torras convencionais) depende directamente das características dos grãos verdes, que variam de lote para lote, e do grau de torra pretendido. Pelo referido tem que ser continuamente ajustada.

A torra consiste em submeter o café verde a aquecimento, a uma determinada temperatura e durante um certo intervalo de tempo, até que se atinja o grau de torra pretendido. Para garantir uniformidade no processo, os grãos têm que ser mantidos em constante movimento. Durante esta operação, os grãos de café sofrem reacções de pirólise que levam à formação de substâncias responsáveis pelas qualidades sensoriais, bem como alterações físicas importantes (Clarke, 1987b).

Os parâmetros que usualmente definem a torra são a sua duração, temperatura e intensidade. Podem variar muito de país para país, dentro do próprio país, e ainda com a matéria-prima a torrar. O café arábica é normalmente torrado de forma mais ligeira para se conseguir o máximo desenvolvimento e preservação do seu aroma. O café robusta, por sua vez, é torrado de forma mais intensa, no intuito de disfarçar um pouco o seu gosto mais “terroso” (Correia, 1995).

Na torra convencional, internacionalmente designada por HTLT (high temperature long time), as temperaturas atingidas pelos grãos rondam usualmente os 180-230°C, para

tempos de torra na ordem de 12 a 15 minutos (Eggers e Pietsch, 2001). O processo decorre à pressão atmosférica, em condições de excesso de ar, sendo a energia necessária para o processo transmitida simultaneamente por condução, irradiação e convecção (Illy, 1995). Anteriormente a torra era exclusivamente realizada por contacto com superfícies metálicas quentes, o que conduzia inevitavelmente a um aumento da ingestão de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Illy, 1995).

A torra por infravermelhos permite um aquecimento mais uniforme de todo o grão, levando a uma maior retenção de compostos aromáticos (Kino e Takagi, 1995), embora não tenha ainda aplicação industrial.

A torra dos grãos em leito fluido favorece um contacto mais efectivo com o gás, durante a fluidisação, originando um tratamento térmico mais homogéneo e permitindo um melhor controlo da temperatura efectiva atingida pelos grãos durante o processo (Nagaraju e Ramalaxmi, 2001).

Alguns torrefactores mais recentes permitem reduzir o tempo de torra a cerca de 90 segundos (Illy, 1995). No entanto, para obter uma qualidade aromática conveniente, os tempos não deverão ser inferiores a 3,5 minutos para arábicas e 2,5 minutos para robustas (Eggers e Pietsch, 2001). Trata-se da denominada torra de grande rendimento, torra rápida, ou HTST (high temperature short time). Nos últimos 15 anos tem vindo a ser cada vez mais utilizada.

Esta torra produz cafés com grãos 10 a 15% maiores, com menor densidade e maior porosidade (Eggers e Pietsch, 2001). Devido a estas diferenças estruturais estes cafés permitem um aumento em cerca de 20% na extracção de sólidos solúveis, razão pela qual a torra é denominada de grande rendimento.

No entanto, e devido à baixa condutividade térmica dos grãos, em parte devida ao elevado teor de polissacarídeos da matriz, torna-se difícil transmitir uniformemente o calor às camadas internas do grão. Os grãos apresentam-se torrados no exterior, enquanto o interior ainda está cru. Este facto pode conduzir a um elevado teor em clorogénicos, não degradados pela torra, o que se reflecte numa bebida mais ácida e adstringente, não adequada à obtenção de café expresso (Illy, 1995).

Em diversos estudos realizados com o intuito de comparar as características físicas e químicas de cafés sujeitos à torra tradicional e torra rápida, verificaram-se as alterações já referidas, nomeadamente o aumento de volume, da área de superfície específica, do extracto seco e da acidez; o teor em cafeína não sofreu alteração. Para além disso, as diferenças nos sólidos extractáveis eram apenas visíveis para moagem grossa ou média. As diferenças mostraram-se insignificantes quando os grãos eram sujeitos a uma moagem

muito fina, suportando a ideia que as diferenças são essencialmente estruturais e não químicas (Maier, 1985, Duplatre *et al.*, 1987). Outros estudos permitiram evidenciar que também o “flavour” é afectado; têm menor gosto a queimado e uma perda menor de voláteis (Nagaraju e Ramalaxmi, 1997), provavelmente devido a uma menor perda de lípidos durante a torra (Eggers e Pietsch, 2001).

Os grãos de café sofrem inúmeras alterações durante a torra. Este processo é usualmente dividido em três fases (Illy, 1995).

Na primeira, o processo é endotérmico e visa principalmente o aquecimento e secagem dos grãos. Começa a verificar-se uma ligeira perda de massa e o amarelecimento dos grãos. Esta fase corresponde a cerca de metade do tempo gasto em todo o processo.

Na segunda fase, a torra propriamente dita, de duração inferior à primeira, acentua-se a desidratação, com a inerente perda de massa. Ocorre o aumento de volume e o escurecimento dos grãos através de numerosas reacções pirolíticas, cujo máximo se situa entre os 190-210°C. Dada a rigidez das paredes celulares dos grãos, o dióxido de carbono libertado nessas reacções é retido, conduzindo a pressões internas muito elevadas (da ordem das 5-7 atmosferas) com a consequente expansão do grão, favorecendo ainda um ambiente sem oxigénio no interior e na superfície envolvente do grão. A temperatura usada na torra promove a fusão dos lípidos que, devido à pressão interna, são expelidos para a superfície, sendo responsáveis pela obtenção de grãos brilhantes, especialmente na torra escura (Clarke, 1987b). A partir dos 210°C o processo torna-se exotérmico, ocorrendo a ruptura das paredes celulares, acompanhada de um ruído característico, e da libertação dos compostos voláteis e do dióxido de carbono formados no processo.

A partir desta fase, o responsável pelo processo tem que tomar decisões cruciais no sentido do terminar a operação. No caso de um processamento incorrecto, poderão surgir danos irreparáveis: grãos não suficientemente torrados, com sabor farináceo, em que os óleos não afloram à superfície. Por outro lado, a utilização de temperaturas demasiado elevadas ou durante tempo excessivo, conduz a grãos queimados, originando um café extremamente desagradável (Thorn, 1998).

A terceira fase, a fase de arrefecimento, visa terminar rapidamente as reacções exotérmicas, recorrendo ao arrefecimento com água ou ar. Assim, e uma vez atingido o ponto óptimo de torra, o café deve ser retirado da câmara de torra e arrefecido rapidamente. Caso contrário, entrará, com relativa facilidade, na zona de torra excessiva, inviabilizando a sua comercialização.

Embora pontualmente a torra dos cafés arábica e robusta seja diferente, ambos passam pelas três fases descritas acima. Usualmente ocorre a torra conjunta, nomeadamente para a produção de extractos de café ou quando a constituição dos lotes é anterior à torra (Correia, 1995). Não existe qualquer razão que impeça a mistura de grãos de torrefacção leve com escura. No entanto, é de salientar que alguns tipos de torrefacção não são apropriados para determinado tipo de café.

Os termos “torra ligeira”, “torra média” e “torra alta ou elevada” são frequentemente encontrados na bibliografia e constituem a única terminologia universal usada entre os torrefactores de café. Trata-se de uma escala gradativa da intensidade da torra. No entanto, não se baseiam em valores fixos que possam servir de elemento de comparação (Correia, 1995). A título de exemplo, apresenta-se na Tabela 1.6 alguma da terminologia utilizada para definir o mesmo tipo de torra.

Tabela 1.6 -Terminologia utilizada para designar o mesmo tipo de torra*

Torra	Denominações	Características
ligeira	canela, leve, meia cidade, Nova Inglaterra	ainda sabe a “verde”, para arábicas de alta qualidade, muita acidez, pouco corpo
média	americana, média, castanha, inglesa, regular, cidade	elevada acidez; “flavour” começa a desenvolver-se
média alta a escura	francesa leve, vienense, especial, cidade total	carácter total, óleo começa a aflorar à superfície
escura ou elevada	francesa, continental, europeia, italiana	óleo na superfície; “flavour” doce e suave
muito escura	francesa escura, pesada, preta	quase pretos, com muito óleo, sabe mais à torra do que ao café

* Adaptado de Thorn, 1998; Pettigrew, 1999; Banks *et al.*, 1999

Em França, Espanha, Argentina, Costa Rica e, de certa forma, em Portugal (Sanz *et al.*, 2002) é usual adicionar um pouco de açúcar durante a torra, por forma a dar aos grãos uma tonalidade mais escura e um recobrimento de caramelo brilhante. Obtém-se assim o chamado café torrefacto.

A forma de obtenção do café torrefacto está legislada nos diversos países consumidores. É definido, segundo o Decreto-Lei nº 53/89 como “o café torrado em grão, adicionado de açúcares, melaço de cana ou extracto concentrado de alfarroba, durante o processo de torrefacção, numa proporção que não ultrapasse 15% (m/m) do café verde e com as características do café torrado, excepto quanto ao extracto aquoso e teor de

caféina”.

Quando se atingem os 200°C o açúcar carameliza formando uma fina camada brilhante e escura. O café assim processado tem um amargor superior ao torrado naturalmente e menor aroma e delicadeza.

Quando a produção de café torrefacto se iniciou pretendia evitar-se a perda de lípidos que afloram à superfície e diminuir a sua oxidação. No entanto começou a ser utilizado também com cafés de menor qualidade, permitindo que os seus defeitos sejam mascarados com o açúcar (Sanz *et al.*, 2002). Embora inicialmente se comercializasse café 100% torrefacto, actualmente é usual utilizar misturas deste com café de torra natural, em proporções variadas.

Quando comparado com café torrado pela forma natural, o café torrefacto apresenta um teor superior de sólidos solúveis, devido aos compostos orgânicos derivados do açúcar adicionado (Martín *et al.*, 1996), uma espuma mais escura e uma maior sensação de “corpo” (Maeztu *et al.*, 2001). Para além disso, a sua fracção volátil caracteriza-se pela maior quantidade de pirazinas, piridinas e furanos, devido a um aumento das reacções de Maillard e de caramelização. Tem um carácter mais “queimado”, mais “torrado”, com sabor a caramelo (Sanz *et al.*, 2002).

Os cafés torrefactos apresentam ainda um teor superior (10 a 20 vezes) de hidroximetilfurfural (HMF) (Dauberte *et al.*, 1990), um dos aldeídos formados na caramelização por um dos mecanismos de escurecimento enzimático (Martín *et al.*, 1996). Para além disso, e devido a um provável mecanismo competitivo nas degradações de Strecker, entre aminoácidos livres e o açúcar adicionado, apresentam também um teor mais elevado de aminoácidos livres (Martín *et al.*, 1996).

O teor de furfural, por seu lado, não parece ser superior nos cafés torrefactos (Oliveira *et al.*, 1998). Este composto terá origem na sacarose presente no café verde, por reacções de Maillard e pirólise. Também parece que parte pode advir dos arabinogalactanas (De Maria *et al.*, 1994), um dos polímeros mais importantes da parede celular do café verde e torrado (Bradbury e Halliday, 1990, Fischer *et al.*, 2001).

1.2.2. Alterações provocadas pela torra

Embora as alterações de ordem física sejam mais facilmente verificadas são, sem dúvida, as alterações químicas, muito complexas e ainda não completamente elucidadas, que vão desenvolver as características organolépticas procuradas pelo consumidor ao beber a infusão de café.

Muitos autores têm estudado a evolução de alguns dos constituintes do café quando submetidos a diversos tipos de torra. Descrevem-se a seguir, resumidamente, algumas das mais importantes alterações, físicas e químicas.

1.2.2.1. Alterações físicas

Cor

A evolução da cor, ou da tonalidade, é das alterações mais fáceis de acompanhar com a evolução da torra (Clarke, 1987b). Resulta de reacções não enzimáticas de acastanhamento (reacções de Maillard) e depende, naturalmente, da temperatura atingida e do tempo em que ela actua. Inicialmente verde-amarelada, a cor evolui para os castanhos podendo chegar a quase preta nas torras mais escuras (Illy, 1995). A cor está ainda relacionada com a razão amargo/ácido da infusão.

A cor é um parâmetro físico referenciado como índice de qualidade, uma vez que é com base na coloração dos grãos que usualmente os técnicos determinam o ponto óptimo de torra, principalmente nas torras tradicionais, recorrendo a instrumentos próprios para a sua medição.

Embora o café arábica seja, de uma forma geral, submetido a uma torra menos intensa e se esperasse, por isso, apresentar uma cor acastanhada mais ligeira que o robusta, tal situação não se verifica para a maior parte dos lotes de misturas que chegam aos consumidores. Contrariamente àquilo que seria mais favorável para a obtenção de um produto final de qualidade superior, os lotes de café (misturas de vários robustas com vários arábicas) são normalmente constituídos antes da torra.

Por outro lado, como o ponto de torra óptimo varia praticamente de país para país, torna-se impossível criar uma escala de qualidade baseada na cor do produto final. Teoricamente, as comparações só terão validade dentro de cada país e, por vezes, só são válidas para uma determinada região (Correia, 1995).

Juntamente com a cor, o aspecto superficial também sofre alterações. Para as torras mais drásticas verifica-se uma aparência oleosa na superfície do grão, devida à migração de lípidos do café durante a torra, por força das elevadas pressões internas desenvolvidas, conforme referido (Clarke, 1987b, Illy, 1995).

Perda de massa

A perda de massa pode variar entre 14 e 23%, quando expressa em peso seco. Parece estar ligada a três parâmetros complementares: a origem botânica do café, as

condições de armazenamento e o tipo de torra praticado, sendo as perdas mais significativas a partir dos 200 °C (Correia, 1995).

A perda de massa é devida, em parte, à eliminação de água. A água livre e parte da ligada perde-se durante a torra, atingindo valores finais da ordem de 1%. Este valor pode ser superior se o arrefecimento for realizado pela água. Os grãos sujeitos à torra rápida podem ter teores de humidade superiores, pois esta é menos eficazmente libertada.

Também o dióxido de carbono libertado nas reacções de pirólise contribui significativamente para o valor da perda de massa, embora as substâncias que se volatilizam e a pele de prata que se desprende tenham uma contribuição não desprezável. A nível químico, contribuem ainda os hidratos de carbono, os ácidos clorogénicos, a trigonelina e os aminoácidos.

Aumento de volume

O aumento de volume ou “inchamento” dos grãos de café é uma das principais alterações físicas da torra. A sua determinação é vital na avaliação da capacidade dos torradores.

O aumento de volume parece acentuar-se a partir dos 150°C e, para as mesmas temperaturas, é mais acentuado no café arábica (Clarke, 1987b, Ortolá *et al.*, 1998), razão pela qual é vulgar dizer-se que os robustas torram mais lentamente. Encontram-se descritos aumentos de volume compreendidos entre 80% e 100% para o café arábica e 30 a 70% para o café robusta. O aumento do volume dos grãos durante a torra, aliado à diminuição da sua massa, conduz a uma diminuição da massa volúmica aparente do produto (Illy, 1995, Ortolá *et al.*, 1998).

Textura interna

A expansão dos gases, nas cavidades existentes na massa do café, provoca o aparecimento de fendas e fissuras na massa do grão torrado. Como consequência ocorre aumento da porosidade e diminuição da resistência à pressão do café torrado. Estudos microscópicos mostram que a estrutura das paredes celulares permanece intacta, mas parece ocorrer uma diminuição da resistência estrutural (Clarke, 1987b).

Acidez

A acidez do café depende também do grau de torra. O pH permanece constante na fase da torra correspondente à secagem dos grãos. A partir desse ponto, o pH diminui até atingir um valor mínimo, aumentando de seguida (Franca *et al.*, 2001). Este comportamento deve-se à volatilização de parte dos ácidos formados (Balzer, 2001).

O pH do extracto pode variar entre 4,9 e 5,7 consoante a torra. A acidez é sempre mais elevada nos arábicas, excepto para torras mais elevadas em que as diferenças são mínimas (Ortolá *et al.*, 1998). Para além disso, a acidez é menor nos cafés processados a seco do que nos “lavados” e mais elevada no café sujeito a torra rápida.

1.2.2.2. Alterações químicas

Durante a torra ocorrem inúmeras reacções químicas complexas. Entre as mais importantes citam-se as reacções de Maillard (escurecimento não enzimático) e as de Strecker (degradação de aminoácidos). Este facto é facilmente explicável pela presença de sacarose, polissacarídeos e aminoácidos livres no café, conferindo o potencial para o desenvolvimento destas reacções e, conseqüente, formação de compostos voláteis e de polímeros de elevada massa molecular (Clarke, 2003b)

Os componentes químicos do café torrado podem ser divididos em substâncias voláteis e não voláteis. Alguns dos primeiros são responsáveis pelo aroma da bebida enquanto que os segundos contribuem para as sensações de acidez, amargor e adstringência (Buffo e Cardelli-Freire, 2004).

A Tabela 1.7 apresenta a composição média de cafés arábica e robusta sujeitos a uma torra média. A composição do café torrado será, no entanto, significativamente diferente consoante o grau de torra dos grãos. Conforme foi referido, alguns compostos existentes no café verde são alterados com a temperatura, enquanto que outros, novos, são formados. Uma discussão mais detalhada das alterações provocadas pelo processo de torra encontra-se no sub-capítulo 1.3.2, referente ao controlo de qualidade.

Alguns compostos, caso da cafeína, praticamente não sofrem alterações com a torra. Já a fracção proteica e glucídica, embora semelhantes em teor relativamente ao café verde, apresentam-se significativamente alteradas em relação ao seu estado nativo. A torra conduz a uma desnaturação proteica, sendo esta proporcional ao grau de torra e variando de 20-40%, em torras médias, até mais de 50% em torras escuras.

Os aminoácidos livres estão envolvidos numa série de reacções originando muitos dos compostos do aroma do café. A sua degradação é quase total e apenas vestígios estão presentes no café torrado.

Tabela 1.7 - Composição média de café torrado a torra média (% matéria seca)*

Constituinte	Arábica	Robusta
Cafeína	1,3	2,4
Trigonelina (e produtos de degradação)	1,0	0,7
“Proteína”	7,5	7,5
Aminoácidos livres	0,0	0,0
Hidratos de carbono		
sacarose	0,0	0,0
açúcares redutores	0,3	0,3
polissacarídeos	33,0	37,0
outros	1,0	2,0
Ácidos		
clorogénicos residuais	2,5	3,8
alifáticos	1,6	1,6
quínico	0,8	1,0
Lípidos totais	17,0	11,0
Minerais	4,5	4,7
Lenhina	3,0	3,0
Pectinas	2,0	2,0
Produtos de condensação/caramelização (por diferença)	25,5	25,5
Compostos orgânicos voláteis	0,7-0,8	0,7-0,8

* Adaptado de Clarke, 2003b

Os ácidos clorogénicos são degradados e isomerizados, levando à libertação de ácido quínico, concomitantemente com a formação de uma panóplia de produtos complexos de degradação, onde se incluem a maioria dos compostos fenólicos presentes. Para além disso, os produtos de degradação e os ácidos clorogénicos não alterados ligam-se às proteínas desnaturadas das melanoidinas.

Durante a torra, a sacarose é rapidamente degradada e o seu conteúdo é vestigial num café com torra média. De acordo com Trugo e Macrae (1984) as perdas rondam os 98%. Os açúcares redutores resultantes da sua hidrólise, glucose e frutose, são também rapidamente degradados. Estes e outros produtos primários de degradação reagem, em seguida, de diferentes formas: por fragmentação, originando ácidos; por caramelização, formando inúmeros compostos heterocíclicos, caso do HMF, alguns dos quais importantes para o aroma; por interacção com aminoácidos e proteínas originando melanoidinas e outros compostos de massa molecular menor.

Os produtos de condensação e caramelização, ainda pouco estudados, constituem a mais significativa fracção formada na torra.

Os polissacarídeos, componentes principais da parede celular, são relativamente estáveis à torra, sendo, no entanto, parcialmente despolimerizados, conduzindo à descrita diminuição da resistência da estrutura (Bradbury e Halliday, 2001). Assim se entende que o

teor de fibra, principalmente hemicelulose, seja inversamente proporcional à temperatura de torra.

A fracção lipídica é pouco afectada pela torra embora se verifique alguma isomerização dos ácidos gordos (Casal *et al.*, 1997). A maior parte dos lípidos está localizada no interior da estrutura celular do grão. Para as torras mais intensas, ocorre quebra dessa estrutura celular podendo os lípidos migrar para a superfície onde, para além de darem um aspecto lustroso e brilhante ao grão, ficam inevitavelmente mais expostos à oxidação.

Os triglicéridos são pouco afectados pela torra, excepção feita para uma ligeira hidrólise, com libertação de ácidos gordos livres. Estes, por isomerização e oxidação, podem originar compostos voláteis (Illy, 1995).

A fracção esteróica também parece ser pouco alterada. Já os diterpenos, com a excepção do 16-O-metilcafestol, são parcialmente degradados.

1.3. Controlo de qualidade

Tendo em conta o consumo de café a nível mundial, é natural que, ao longo da história, muitos investigadores se tenham dedicado à pesquisa de marcadores que ajudem, de alguma forma, a aferir a sua qualidade. Porém, devido ao número de atributos em causa e à subjectividade de provadores e consumidores, tem sido difícil estabelecer uma definição de qualidade de café (Correia, 1995).

A cor dos grãos, depois de torrados, é muitas vezes considerada um padrão de qualidade. Assim sendo, e atendendo aos diferentes tipos de torra praticados em cada país, será de esperar que “bom café” tenha um significado diferente para os consumidores de diferentes países.

Entre os atributos mais importantes na qualidade da infusão cita-se o “flavour”, atributo de difícil apreciação e que advém da conjugação do aroma (compostos voláteis) e do seu sabor (fundamentalmente compostos não voláteis). A sensação de “corpo” também é importante, bem como o aspecto e persistência da espuma num café expresso (Nunes *et al.*, 1997).

O aroma é particularmente importante porque é o primeiro estímulo sensorial que pode ser perceptível antes e durante a preparação da bebida, bem como durante o seu consumo.

O “corpo”, sensação de infusão fraca ou forte, intimamente relacionado com as propriedades reológicas do café, é muitas vezes utilizado pelo consumidor como padrão

definidor de qualidade. Contudo, uma chávena de café fraco tanto pode ser derivada de um café que tenha um “flavour” fraco, como da utilização de uma menor quantidade de café por infusão. Na realidade, é preciso ter sempre em conta a maior ou menor riqueza de sólidos solúveis do lote de café utilizado (Correia, 1995).

Independentemente da natureza dos cafés, a qualidade depende directamente da sua composição química. Todos os atributos atrás referidos são consequência da presença de alguns componentes químicos, ou de combinações desses mesmos constituintes, em determinadas proporções (Correia, 1995).

Assim sendo, será então possível definir a qualidade do café, relacionando-a quer com a quantificação de determinados constituintes, quer pela ausência de outros. Esta definição elimina os problemas associados à subjectividade da avaliação sensorial, dando uma maior objectividade à apreciação dos cafés. No entanto, tal correlação, a ser possível, requeria a análise de um grande número de amostras de café e a quantificação de todos os componentes que contribuem para os vários parâmetros de qualidade, assim como a comparação dos resultados com os obtidos na análise sensorial.

Se a determinação química levanta hoje menos obstáculo, já a forma de elaboração das diferentes infusões e, fundamentalmente, os diferentes tipos de torra utilizados para a obtenção do produto final, introduziriam, no sistema, um sem número de combinações possíveis. Pela sua complexidade, ainda não se encontrou, até ao momento, nenhuma correlação suficientemente significativa.

Certo é que, até à data, não existem instrumentos normativos para o controlo da qualidade e autenticidade do café verde ou torrado. Na prática, aceita-se como factores de qualidade do café verde: a humidade dos grãos, a quantificação dos defeitos, a matéria estranha, o tamanho do grão e as características organolépticas. No que concerne ao café torrado, a legislação resume-se à determinação do teor de humidade, cafeína e extracto aquoso. A imposição de limites mínimos para o teor de cafeína tenta, de certa forma, controlar as adulterações de cafés arábica com robusta; a determinação dos hidratos de carbono poderá evitar adições de outros produtos ao café.

A Tabela 1.8 resume as Normas ISO para café e derivados (ISO, 2004), bem como as Normas nacionais (IPQ, 2004), equivalentes, ou não, às ISO existentes.

Os métodos para a determinação destes parâmetros controladores estão descritos em diversas normas internacionais. No caso específico de Portugal, as Normas são poucas e, de certa forma, um pouco desactualizadas, devido ao facto da Comissão Técnica para a

normalização na área dos produtos de café e sucedâneos (CT-70) se encontrar actualmente desactivada (IPQ, 2004).

Tabela 1.8 - Normas para controlo do café

ISO	Título abreviado	NP	Título abreviado
Café verde			
1446:2001	Water content - Reference	1075/6:1975	Teor de água. (Referência e corrente)
		1666:1980	Colheita de amostras em sacos
4072:1982	Sampling - in bags	1984:1986	Sonda para colheita
		1795:1989	Exame olfactivo e visual
4149:1980	Olfactory and visual examination of foreign matter and defects	1521:1985	Determinação de corpos estranhos e de defeitos do fruto
4150:1991	Size analysis - Manual sieving	—	
6666:1983	Coffee triers	—	
6667:1985	Insect-damaged beans	—	
6668:1991	Preparation for sensory analysis	—	
6669:1995	Free-flow bulk density (Routine)	—	
6673:2003	Loss in mass at 105 °C	1794:1988	Perda de massa por secagem
8455:1986	Storage and transport - in bags	—	
9116:1992	Guidance on methods	—	
10470:1993	Defect reference chart	—	
Café torrado			
4052:1983	Caffeine (Reference method)	1840:1986	Teor de cafeína
10095:1992	Caffeine-HPLC Method	—	
11294:1994	Moisture-loss at 103 °C (Routine)	3659:1991	Perda de massa por secagem
11817:1994	Moisture-Karl Fischer (Reference)	—	
—		3595:1993	Extracto aquoso a quente
—		3596:1993	Matéria insolúvel
—		3913:1991	Teor de cinza
Extractos secos e sucedâneos			
3726:1983	Loss at 70 °C (reduced pressure)	1781/2:1986	Teor de matéria seca
6670:2002	Sampling method for bulk units	3220:1991	Colheita de amostras
8460:1987	Determination of free-flow and compacted bulk densities	2285/6:1991	Massa volúmica aparente por escoamento livre e compactação
11292:1995	Free and total carbohydrate contents - HPLC Method	—	

1.3.1. Autenticidade

Por autenticidade de um produto alimentar entende-se a veracidade da descrição constante na embalagem em que o produto é apresentado ao comprador/consumidor. Esta surge da necessidade em controlar a obtenção de lucros fraudulentos à custa da classificação errada dos alimentos, um problema que existe desde sempre.

Um dos primeiros estudos científicos publicado no campo da autenticidade de alimentos, já no final do século XIX, tratava da pesquisa de adulterações em café, um produto dispendioso já na altura e objecto de inúmeras tentativas de falsificação (Dennis, 1998). Utilizando a microscopia, foi possível detectar que, na altura, a maioria dos cafés estavam adulterados com chicória, trigo ou açúcar. Um estudo de mercado bem mais recente (1995), realizado em cafés instantâneos do mercado inglês, permitiu verificar que 15% dos produtos poderiam ser considerados não autênticos. O estudo baseou-se na análise dos açúcares por cromatografia líquida (Dennis, 1998).

Os dois estudos referidos demonstram:

- a necessidade de uma vigilância contínua, uma vez que o potencial para a obtenção de proveitos ilícitos se mantém no caso do café,
- a necessidade de desenvolver metodologias cada vez mais expeditas capazes de detectar as adulterações já conhecidas e, principalmente, as ainda desconhecidas (Dennis, 1998).

No campo da autenticidade de alimentos, em geral, é importante considerar:

- a espécie de origem: pode ocorrer a troca total ou parcial, ou seja, a mistura com outra espécie de menor valor. Este aspecto é especialmente importante no café pela mistura de grãos robusta, mais económicos, em grãos arábica, de maior valor comercial;
- região de origem: tal como noutros alimentos, o café proveniente de certas regiões, como o da Colômbia, tem uma cotação de mercado mais elevada;
- processamento: assim como é importante saber se um alimento foi irradiado, ou se um azeite provém exclusivamente de processos físicos, no campo do café, é importante conhecer-se o tipo de processamento a que foi sujeito;
- protecção de marca: com o crescente interesse pelos cafés “orgânicos”, desenvolvidos apenas em determinadas explorações de uma região, há a preocupação em certificar o local preciso de origem do produto.

Discriminar a espécie de origem será, talvez, o mais fácil neste contexto. As dificuldades crescem ao longo da lista, sendo a probabilidade de controlo da autenticidade uma missão quase impossível. Para além disso, o aquecimento a altas temperaturas durante a torra do café, seguido da sua moagem, torna ainda mais difícil a comparação das características físicas e químicas do produto final com o café verde original.

Embora o comércio internacional seja feito quase exclusivamente com café verde, cada vez mais os consumidores têm ao seu dispor uma enorme variedade de produtos derivados do café, seja simplesmente na forma de café torrado moído ou solúvel, ou bebidas prontas a

tomar. Dado o elevado valor comercial da matéria-prima café verde, muitas têm sido as tentativas, ao longo dos anos, de adulteração dos produtos disponíveis ao consumidor, quer por mistura com substitutos, quer simplesmente por alteração do seu rótulo (Prodolliet, 1996).

Se na forma de café verde ainda é relativamente fácil detectar adições fraudulentas, o mesmo já não se passa com o café torrado, principalmente depois de moído (Prodolliet, 1996).

1.3.1.1. Origem botânica do café:

Para além das diferenças visuais que caracterizam os grãos arábica e robusta, facilmente perceptíveis com os grãos inteiros, o seu “flavour” após torrefacção é muito diferente. A infusão de café arábica é mais aromática, mais ácida e com menos “corpo”, enquanto que a de robusta é mais amarga, mais encorpada, mas pouco ácida. Embora um provador treinado consiga distinguir com facilidade infusões de grãos arábica ou robusta estremes, o mesmo já não se pode afirmar para misturas em proporções variadas, ou mesmo, distinguir um arábica de um robusta lavado de grande qualidade (Prodolliet, 1996).

A análise química, de diversos grupos de compostos, tem sido usada numa tentativa de diferenciar as espécies e variedades de café, bem como as suas proporções em misturas, e a adulteração com matérias estranhas (Trugo, 2003). É sabido que os cafés arábica e robusta diferem na sua composição química, no entanto, essas variações são, regra geral, pequenas. Nenhum constituinte maioritário serve como marcador da presença de pequenas quantidades de café robusta em café arábica. Já no âmbito dos constituintes minoritários, muitas tentativas têm sido publicadas, umas com mais sucesso que outras, apresentando-se, de seguida, algumas das mais importantes.

A análise da fracção lipídica tem revelado resultados interessantes. A composição em ácidos gordos, determinada por cromatografia gasosa e aliada ao tratamento estatístico por técnicas de quimiometria, demonstrou ser útil na discriminação das espécies, quer em café verde, quer após a torra (Martín *et al.*, 2001, Alves *et al.*, 2003).

A análise da fracção insaponificável, nomeadamente os esteróis e diterpenos, tem sido bastante desenvolvida, sendo talvez o grupo de compostos que tem originado melhores resultados. No âmbito dos esteróis, o δ^5 -avenasterol e o 24-metilenecolesterol, têm sido utilizados para detectar misturas de café. O café robusta apresenta percentagens relativas destes esteróis (9-11%) muito superiores aos do arábica (2-3%) (Duplarte, 1984, Trouche *et*

al., 1997). No entanto, devido à variação natural nos teores destes esteróis nas duas espécies, apenas é possível detectar a presença de café robusta numa percentagem mínima de 10% (Trouche *et al.*, 1997). Outro facto positivo é a estabilidade dos esteróis à torra, podendo servir os mesmos propósitos no café torrado.

O estudo da fracção diterpénica levou à descoberta de vários compostos, provavelmente típicos do café: o cafestol, o kahweol, e seus derivados metilados (Clifford, 1985a). O café robusta contém cafestol, pequena quantidade de kahweol, comparativamente com o café arábica, e 16-O-metilcafestol (16-OMC) (Speer *et al.*, 2001). Este último diterpeno tem sido alvo de numerosos estudos, com vista a confirmar a sua presença unicamente em cafés robusta (Speer *et al.*, 1991, Frega *et al.*, 1994, Trouche *et al.* 1997), característica essencial para ser considerado marcador da espécie. Para além disso, o 16-OMC é estável à torra (Speer *et al.*, 1991), uma qualidade adicional para uma detecção fiável da presença de café robusta em cafés torrados, onde é mais difícil verificar a sua autenticidade. Embora no trabalho de Trouche *et al.* (1997) fosse reportada a capacidade de detectar até um mínimo de 10% em mistura com arábica, já é possível, hoje, determinar até um mínimo de 2%. Esta determinação constitui um método oficial na Alemanha (método DIN nº 10779, 1999). Para isso tem contribuído o trabalho de Speer e colaboradores, nomeadamente na técnica de determinação do diterpeno, não só no sentido de reduzir o limite de detecção de café robusta, mas principalmente o tempo de análise (Kölling-Speer *et al.*, 1999). O 16-O-metilkahweol, mais recentemente descoberto, parece seguir o mesmo comportamento do derivado metilado referido anteriormente (Roos *et al.*, 1997, Kölling-Speer e Speer, 2001a).

A avaliação simultânea destas duas fracções do insaponificável, esteróis e diterpenos, pode ser realizada por GC-MS (Frega *et al.*, 1994, Lercker *et al.*, 1995), ou por acoplamento em linha da cromatografia líquida à cromatografia gasosa (on line LC-GC), permitindo avaliar rapidamente os dois mais importantes marcadores referidos, 16-OMC e δ^5 -avenasterol (Kamm *et al.*, 2002).

Os ácidos clorogénicos, mono ou diésteres do ácido quínico, apresentam-se como uma fracção quantitativamente importante do café, principalmente do robusta, com teores definitivamente superiores (Clifford, 1985b). Diversos estudos têm sido desenvolvidos no sentido de caracterizar os ácidos clorogénicos e os ácidos cinâmicos seus constituintes, das duas espécies (Clifford, 1985b, Andrade *et al.*, 1997). O teor em ácidos clorogénicos varia

não só com a espécie, mas também com o grau de maturação, sendo superior nas sementes de frutos maduros (Clifford, 1997).

Os ácidos clorogénicos podem encontrar-se livres, complexados com a cafeína (Martín, R., 1987), ou ligados a outros compostos, nomeadamente aminoácidos; é o caso da cafeoil tirosina (Clifford *et al.*, 1989a), cafeoil triptofano e *p*-cumaroil triptofano (Murata *et al.*, 1995). Estes últimos compostos parecem existir exclusivamente nos cafés robusta, podendo, a confirmar-se, servir o propósito da discriminação.

A determinação dos ácidos clorogénicos, juntamente com a cafeína, tem sido também uma ferramenta importante para a classificação de espécies dentro dos vários subgéneros do género *Coffea* (Clifford *et al.*, 1989b), ou mesmo como auxiliares na caracterização de híbridos, em programas de hibridização genética (Guerrero e Suárez, 2001). Os cafés processados a seco parecem conter teores inferiores de ácidos clorogénicos, quando comparados com os processados a húmido (Guyot, 1995). Também o café indiano “moonsooned” apresenta teores superiores de ácido caféico livre (Balyaya e Clifford, 1995), provavelmente devido à intensa fermentação a que esta especialidade é sujeita, durante a secagem dos grãos, a qual ocorre com uma humidade relativa muito elevada, devida às monções (Ahmad e Magan, 2002).

O teor em minerais é superior nos cafés robusta, bem como nos cafés processados por via seca comparativamente com os obtidos por via húmida. A determinação da composição mineral pode utilizar diversas metodologias. A espectrometria de emissão atómica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES) permite a resolução de misturas arábica/robusta, embora ainda com um erro na ordem de 7%. O fósforo, magnésio e cobre parecem ser os minerais com maior poder discriminante (Martín *et al.*, 1999).

Ao longo das últimas décadas a fracção volátil tem sido estudada com o intuito de diferenciar as espécies (Dart e Nursten, 1985). Os perfis de aroma, obtidos por cromatografia gasosa e após tratamento quimiométrico, permitem seleccionar “picos” que diferenciam as duas espécies, preferencialmente sem influência do grau de torra. O “headspace” pode ser analisado directamente, após adsorção em resinas, ou isolado em fracções por destilação.

De uma maneira geral, as duas espécies diferem na sua composição volátil, como seria aliás de esperar. O café robusta apresenta maior concentração de compostos voláteis de enxofre e fenóis (Sanz *et al.*, 2002). A utilização da microextração em fase sólida, acoplada à cromatografia gasosa (SPME-GC), permite também a distinção das espécies

estremes e de misturas, quer pela análise do “headspace” quer da infusão (Bicchi *et al.*, 1997, Sanz *et al.*, 2002). A SPME-GC multidimensional (Mondello *et al.*, 2004) parece constituir uma técnica com elevado potencial.

O acoplamento da cromatografia gasosa a técnicas de olfactometria permite a individualização dos aromas fundamentais, facilitando o estudo da fracção gasosa (Buffo e Cardelli-Freire, 2004).

Algumas abordagens multiparamétricas também têm sido utilizadas, no café verde ou café bebida, acoplando diversas determinações químicas ou mesmo com a análise sensorial (Martín *et al.*, 1996, Maeztu *et al.*, 2001).

As técnicas de análise química com solventes são, obviamente, demoradas para os propósitos de uma rápida discriminação, coerente com a exigência do mercado e da indústria.

Recentemente têm sido também implementadas outras técnicas, como a espectroscopia do infravermelho médio e próximo, visando a distinção das espécies, sendo, obviamente, métodos mais rápidos e menos dispendiosos quando comparados com outros nomeadamente os cromatográficos. Downey e colaboradores têm desenvolvido estudos nesta área, aplicando a espectrofotometria de FTIR próximo e médio, para discriminar café torrado moído (Downey *et al.*, 1994, Kemsley *et al.*, 1995) e cafés instantâneos (Fábián *et al.*, 1994, Briandet *et al.*, 1996). A combinação das duas técnicas de infravermelho referidas permitiu, mais recentemente, maior robustez nos modelos aplicados, requerendo o recurso a um menor número de variáveis no tratamento estatístico adjacente (Downey *et al.*, 1997).

As técnicas de ressonância magnética nuclear poderão ainda ser mais simples que as de infravermelho, mas os desenvolvimentos científicos nesta área são mais escassos (Danho *et al.*, 1992).

Através da biologia molecular também é hoje possível discriminar as espécies no seu estado verde (Remler e Pfanhauser, 1999).

No campo da adulteração do café com outros produtos vegetais, nomeadamente com chicória, ou resíduos do processamento do próprio café (pele de prata, pergaminho), a microscopia, conforme já referido no início da secção, continua a ser útil, bem como a determinação do perfil de açúcares (método ISO 11292: 1995). Outras abordagens têm vindo a ser desenvolvidas, nomeadamente com recurso à análise estatística de determinações multiparamétricas (White, 1997).

1.3.1.2. Origem geográfica do café

O carácter da infusão do café é marcadamente influenciado pela sua origem geográfica, embora seja muito difícil discriminá-lo apenas com base na prova. O mesmo se pode dizer da aparência do grão. Por tais factos, justifica-se a existência de métodos objectivos e seguros para determinação da origem geográfica do café (Prodolliet, 1996).

Para a detecção da região de origem, o uso simultâneo de diversos minerais parece ser o método mais promissor. O conceito assenta na bioacumulação, factor pelo qual o vegetal reflectirá a composição química do solo e ambiente onde se desenvolveu (Anderson e Smith, 2002). A determinação por ICP-MS tem capacidade para distinguir regiões geográficas (Macrae *et al.*, 1993) e permitiu a Prodolliet *et al.* (2001) avaliar 57 elementos, embora sem permitir a distinção inequívoca da origem geográfica de todas as amostras. Os resultados sugeriram, no entanto, segundo o autor, que a técnica tem potencial e que, em casos muito específicos e como complemento de outra validação, poderá servir para confirmar a origem de um café de origem conhecida. Numa avaliação por ICP-AES, associada a tratamento estatístico, a análise elemental de 18 macro e microelementos permitiu distinguir 8 origens geográficas diferentes, incluindo as três mais produtivas, sendo a discriminação sub-geográfica bem sucedida em 70-86% dos casos (Anderson e Smith, 2002).

A determinação de isótopos estáveis por IRMS e RMN poderá incrementar estas possibilidades. Foi já aplicada à cafeína, determinando as razões entre os isótopos $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ da cafeína extraída, sendo possível distinguir claramente os café africanos dos americanos, bem como distinguir cafeína natural da sintética (Danho *et al.*, 1992). Num trabalho de Prodolliet *et al.* (1997) não foi possível, no entanto, observar agrupamentos aparentes no que concerne ao país de origem nem à espécie. A utilização mais recente da razão $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ parece promissora (Weckerle *et al.*, 2002).

Os perfis de ácidos clorogénicos dos cafés arábica variam pouco com a origem geográfica, mas os resultados com cafés robustas são menos consistentes, apresentando-se os cafés angolanos numa posição única. Provavelmente devido a factores genéticos, os robustas angolanos apresentam perfis distintos, com teores muito superiores de cafeoil tirosina (Clifford, 1995, Correia, 1995). A associação da determinação dos ácidos clorogénicos à análise estatística, também parece ser uma ferramenta importante na discriminação da origem geográfica (Bicchi *et al.*, 1995), embora com maior potencial nos

cafés verdes, dado que estes compostos são degradados de forma proporcional com o grau de torra praticado.

A fracção aromática também pode ser utilizada para diferenciar cafés de diferentes origens geográficas, embora os estudos nesta área sejam mais escassos (Bicchi *et al.*, 1997, Mayer e Grosch, 2001).

1.3.2. Controlo da torra

O processo de torra é usualmente controlado pela temperatura e tempo utilizados. O grau de torra é determinado qualitativamente pela cor externa dos grãos, por medição da reflectância em instrumentos com células fotoelétricas (Clarke, 1987b). Para isso, o grão é finamente moído e o pó comprimido, para que a leitura seja uniforme. No entanto, para além de serem medições pouco precisas, as variações de cor no interior dos grãos ficam imperceptíveis, acarretando uma não uniformidade da qualidade do produto final (Franca *et al.*, 2001). Também facilmente se entende que, pelo facto de dois grãos terem a mesma cor, não significa que tenham a mesma composição química, o que se pode traduzir em diferentes infusões.

Como alternativa é utilizada a temperatura como parâmetro de controlo (Clarke, 1987b), avaliando-se a distribuição da temperatura no interior dos grãos. No entanto, tal como a cor, não se mostra um parâmetro adequado ao controlo industrial da torra. Nenhum dos parâmetros referidos está directamente associado à composição química do grão torrado, o qual apresenta um alto índice de diferenciação devido à variabilidade intrínseca da matéria-prima, à espécie, origem, grau de maturação, tipo de pré-tratamento, entre outros factores. A determinação da perda de massa também poderia ser um parâmetro utilizado mas requer a determinação da humidade dos grãos no estado verde e torrado, processo que, para além de moroso, está sujeito a muitos erros, dada a existência de elevadas quantidades de dióxido de carbono no interior do grão torrado (Clarke, 1987b).

O grau de torra é um dos critérios utilizados na classificação e comparação de diferentes amostras de café torrado. Nos trabalhos científicos em café, a forma mais usual de descrever o grau de torra é através das perdas de matéria orgânica ocorrida no processo –“organic roast loss” (ORL). Esta poderá ser determinada directamente, por pesagens antes e após a torra. Assim se entende só ser possível determinar este parâmetro se for conhecido o peso inicial dos grãos de café verde e a sua humidade.

A procura de marcadores químicos que possam estar directamente relacionados com o grau de torra, independentemente do processo de torra praticado ou mesmo do tipo

de grãos envolvidos, tem ocupado muitos investigadores nas últimas décadas.

Das muitas substâncias que se alteram durante o processo de torra, aumentando ou diminuindo, algumas poderão servir os propósitos de controlo do processo.

Numa das mais antigas tentativas Kwasny e Werkhoff (1978) utilizaram a concentração de trigonelina e ácido nicotínico para avaliar a perda de massa orgânica durante a torra. No entanto, verificaram que o método dependia da variedade de café em causa, não podendo ser utilizado em misturas, a situação mais comum.

A razão entre a concentração de trigonelina e a de cafeína também foram propostas. Durante a torra esta razão começa por manter-se constante na fase de secagem para depois diminuir proporcionalmente com o aumento da temperatura, ou do tempo, consoante o parâmetro em estudo (Franca *et al.*, 2001).

Os ácidos clorogénicos, constituindo uma importante fracção do grão de café quando comparada com outras sementes, têm sido bastante estudados. Uma exaustiva revisão sobre os ácidos clorogénicos pode ser encontrada em Clifford (1985). Estes ácidos são intensamente degradados com a torra, sendo os teores iniciais, de cerca de 6-10%, consoante a espécie (ver Tabela 1.5), reduzidos para cerca de 3% (Tabela 1.7). Numa torra média existirão ainda cerca de 40% dos ácidos clorogénicos iniciais mas para uma torra severa podem mesmo ser totalmente degradados (Trugo e Macrae, 1984). Dado que esta degradação é proporcional ao grau de torra, os teores residuais podem ser indicativos da intensidade da mesma. No entanto, é necessário conhecer a composição da mistura dos grãos e o equipamento de torra deve manter-se inalterado (Clifford, 1979). Verificou-se ainda que os diferentes isómeros do ácido quínico apresentam velocidades de degradação diferentes (Clifford, 1979), embora existam em percentagens equivalentes nas duas espécies.

A relação entre a concentração do ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) e cafeína é indicada na literatura como um possível parâmetro de identificação do grau de torra (Pictet e Rehacek, 1982), sofrendo, no entanto, do mesmo problema referido cima (Franca *et al.*, 2001).

Scholz-Böttcher e Maier (1991) estudaram detalhadamente os diversos isómeros do ácido quínico e quinidinas, por GC/MS. Com base no seu comportamento durante a torra, foram também propostos como indicadores do grau de torra, uma vez que existe uma correlação entre o seu grau de isomerização e o grau de torra. No entanto, esta relação parece ser útil para um determinado processo de torra, o que normalmente é desconhecido nas amostras comerciais.

Nehring e Maier (1992) estudaram a relação existente entre a perda de matéria orgânica e a concentração em D-aminoácidos totais. Para o efeito, analisaram os aminoácidos após hidrólise, obtendo um valor do quociente entre os isómeros L e D de cada aminoácido. A alanina demonstrou ser o aminoácido cujo quociente apresentava a correlação mais elevada com a perda de matéria orgânica, sendo a correlação melhorada pelo uso simultâneo de diversos aminoácidos. Para além disso, o método demonstrou ser independente da espécie de café e do tipo de torra praticado. O método apresenta, no entanto, a desvantagem de ser muito demorado, requerendo cerca de dois dias para a análise completa.

O café torrado é considerado uma das matrizes mais complexas no que concerne à sua fracção volátil, com mais de 1000 compostos identificados (Trugo, 2003).

A temperatura utilizada na torra, o tempo, o método de torra e de arrefecimento, bem como o tipo de torrefactor utilizado contribuem para alterações na fracção volátil. No geral, a concentração em voláteis aumenta com o tempo de torra, sendo que alguns compostos atingem o seu máximo antes do final do processo, enquanto que outros aumentam até às torras mais escuras (Dart e Nursten, 1985).

A composição do aroma característico a café ainda não foi totalmente elucidada, se bem que alguns trabalhos de Groch (Semmelroch e Grosch, 1996, Mayer e Grosch, 2001) permitam já a simulação do aroma de cafés de certas regiões, com algum sucesso. Para isso são seleccionados os aromas chave que contribuem para o aroma a café, diminuindo, desta forma, a complexidade das misturas.

Quantitativamente o dióxido de carbono é o composto volátil mais importante, se bem que não contribua para o aroma. Este gás é formado durante a torra do café e vai ser posteriormente libertado muito lentamente. No entanto, após a moagem, o CO₂ é rapidamente libertado. Apesar disso, o uso de válvulas de gás nas embalagens flexíveis de café moído é aconselhado, por forma a evitar a sua retenção na embalagem e possível rebentamento (Clarke, 1987c).

Estudos recentes sugerem o controlo do processo de torra pela monitorização, em linha, de certas substâncias químicas da fracção volátil. Hashim e Chaveron (1996) sugeriram a metilpirazina, enquanto que Zimmermann *et al.* (1996) estudaram os perfis característicos de voláteis.

Também o desenvolvimento de sensores de gases parece mais adaptado à realidade do controlo de qualidade em linha em processos de produção industrial (Aishima, 1991). Os sistemas de sensores de gás electrónicos, mais conhecidos por narizes

electrónicos, têm sido bastante desenvolvidos nos últimos tempos, apresentando potencial para serem aplicados ao controlo do café (Aishima, 1991, Pardo e Sberveglieri, 2002).

A monitorização de compostos do “flavour” libertados durante a torra poderá constituir, talvez, a arma mais poderosa para o controlo deste processo (Dutra *et al.*, 2001). A implementação de metodologias automáticas, sem necessidade de recorrer a processos de preparação e concentração das amostras, bem como a implementação de ajustes automáticos, poderão contribuir para o controlo do processo de torra, nomeadamente no que respeita à homogeneidade dos lotes e à qualidade do aroma (Dorfner *et al.*, 2001).

Capítulo 2 - Os compostos nitrogenados do café avaliados neste estudo

2.1. Cafeína

2.1.1. Introdução

2.1.2. Fontes e consumo

2.1.3. Efeito biológico

2.1.3.1. Cinética e tempo de semi-vida no organismo humano

2.1.3.2. Biotransformação no organismo humano

2.1.3.3. Mecanismo de acção no organismo humano

2.1.3.4. Toxicidade no organismo humano

2.1.3.5. Efeito biológico nas plantas

2.1.5. Metodologias analíticas

2.2. Trigonelina e ácido nicotínico

2.2.1. Introdução

2.2.2. Efeito nos humanos

2.2.3. Efeito nas plantas

2.2.4. Estudos no café

2.2.5. Metodologias analíticas

(cont.)

2.3. D/L-Aminoácidos

2.3.1. Introdução

2.3.2. Origem

2.3.3. Efeito biológico

2.3.4. Importância dos D-AAs no controlo de qualidade

2.3.5. Metodologias analíticas

2.4. Aminas biogénicas

2.4.1. Introdução

2.4.2. Origem

2.4.3. Importância fisiológica nos humanos

2.4.4. Importância fisiológica nas plantas

2.4.5. Metodologias analíticas

2.5. Aminas heterocíclicas aromáticas

2.5.1. Introdução

2.5.2. Alimentação *versus* incidência de cancro

2.5.3. As aminas heterocíclicas aromáticas

2.5.4. Metabolismo e toxicidade das HAAs

2.5.5. Formação de HAAs e medidas preventivas

2.5.6. HAAs *versus* café

2.5.7. Metodologias analíticas

2.6. 4-Metilimidazol

2.6.1. Introdução

2.6.2. Ingestão pelos humanos

2.6.3. Ingestão pelos ruminantes

2.6.4. Toxicocinética, mutagenicidade e carcinogenicidade

2.6.5. Metodologias analíticas

2. Compostos nitrogenados avaliados no café

Atendendo ao referido no capítulo anterior, e por forma a dar cumprimento aos objectivos iniciais deste trabalho de investigação, foi avaliada a fracção azotada do café com maior detalhe. Dentro desta, os compostos seleccionados, que a seguir se descrevem, foram a cafeína, a trigonelina, o ácido nicotínico, os aminoácidos D e L, as amins biogénicas, as amins heterocíclicas aromáticas e o 4-metilimidazol.

Ao longo do capítulo tenta justificar-se a sua escolha, quer pelos efeitos biológicos que lhe são imputados, quer pela sua importância no controlo de qualidade deste produto, de extrema importância no mercado mundial e nacional. As metodologias analíticas usadas na sua determinação, nesta ou noutras matrizes, são referidas e discutidas.

2.1. Cafeína

2.1.1. Introdução

A cafeína é, das substâncias farmacologicamente activas, uma das consumidas com maior frequência no mundo, quer na forma de bebida (café, chá, cola, bebidas estimulantes e/ou revigorantes), produtos de cacau, chocolate e derivados, quer ainda como componente de medicamentos.

O estímulo da actividade mental parece ser a principal razão para que milhões de pessoas em todo o mundo a consumam, nas diferentes formas já referidas.

Atendendo ao consumo generalizado da cafeína, esta tornou-se ubiqüitária no ambiente e constitui um marcador antropométrico de contaminação de águas de superfície. Tal facto preocupa consumidores e comunidade científica, questionando-se a sua inocuidade e possíveis efeitos adversos na saúde humana.

Não é de estranhar, então, que a cafeína seja o composto do café mais estudado. Trata-se de um alcalóide, maioritário na matriz café, e da substância, aparentemente, com maior actividade nos humanos, tendo sido implicada na maioria dos trabalhos científicos visando conhecer os efeitos no sistema cardiovascular, no desenvolvimento da osteoporose e na activação do cancro, entre outros.

Dada a sua grande solubilidade em água quente, a cafeína é extraída em grande parte para o café bebida. Apesar do seu sabor amargo, parece contribuir apenas em cerca de 10% para o amargor total do café bebida e não parece interferir directamente na qualidade sensorial do mesmo.

Pelo referido, qualquer trabalho sobre os compostos nitrogenados do café tem forçosamente que incluir a avaliação dos teores de cafeína. Acresce ainda o facto de ser um composto que não sofre grandes alterações com a torra do café e parece ter capacidade discriminante entre as espécies de maior valor comercial, tal como referido no capítulo anterior.

2.1.2. Fontes e consumo

A cafeína, sendo um alcalóide, é um composto básico. Caracteriza-se pela presença de uma estrutura heterocíclica derivada da purina (Figura 2.1). Encontra-se naturalmente nos grãos de café, nas folhas de chá, no cacau, no guaraná, num total de cerca de 60 plantas (Watson, 2003).

Nos adultos, as principais fontes de ingestão são o café e o chá, enquanto que nas crianças são certas bebidas não alcoólicas e chocolates. A nível mundial, estima-se que 80% da população adulta da maioria dos países consuma cafeína regularmente, embora na sua principal origem possa estar, consoante a tradição de cada país, o café ou o chá. O consumo médio diário ronda os 3-7 mg/kg na maioria dos países consumidores, atingindo, em alguns deles, os 15mg/kg. Nas crianças parece rondar os 1-3 mg/kg (Watson, 2003, Camargo *et al.*, 1999).

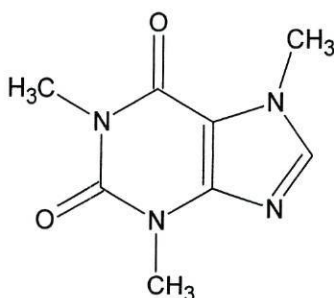


Figura 2.1 – Estrutura química da cafeína (1,3,7-trimetilxantina).

O café robusta torrado contém praticamente o dobro da cafeína do café arábica, respectivamente 2,4% e 1,2%, em peso seco (Illy, 1998).

Quanto à bebida, os teores podem variar de 50 a 160 mg/100 ml (Clifford, 1985a) dependendo da espécie utilizada na sua preparação, do método de preparação e, obviamente, da quantidade de bebida ingerida. Usualmente considera-se o valor médio de 80 mg por porção, nomeadamente em estudos epidemiológicos.

2.1.3. Efeito biológico

2.1.3.1. Cinética e tempo de semi-vida no organismo humano

A absorção da cafeína no tracto gastrointestinal é rápida, embora o tempo necessário para se atingir o pico plasmático varie consoante o indivíduo (15-120 min). A sua absorção é diminuída pela presença de alimentos no tubo digestivo.

Atravessa rapidamente todas as membranas biológicas, incluindo a barreira cerebral. O tempo de semi-vida varia entre 3 e 7 horas, sendo muito elevada durante o primeiro ano de vida devido à imaturidade do sistema citocromo P450 e de alguns dos sistemas de eliminação. A maturação completa deste sistema enzimático só ocorre aos 5-6 meses, razão pela qual a semi-vida plasmática da cafeína nos recém-nascidos pode atingir mais de 100 horas, para além das vias de metabolização serem proporcionalmente diferentes das descritas no adulto (Carrier *et al.*, 1988). Para além de a mulher grávida ser particularmente sensível à cafeína, a capacidade de transpôr a barreira placentária reflecte-se com efeitos nefastos no feto. O tempo de semi-vida aumenta também nos pacientes com cirrose hepática e diminui, para menos de metade, nos fumadores (Bättig, 1985) devido, provavelmente, à indução enzimática.

2.1.3.2. Biotransformação no organismo humano

O metabolismo da cafeína tem sido estudado em diversos animais de experiência mas nenhum metaboliza o composto exactamente da mesma maneira que os humanos, dificultando a sua extrapolação (Stavric e Gilbert, 1990). Estudos nos humanos permitem verificar que a cafeína é praticamente toda metabolizada, sendo apenas cerca de 1% eliminada na urina na forma inalterada.

A sua metabolização ocorre principalmente pelo sistema citocromo P450, como referido, essencialmente por desmetilação do carbono 3, para produzir paraxantina (Figura 2.2), juntamente com outros cerca de 24 metabolitos minoritários já identificados, alguns deles biologicamente activos e potencialmente tóxicos (Stavric e Gilbert, 1990).

O consumo excessivo de cafeína, ou cafeinismo, surge com doses superiores a 250 mg diários, originando nervosismo, agitação, ansiedade, insónia, taquicardia, diurese, náuseas, anorexia, depressão ou mesmo delírio. A LD₅₀ da cafeína é da ordem de 150-200 mg/kg para muitas espécies (Stavric, 1988a). A dose letal aguda no homem parece rondar as 10g, o que equivale a cerca de 75 cafés (Nehlig *et al.*, 1992).

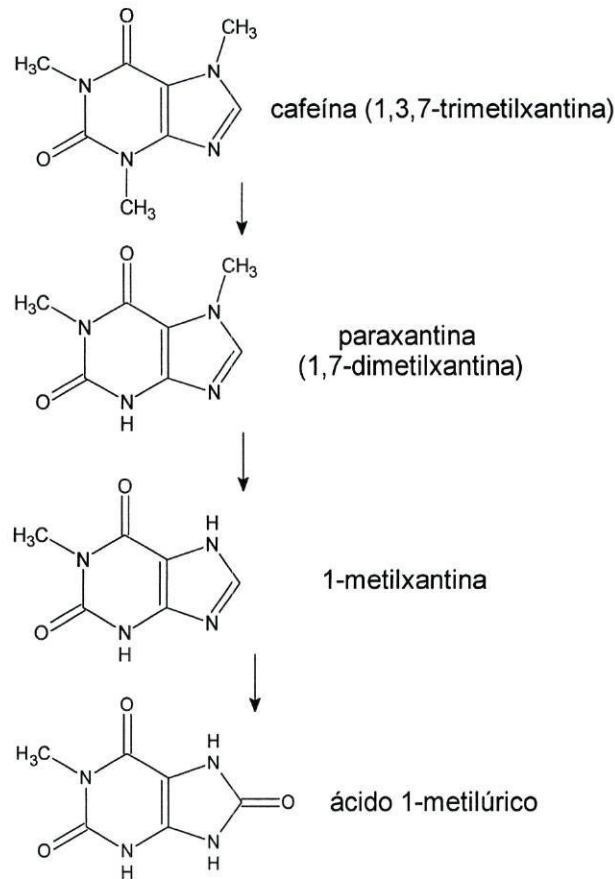


Figura 2.2 – Principal caminho de metabolização da cafeína nos humanos

2.1.3.3. Mecanismo de acção no organismo humano

Cronologicamente são quatro os mecanismos propostos para a acção da cafeína a nível celular: mobilização intracelular do cálcio, inibição das fosfodiesterases, antagonismo ao nível dos receptores da adenosina e ligação aos receptores benzodiazepínicos (Nehlig *et al.*, 1992). É hoje consensual que o principal mecanismo de acção da cafeína surge pela competição com a adenosina ao nível dos seus receptores, amplamente espalhados pelo organismo humano. A adenosina está associada à broncoconstrição, à inibição da secreção gástrica, da lipólise, da libertação de renina e de certos neurotransmissores, entre outros, efeitos opostos aos descritos para a cafeína (Bättig, 1985, Nehlig *et al.*, 1992).

De realçar, no entanto, que um interessante e recente estudo veio demonstrar a capacidade de um derivado neutro dos ácidos clorogénicos, formado durante a torra, inibir a recaptção da adenosina. Este composto apresenta uma afinidade três vezes superior à da cafeína para os receptores da adenosina. Trata-se da 3,4-diferuloil-1,5-quinolactona, um composto formado a partir dos ácidos clorogénicos, parecendo ser apenas um de muitos

compostos isoméricos provavelmente com a mesma actividade (Paulis *et al.*, 2002). Esta descoberta poderá servir de justificação da sensação de “estímulo” descrita também após a ingestão de café descafeinado.

Os efeitos da ingestão de cafeína/café no organismo humano têm sido alvo de diversos estudos epidemiológicos. Os resultados apresentam-se, no entanto, frequentemente contraditórios. Grande parte dos resultados controversos obtidos nestes estudos poderá dever-se ao desconhecimento do teor real de cafeína ingerido pelos indivíduos. As variações na concentração final em cafeína e o volume de bebida ingerido são frequentemente ignorados, utilizando de uma forma generalizada os valores de consumo médios (Stavric *et al.*, 1988b). A tolerância desenvolvida pelos consumidores habituais também poderá constituir mais um factor a alimentar esta controvérsia (Starvic, 1992).

Os efeitos no sistema cardiovascular têm sido estudados experimentalmente e através de estudos epidemiológicos. O principal efeito cardiovascular da cafeína parece ser a vasoconstrição periférica, resultando num aumento da pressão sanguínea sistólica e diastólica (Nawrot *et al.*, 2003), com desenvolvimento de tolerância nos consumidores regulares. Dados os seus efeitos pressores é, por vezes, aconselhada como complemento na terapia da hipotensão, postural e pós-prandial. O seu efeito no ritmo cardíaco é menos consistente. No que diz respeito à propensão para o desenvolvimento de doença coronária, numerosos estudos epidemiológicos indicam que, na verdade, o consumo do café não parece constituir um factor de risco (Christensen e Murray, 1990, Schilter *et al.*, 2001), excepto para os grandes consumidores (mais de 1000 mg /dia), embora, mesmo nesses casos, ainda existam dados epidemiológicos insuficientes (Nawrot *et al.*, 2003).

No que concerne ao potencial da cafeína para influenciar o metabolismo ósseo, nomeadamente a propensão para a osteoporose, ainda não é claro. A interpretação dos dados epidemiológicos tem sido complicada, pois estão frequentemente associados outros riscos, nomeadamente a ingestão de cálcio, a idade, e o consumo de tabaco e álcool. Os estudos epidemiológicos que demonstram um efeito negativo podem, em parte, ser explicados por uma relação inversa entre o consumo de leite e o de bebidas com cafeína. Até à data, a evidência parece indicar que o consumo de cafeína em doses inferiores a 400 mg/dia não afecta significativamente o balanço do cálcio e o estado ósseo de indivíduos que ingerem quantidades adequadas de cálcio (cerca de 800 mg/dia) (Heaney, 2002, Nawrot *et al.*, 2003).

Um dos efeitos descritos nos humanos diz respeito à alergia ao café verde, com manifestações de urticária, rino-conjuntivite e asma brônquica (Karr, 1979). Os sintomas estão associados à manipulação do café verde e, embora descritos como sendo de desenvolvimento proporcional à duração da exposição, a sintomatologia pode surgir muito rapidamente e de forma aguda, conforme verificado pela autora deste trabalho durante a realização da parte experimental, em especial com o café verde, matriz à qual, ironicamente, verificou ser alérgica. Este fenómeno alérgico constitui uma doença ocupacional nos trabalhadores das plantações de café e nos envolvidos no seu transporte. O alergeno, ainda não identificado, encontra-se também no café torrado, mas em menor quantidade (Lemièrre *et al.*, 1996), ou seja, é parcialmente destruído durante a torra. Já a ingestão a longo prazo, de doses moderadas de café bebida, parece contribuir para uma redução dos sintomas e prevenção das manifestações clínicas usais da bronquite asmática (Stavric, 1992).

A cafeína também aumenta a secreção gástrica e, embora sem evidência que o consumo de café provoque úlcera péptica, o certo é que o seu consumo é desaconselhado em pessoas com úlceras desta natureza (Macrae, 1985).

Os efeitos no sistema nervoso central são diversos e pouco conhecidos. Devido à sua acção vasoconstritora provoca uma redução no fluxo sanguíneo cerebral em cerca de 15%.

Já nos padrões de sono os efeitos da cafeína são melhor conhecidos: a ingestão de cafeína retarda a sensação de sono; aumenta a duração da fase 2 do sono, a mais leve; e diminui as fases 3 e 4, as de sono mais profundo; sendo os consumidores habituais menos sensíveis a este efeito (Nehlig *et al.*, 1992).

Os efeitos da cafeína no comportamento humano, nomeadamente no “desempenho” e no humor, são frequentemente inconsistentes. Em geral, doses normais de cafeína aumentam o estado de alerta mas não parecem provocar alterações do humor, embora possam aumentar a ansiedade (Nawrot *et al.*, 2003). A aparente correlação entre o consumo habitual de cafeína e o retardar do declínio cognitivo no envelhecimento, não parece confirmar-se nos estudos mais recentes (Boxtel *et al.*, 2003). Embora com resultados contraditórios, o consumo moderado de cafeína não está associado a nenhum efeito adverso nesta área.

No que concerne à doença de Parkinson, os estudos mais recentes parecem indicar que existe um possível efeito protector associado ao consumo moderado de cafeína (1-3 chávenas/dia) (Ascherio *et al.*, 2001). No entanto, também neste caso, os estudos epidemiológicos são difíceis de interpretar, dado que o tabaco parece ter um efeito

semelhante.

2.1.3.4. Toxicidade no organismo humano

Dada a similaridade química entre a cafeína e os componentes purínicos dos ácidos nucleicos, muitos investigadores têm avaliado o seu potencial mutagénico. Na realidade, a cafeína dá resultados positivos em diversos ensaios de mutagenicidade, em organismos eucarióticos e linhas celulares humanas. Embora a evidência para o potencial mutagénico seja contraditória, parece ser pouco provável que, em doses inferiores às reportadas como tóxicas, ocorram efeitos mutagénicos para o homem (Nawrot *et al.*, 2003).

O efeito teratogénico da cafeína foi já claramente demonstrado em roedores, apresentando diferenças marcadas entre espécies. Nos humanos, a cafeína não representa nenhum risco teratogénico quando consumida com moderação e ao longo do dia (Christian *et al.*, 2001), mesmo com o metabolismo na grávida mais lento, principalmente no terceiro trimestre da gestação. No entanto, a cafeína pode potenciar o efeito teratogénico de outras substâncias, tais como o tabaco ou o álcool, e actua sinergicamente com a ergotamina ou o propanolol na indução de vasoconstricção materno-fetal, podendo conduzir a malformações por isquémia (Nehlig *et al.*, 1994).

Embora o consumo de cafeína não pareça estar associado com malformações congénitas ou partos pré-termo, o mesmo já não se pode dizer da sua associação à infertilidade, aborto e retardamento do crescimento intrauterino, sendo necessários mais estudos na área (Golding, 1995, Nawrot *et al.*, 2003). Parece aconselhável de uma forma geral que, nestes casos, o seu consumo seja reduzido para doses inferiores a 300 mg/dia. Estando o consumo de café estatisticamente associado ao consumo de tabaco e bebidas alcoólicas, os estudos nesta área conduzem frequentemente a poucas ou nenhuma conclusões (Christian e Brent, 2001).

Embora se encontrem descritos na literatura numerosos estudos de toxicidade em animais de experiência, só em 1988 foi feita a primeira revisão referente à toxicidade da cafeína em humanos (Stavric, 1988a). Uma descrição pormenorizada dos trabalhos realizados, com o intuito de encontrar uma possível associação com vários tipos de cancro pode encontrar-se na monografia da WHO/IARC (1991), ou mesmo nas revisões mais recentes de Nawrot *et al.* (2003) ou Porta *et al.* (2003). Em geral, não se verificam associações consistentes entre o consumo de cafeína e o desenvolvimento de cancro

(Nawrot *et al.*, 2003), mesmo para os casos em que, aparentemente, as evidências eram maiores, caso do cancro da bexiga, do pâncreas ou da mama. Com base nos estudos reportados até 2003, Nawrot *et al.* descrevem como pouco provável a associação entre o desenvolvimento de cancro e a ingestão de cafeína em doses inferiores a 5 chávenas/dia.

2.1.3.5. Efeito biológico nas plantas

Os alcalóides purínicos têm uma distribuição limitada no reino vegetal (Ashihara e Crozier, 2001), não sendo sempre a cafeína a apresentar-se como o principal, tal como se verifica no café. Estudos recentes indicam que esta se acumula preferencialmente nos rebentos novos, nas folhas e sementes imaturas (Zheng e Ashihara, 2004), continuando a acumular-se durante a maturação destas (Ashihara *et al.*, 2001). Segundo alguns autores, poderá constituir um mecanismo de defesa das partes novas da planta, sendo a cafeína frequentemente descrita, a nível botânico, como um agente antifúngico e insecticida, tal como outros alcalóides produzidos nas espécies vegetais.

Nos grãos de café, a cafeína encontra-se livre no citoplasma ou ligada à parede celular, encontrando-se maioritariamente complexada com clorogenato de potássio (Clifford, 1985b). Os maiores teores parecem encontrar-se no endosperma, embora possam variar com a espécie (Mazzafera *et al.*, 1991a).

Conforme foi já referido, o café robusta torrado contém praticamente o dobro da cafeína do café arábica, embora apresente marcadas diferenças inter e intra-espécie. Num estudo com várias espécies do género *Coffea*, Mazzafera *et al.* (1991a) concluíram que a *C. canephora* apresenta os maiores teores de cafeína e a *C. bengalensis* os mais reduzidos.

Dado que o consumo de café descafeinado tem vindo a aumentar nos últimos tempos, torna-se cada vez mais importante o desenvolvimento de espécies transgénicas, com o mecanismo de biossíntese da cafeína bloqueado, por forma a evitar os dispendiosos processos de extracção desta substância. No entanto, por variadas razões, nomeadamente de natureza genética, agronómica ou de qualidade da bebida obtida, nenhuma espécie transgénica se encontra a ser produzida comercialmente com esse propósito (Vossen, 2001). Para o desenvolvimento destas espécies em muito tem contribuído o conhecimento dos mecanismos de biossíntese e degradação da cafeína na própria planta, cujo conhecimento apenas foi desbravado na última década.

Assim, o principal caminho biossintético parece utilizar os nucleótidos purínicos: adenosina 5'-monofosfato → inosina 5'-monofosfato → xantosina 5'-monofosfato → xantosina → 7-metilxantosina → 7-metilxantina → 3,7-dimetilxantina (teobromina) → 1,3,7-

trimetilxantina (cafeína) (Mazzaferri *et al.*, 1991a, 1994). A xantosina constitui, na verdade, o primeiro composto purínico no caminho biossintético da cafeína, actuando como um substrato para os grupos metilo fornecidos pela S-adenosil-L-metionina (SAM), reacções estas catalizada por N-metiltransferases (Ashihara *et al.*, 2001).

O catabolismo da cafeína parece ocorrer muito lentamente, envolvendo desmetilações sucessivas a teofilina e teobromina, sendo posteriormente catabolisada em xantina, esta já com um metabolismo mais rápido, para originar dióxido de carbono e amoníaco via ácido úrico, alantoína e alantoato (Ashihara *et al.*, 2001).

Contrariamente ao elevado teor de cafeína na semente, o teor deste alcalóide na polpa é superior no café arábica (Clifford e Ramirez-Martinez, 1991). Enquanto que a polpa do café robusta parece conter cerca de 0,5 % de cafeína, em peso seco, no café arábica esses valores atingem os 1,6%. Este facto é de grande importância, já que a polpa representa cerca de 30% do peso da cereja fresca e é eliminada durante o processamento a húmido do café arábica, constituindo um contaminante ambiental, conforme referido no capítulo 1.

2.1.4. Metodologias analíticas

A cafeína é o composto mais frequentemente determinado no café e derivados, tendo as metodologias sofrido inúmeros desenvolvimentos nas últimas décadas. Inicialmente as determinações baseavam-se em medições gravimétricas, em extractos clorofórmicos, ou através da determinação do azoto dos alcalóides por um método baseado no de Kjeldhal (Macrae, 1985).

Sabendo que a cafeína absorve fortemente na região do ultravioleta, diversos métodos espectrofotométricos foram desenvolvidos, embora apresentando sempre interferentes. A falta de especificidade destes métodos levou à separação prévia do composto antes da medição espectrofotométrica. Nesta área, a cromatografia em camada fina apresentou-se, inicialmente, como a mais simples, mas de quantificação difícil. A cromatografia gasosa também é, por vezes, utilizada, mas sem dúvida que os maiores desenvolvimentos se reportam à cromatografia líquida (HPLC), principalmente de fase-reversa com detecção no ultravioleta. Esta técnica permite ainda a determinação simultânea de outras xantinas importantes, nomeadamente a teofilina e a teobromina, ou de outros compostos com interesse para cada análise específica, como poderá constituir a

determinação simultânea da trigonelina ou do ácido nicotínico, conforme será reportado nas páginas seguintes.

Quando comparada a injeção directa de extractos clorofórmicos em cromatografia líquida e gasosa, a primeira permite melhor resolução e sensibilidade, embora ambas possam já ser utilizadas para determinações ao nível do nanograma, permitindo a análise do teor de cafeína em produtos descafeinados, incluindo café descafeinado (Muhtadi *et al.*, 1990).

Outras técnicas menos frequentes, mas com a vantagem de não requererem limpeza prévia dos extractos, são a electroforese capilar (Hurst e Martin, 1993), a sua variante cromatografia micelar electrocinética (MECC) (Burton e Powell, 1994), ou métodos espectroscópicos (Fábian *et al.*, 1994).

No campo da extracção é usual recorrer à clarificação com acetato de chumbo e filtração, para remoção do material polimérico e proteico. A limpeza dos extractos por colunas de extracção em fase sólida tem vindo a ser cada vez mais utilizada. No entanto, e para satisfazer as exigências do controlo de qualidade, é de toda a vantagem a existência de métodos totalmente automatizados. As análises por sistemas de injeção em fluxo contínuo associados, por exemplo, a detecção amperométrica, permitem a análise rápida e automatizada do teor de cafeína em bebidas não alcoólicas (Lima *et al.*, 1998). A sua aplicação à análise do café será, por certo, difícil, requerendo obrigatoriamente o emprego de processos de limpeza prévia do extracto, ou de processos de extracção selectivos. As mais recentes técnicas de extracção em fase sólida (Hawthorne *et al.*, 1992) poderão preencher estes requisitos, ou mesmo a extracção por fluidos supercríticos.

2.2. Trigonelina e ácido nicotínico

2.2.1. Introdução

Tal como a cafeína, a trigonelina (ácido 1-*N*-metilnicotínico) cuja estrutura se apresenta na Figura 2.3, é um metabolito secundário das plantas, derivado dos nucleótidos piridínicos NAD e NADP. No entanto, e contrariamente à primeira, pouco se sabe ainda sobre a sua função nestas ou mesmo nos humanos, onde também é detectada. Isolada pela primeira vez de *Trigonella foenum-graecum* L., razão da sua designação, encontra-se em muitas sementes e frutos, bem como em crustáceos (Viani e Horman, 1974). De entre os legumes, os maiores teores são reportados em ervilhas, grão-de-bico e lentilhas, com valores da ordem dos 100-300 µg/g (Zwart *et al.* 2003), apresentando o café teores cerca de 10 vezes superiores, como será discutido com mais detalhe a seguir.



Figura 2.3. Estrutura química da trigonelina, ácido nicotínico e nicotinamida.

O ácido nicotínico, sem o grupo metilo da trigonelina, e a sua amida (nicotinamida) encontram-se mais amplamente distribuídos na natureza, tomando frequentemente o nome conjunto de niacina, vitamina PP ou vitamina B₃. Estes compostos formam o núcleo funcional dos nucleótidos piridínicos NAD e NADP, a forma activa desta vitamina. São importantes transportadores de electrões numa grande variedade de reacções de oxidação/redução. Embora vulgarmente designada vitamina, não se pode considerar que seja verdadeiramente essencial, dado que o núcleo de nicotinamida das coenzimas referidas pode ser sintetizado *in vivo* a partir do aminoácido triptofano, este sim essencial. A necessidade diária do organismo humano em niacina, estimada em 13 a 17 mg nos adultos, está dependente da ingestão de triptofano, considerando-se usualmente que 60 mg deste são equivalentes a 1 mg de niacina.

A niacina está presente numa grande variedade de alimentos, com os maiores teores reportados em leveduras e derivados, cereais e derivados, carne e peixe. Pelo triptofano que contêm, os lacticínios e os ovos também podem ser consideradas fontes de niacina, embora o seu teor seja efectivamente reduzido. De referir que, nos produtos naturais, a niacina se apresenta usualmente numa forma ligada, que em certos casos pode não ser biologicamente activa.

Durante muitos anos considerou-se que a niacina no milho não se apresentava como biologicamente activa, conduzindo ao desenvolvimento endémico de pelagra nas populações que consumiam milho como base de alimentação. Hoje, parece mais certo que o factor de desenvolvimento de pelagra nestas populações tem como base os aminoácidos do milho, caracterizados por um teor reduzido em triptofano (Shibata *et al.*, 1996), conduzindo a um aumento na necessidade da vitamina. Uma deficiência concomitante de vitamina B₆ também parece contribuir para essa situação, uma vez que esta vitamina participa na conversão triptofano-niacina (Shibata *et al.*, 1995).

2.2.2. Efeito nos humanos

Para o homem o ácido nicotínico/nicotinamida apresenta-se como mais importante do que a trigonelina, ou não se tratasse de uma “vitamina”. Como todas as vitaminas hidrossolúveis, o ácido nicotínico e a nicotinamida são absorvidos no intestino delgado por um processo de transporte activo saturável, ou mesmo por difusão se a concentração for muito elevada. Os nucleótidos de nicotinamida ingeridos (NAD e NADP) têm que ser primeiro hidrolisados em nicotinamida livre para que sejam absorvidos. No organismo humano, a principal forma na circulação é a nicotinamida, na qual o ácido nicotínico é transformado, e posteriormente convertido em NAD, não se conhecendo nenhum tecido como local específico para o seu armazenamento.

Com concentrações séricas normais de niacina não se observa a sua excreção urinária, sendo reabsorvida activamente a partir do filtrado glomerular. De entre os diversos metabolitos da niacina citam-se o derivado metilado, a trigonelina, embora o maioritário seja a *N*-metilnicotinamida (Berglund, 1994). Como foi já referido, existem diversos alimentos que contêm trigonelina na sua composição, pelo que a presença desta na urina poderá não reflectir directamente a metabolização da niacina. A trigonelina ingerida também é absorvida no tracto gastrointestinal mas é, mais usualmente, excretada inalterada, dado que não pode ser utilizada *in vivo* como fonte de niacina.

Embora a niacina tenha um papel central no metabolismo energético, não é essencial a sua ingestão na dieta, como já foi referido, dado que a ingestão média proteica contém triptofano suficiente. A pelagra surge apenas quando a ingestão de triptofano e niacina é inadequada, sendo um problema frequente em certas regiões onde o milho e o sorgo constituem a base alimentar. Pode ainda surgir pelagra pelo uso de determinados medicamentos que conduzem à depleção do NAD ou à inibição do metabolismo do triptofano.

O ácido nicotínico também é considerado um agente hipolipidémico, utilizado com esse propósito há muitos anos, sendo capaz de reduzir os níveis de triglicédeos e colesterol em mais de 20% (Pike e Wise, 2004).

A trigonelina, por seu lado, foi já detectada em plasma e urina humanos. Parece ter predominantemente origem alimentar, com uma ingestão diária que pode atingir os 500 mg, de acordo com Zwart *et al.* (2003). No entanto, estes valores podem variar significativamente dependendo do tipo de alimentos consumidos e do processo culinário utilizado. Por exemplo, como é bastante solúvel em água, os seus teores são reduzidos pela cozedura, em água ou em vapor.

Quando comparada com a cafeína, a trigonelina apresenta menor toxicidade e também menor actividade biológica. A sua função no organismo humano permanece por esclarecer (Zwart, 2003). Parece exercer efeito na secreção biliar e na motilidade intestinal (Macrae, 1985) mas apenas em doses muito superiores às resultantes da ingestão do café. Estudos recentes parecem levantar a hipótese de que as betaínas em geral, na qual a trigonelina se encontra, para além de actuarem como osmólitos, parecem também desempenhar um papel provável na diminuição da concentração de homocisteína plástica nos humanos, sendo os teores elevados deste composto frequentemente associados a um aumento do risco de doença vascular (Zwart, 2003).

2.2.3. Efeito nas plantas

Foram já identificadas, nas plantas superiores, mais de 30000 substâncias diferentes, classificadas como metabolitos secundários. Sabe-se hoje que é na interacção entre os organismos e as alterações ambientais que o metabolismo secundário desempenha o seu papel preponderante (Berglund e Ohlsson, 1995). A trigonelina e o ácido nicotínico encontram-se entre estes metabolitos mas, contrariamente aos animais, parece que a trigonelina apresenta nas plantas função/funções de maior importância (Berglund, 1994).

Inicialmente a trigonelina era considerada apenas um subproduto do catabolismo do NAD(P) mas a descoberta nas plantas da enzima trigonelina sintetase, ou metiltransferase do ácido nicotínico, veio modificar este estatuto. Segundo Shimizu e Mazzafera (2000), a trigonelina poderá constituir um composto de reserva para a síntese de NAD, podendo também estar implicada na resposta ao stress oxidativo. Diversos estudos parecem concluir que a trigonelina funciona como um regulador do ciclo celular de crescimento nos meristemas das raízes. Esta sua actividade parece ter alguma especificidade, pois não pode ser substituída por outros análogos betaínicos.

Por outro lado, o teor de trigonelina tem sido avaliado em diversas plantas sujeitas a variados tipos de stress. Foi evidenciada a sua acumulação em situações de, por exemplo, stress salino, acentuando a sua função osmorreguladora (Tramontano e Jouve, 1997). Pelo referido, os teores de trigonelina poderão provavelmente ser também indicadores de stress.

A trigonelina parece ainda interferir no consumo de grupos metilo. Ao ser formada por metilação do ácido nicotínico utiliza grupos metilo da S-adenosil-L-metionina (SAM), que o dador de metilos mais usual na metilação do DNA, influenciando desta forma o grau de metilação do referido ácido nucleico (Berglund *et al.*, 1994, 1995).

A presença de trigonelina e outras betaínas é, ainda, frequentemente associada à defesa da planta contra infecções fúngicas (Berglund e Ohlsson, 1995).

Nas plantas, o ácido nicotínico é um precursor directo da trigonelina, exercendo provavelmente o seu efeito através dela. Quando fornecido às plantas é utilizado para a síntese de trigonelina, NAD e NADP. O ácido nicotínico e a nicotinamida podem surgir nestas como produtos de degradação dos nucleótidos piridínicos, NAD e NADP mas, dado que teores elevados de ácido nicotínico são tóxicos para as plantas, a sua conversão em trigonelina, conforme verificada em ensaios experimentais (Zheng, 2004), poderá constituir um mecanismo de destoxificação.

Estudos recentes sugerem que os teores de nicotinamida podem constituir um primeiro sinal na defesa das células eucarióticas, nomeadamente em condições que causem quebra das cadeias de DNA, caso do stress oxidativo (Berglund, 1994).

2.2.4. Estudos no café

Os teores de trigonelina encontrados no café arábica verde (0,6-1,3%) são usualmente superiores aos do café robusta (0,3-1,1%) (Stennert e Maier, 1994), com maior dispersão no segundo (Ky *et al.*, 2001), e aparentemente sem capacidade para discriminar

estas duas espécies. Mazzafera (1991b), Stennert e Maier (1994) e, mais recentemente, Campa *et al.* (2004) estudaram espécies menos comuns do género *Coffea*, encontrando valores muito diversos, mas geralmente inferiores ao daquelas espécies.

Conforme largamente discutido por Campa *et al.* (2004), os teores superiores de trigonelina no café arábica, comparativamente ao robusta, podem ser explicados geneticamente. Na realidade, o café arábica parece ter resultado do cruzamento de duas espécies, *C. canephora* e *C. eugenioides*, este último caracterizado por teores semelhantes ao encontrados no café arábica.

De qualquer forma, o café caracteriza-se por ser um dos produtos com maiores teores deste composto, conforme foi já referido. A razão para este “fenómeno” permanece por esclarecer. A trigonelina encontra-se não só na semente, mas distribuída por toda a planta (Zheng, 2004). Embora a sua concentração varie de órgão para órgão, é mais levada nas partes mais novas do caule e mais reduzida nas raízes. Shimizu e Mazzafera (2000) avaliaram os teores de trigonelina nas sementes de café durante as várias fases da sua germinação, verificando que a trigonelina sofre redução durante este processo, com um aumento simultâneo dos nucleótidos piridinícos. Sugerem assim um envolvimento desta como precursor do NAD (Mazzafera, 1991). Não foi encontrada nenhuma relação entre o teor de trigonelina e o tamanho da semente (Mazzafera, 1991).

Os teores em ácido nicotínico são comparativamente muito reduzidos no café verde, com valores da ordem do 1 mg/100g ou inferiores (Trugo e Macrae, 1989).

O metabolismo do ácido nicotínico e a biossíntese da trigonelina ainda não foram confirmados no café nem a presença da trigonelina sintetase ou do gene responsável pela acumulação de trigonelina.

Durante a torra, a trigonelina é parcialmente degradada (80-90%), sendo a sua perda proporcional à drasticidade do processo (Illy, 1995). Este facto levou a que os seus teores fossem utilizados com o intuito de monitorizar o grau de torra, como referido anteriormente. O café sujeito à torra tradicional apresenta maiores perdas de trigonelina comparativamente com a torra rápida, embora na prática as diferenças não sejam significativas (Stennert e Maier, 1994).

Parece de destacar o composto não volátil formado por desmetilação da trigonelina durante a torra – o ácido nicotínico (Viani e Hofman, 1974, Taguchi *et al.*, 1985, Trugo e Macrae, 1989). Embora existente em pequena quantidade (10-40 mg/100 g), constitui cerca de 1,5% da trigonelina degradada (Macrae, 1985). A sua presença pode ser importante do ponto de vista nutricional, ainda mais porque, contrariamente a outras fontes naturais que

contêm esta vitamina, no café encontra-se na forma livre (Trugo, 2003). Tal seria de esperar devido à sua formação a partir da degradação térmica da trigonelina e foi já comprovado em humanos. A ingestão de 4 chávenas de café diárias, correspondendo a cerca de 8-10 mg de ácido nicotínico total, ou seja, a metade da dose diária recomendada, durante um período de três meses, faz desaparecer os sintomas característicos de pelagra e normalizar os níveis de nicotinamida plasmática nos pacientes testados. Para além de demonstrar que o ácido nicotínico da bebida é biologicamente activo, demonstrou-se também que a ingestão de café poderá constituir um importante complemento nutricional nas populações subnutridas, principalmente sabendo que muitas delas têm como importante fonte de rendimento a produção de café (Adrian *et al.*, 1971).

O teor de ácido nicotínico no café descafeinado é reduzido, provavelmente pela extracção parcial de trigonelina que se verifica durante o processo de extracção da cafeína (Macrae, 1985).

Dos muitos compostos heterocíclicos voláteis formados pela decomposição da trigonelina em sistemas modelo, são de destacar numerosas alquilpiridinas e pirróis (Viani e Horman, 1974) os quais são importantes contribuintes para o aroma característico do café torrado. A piridina parece, no entanto, também ter origem a partir da pirólise das proteínas, nomeadamente dos aminoácidos hidroxilados, de acordo com De Maria *et al.* (1996a). Wu *et al.* (1997) referem que após aquecimento da trigonelina em sistemas modelo o produto resultante apresenta mutagenicidade, embora não tenha sido identificado o composto responsável.

Em estudos modelo foram também identificados mais recentemente alquilpiridiniums voláteis, principalmente 1-metilpiridinium, cuja formação parece proporcional ao grau de torra, atingindo valores da ordem dos 0,25% no café mais torrado (Stadler *et al.*, 2002). Conforme adiantado pelos autores, este novo composto poderá também ter importantes implicações no flavour/aroma do café.

Por outro lado, um trabalho recente dedicado à pesquisa dos compostos mais importantes no mecanismo quimioprotector e antioxidante do café bebida, permitiu verificar que, contrariamente a todas as expectativas, o ião *N*-metilpiridinium apresentou o maior efeito *in vivo*, tendo os animais de experiência apresentando maior capacidade antioxidante e teores de tocoferol plasmático mais elevados (Somoza *et al.*, 2003) comparativamente com o clássico ácido clorogénico (5-CQA).

A maior parte dos efeitos fisiológicos do café têm sido, na realidade, atribuídos à

cafeína, aos diterpenos kahweol e cafestol e aos ácidos clorogénicos, tendo estes últimos sido responsabilizados pelo incremento da capacidade antioxidante plasmática verificada após a ingestão do café bebida. No entanto, a mesma capacidade antioxidante parece depender do grau de torra, aumentando proporcionalmente a esta. Se os ácidos clorogénicos são parcialmente degradados durante a torra, dificilmente serão os únicos implicados no processo. As melanoidinas formadas, algumas das quais já com estrutura identificada, parecem ser também importantes colaboradores. A recente descoberta do envolvimento do ião *N*-metilpiridinium poderá abrir novos entendimentos nesta problemática.

A trigonelina é extraída para a infusão, dada a sua elevada solubilidade em água (Macrae, 1985). Devido ao seu sabor naturalmente amargo, a pequena percentagem residual de trigonelina no café torrado poderá contribuir para o amargor da bebida, embora em muito pequena extensão.

Um estudo recente demonstrou que a ingestão de café conduz a uma elevação do teor de homocisteína plasmática (Urgert *et al.*, 2000), um aminoácido não-proteico, reconhecido como factor de risco de doenças vasculares coronárias, cerebrais e periféricas (Slow *et al.*, 2004). Conforme especulado por Zwang *et al.* (2003), este fenómeno poderá resultar da ingestão de trigonelina, a qual pode interferir competitivamente no mecanismo de metilação da homocisteína a metionina, por acção da betaína-homocisteína metiltransferase (Slow *et al.*, 2004). O consumo de alimentos que contenham elevadas quantidades de trigonelina, dos quais o café encabeça certamente a lista, não é desaconselhado, sendo necessários mais estudos para esclarecer o efeito do seu consumo no metabolismo da homocisteína (Slow *et al.*, 2004).

2.2.5. Metodologias analíticas

Embora estes compostos sejam frequentemente avaliados em diversos produtos alimentares, principalmente o ácido nicotínico, os estudos em café são mais restritos. Os primeiros métodos descritos eram gravimétricos e colorimétricos (Macrae, 1985) mas, tal como noutras áreas, as determinações cromatográficas têm surgido em sua substituição, permitindo assim também a determinação simultânea de outros compostos. Também os métodos microbiológicos têm vindo a ser substituídos.

A Tabela 2.1 resume alguns dos métodos reportados na literatura utilizados para avaliação em café de trigonelina e ácido nicotínico, individual ou simultaneamente com outros compostos.

Tabela 2.1 – Alguns métodos descritos na literatura para avaliação simultânea de trigonelina e/ou ácido nicotínico em café

Composto	Metodologia	Referência
T e C	HPLC (IC) / UV	van Duijn <i>et al.</i> , 1979
T e C	HPLC-RP / UV	Trugo <i>et al.</i> , 1983
T e N	microbiológico	Taguchi <i>et al.</i> , 1985
N	HPLC-RP / UV	Trugo e Macrae, 1985
T e S	HPLC / ELSD	Trugo <i>et al.</i> , 1989
T	HPLC-RP / UV	Mazzafera, 1991
T	TLC	Stennert e Maier, 1993
T e C	HPLC-RP / UV	Stennert e Maier, 1994
T, N, CGA, C e HMF	HPLC-RP / UV	Daglia <i>et al.</i> , 1994
T, C e CGA	HPSEC / UV	De Maria <i>et al.</i> , 1995
T, C, CGA e S	HPSEC / RI	De Maria <i>et al.</i> , 1996b
N	GC / NPD	Stennert e Maier, 1996
T	HPLC (IC) / UV	Martín <i>et al.</i> , 1997
T	HPLC / UV	Zwart <i>et al.</i> , 2003
T, C, N e derivados	HPLC-RP / UV	Zheng e Ashihara, 2004

T = trigonelina; C = cafeína, CGA = ácido clorogénico, N = ácido nicotínico, S = sacarose;
HMF = 5-hidroximetilfurfuraldeído; IC = cromatografia iónica; ELSD = evaporative light scattering detector; HPSEC/RI = cromatografia por exclusão de tamanho / índice de refração.

2.3. D,L-Aminoácidos

2.3.1. Introdução

Com a exceção da glicina, todos os α -aminoácidos contêm, pelo menos, um carbono assimétrico, o que permite dois arranjos espaciais diferentes. Trata-se de estereoisômeros, em que uma forma está para a outra como uma imagem num espelho (ver Figura 2.4). Por analogia à nomenclatura do gliceraldeído são designados estereoisômeros D e L ou, mais comumente, enantiômeros.

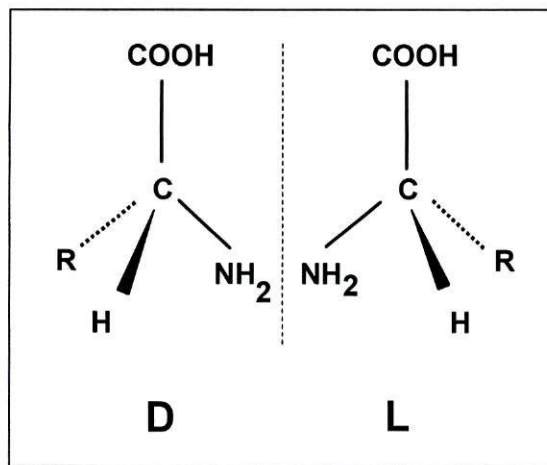


Figura 2.4: Configuração dos aminoácidos D e L.

As proteínas são constituídas fundamentalmente por L-aminoácidos (L-AAs) unidos por ligações peptídicas. Os D-aminoácidos (D-AAs) eram, até há alguns anos, considerados “não naturais”, ou “não fisiológicos”, já que não pareciam existir naturalmente nas proteínas (Dominguéz *et al.*, 1990). Com os progressos nos métodos analíticos de separação quiral de aminoácidos, essencialmente cromatográficos, têm sido descritos muitos D-AAs, nas proteínas e na forma livre, em seres procariotas e eucariotas (Kreil, 1997, Sakai *et al.*, 1998).

Os D-AAs encontram-se principalmente no peptidoglicano da parede celular de bactérias (D-alanina e um derivado do ácido D-glutâmico), bem como em numerosos antibióticos, tais como penicilina, bacitracina, etc. (Lida *et al.*, 2001). Diversos péptidos bioativos, com D-aminoácidos na sua sequência, têm sido também isolados de diversos animais, tais como rãs, cobras, crustáceos, etc. (Kreil, 1997, Lida *et al.*, 2001).

Mais recentemente, foi descrita a presença de péptidos com D-aminoácidos em mamíferos, inclusive no Homem. Estes péptidos foram detectados no soro, na urina, no

fluido cerebrospinal, nos dentes, no cristalino ocular e no cérebro (Imai *et al.*, 1997). Neste último, foi referido ácido D-aspartico na composição da mielina, onde se pensa sofrer acumulação ao longo do tempo, resultante da isomerização dos enantiómeros L a D (Sela e Zisman, 1997, Susuki *et al.*, 1997). Resíduos de ácido D-aspartico, D-alanina e D-serina foram detectados no tecido cerebral de pacientes com a doença de Alzheimer, mais precisamente na proteína β -amilóide (Fisher *et al.*, 1991, Nagata *et al.*, 1995). No entanto, trata-se apenas de péptidos parcialmente racemizados, embora péptidos com actividade biológica ainda não tenham sido isolados no Homem.

A presença de D-aminoácidos em péptidos naturais com mais de 20 aminoácidos é muito rara. As proteínas contendo D-AAs são usualmente fruto de “design” molecular ou de experiências de engenharia proteica, principalmente na área farmacêutica (Mitchell e Smith, 2003).

Já a presença de D-aminoácidos livres nos fluidos fisiológicos dos mamíferos é, hoje, encarada como vulgar, como demonstram, por exemplo, trabalhos recentes de Schieber *et al.* (1997) ou Brückner e Schieber (2000). Estes últimos autores descrevem a D-alanina e D-serina como os enantiómeros existentes em maiores quantidades, principalmente na urina. O seu significado funcional, no entanto, permanece especulativa.

2.3.2. Origem

Na origem dos D-aminoácidos parecem estar essencialmente três processos (Friedman, 1999): a modificação pós-translaccional durante a biossíntese dos péptidos nos polissomas; as condições de processamento tecnológico de alimentos, essencialmente térmico; e, finalmente, a síntese *de novo*.

As técnicas de clonagem de cDNA permitiram verificar que, nas posições onde se encontra um D-AA no péptido final, existe um codão para o correspondente L-AA (Mitchell e Smith, 2003). Na realidade, não existe no código genético nenhum codão para um D-aminoácido. Tal facto permite inferir que os D-AAs deverão ser formados a partir dos L-AAs correspondentes, por uma reacção pós-translaccional envolvendo enzimas específicas (Kreil, 1997).

Os enantiómeros D não podem ser distinguidos dos L pelas técnicas usualmente praticadas na sequenciação dos AAs (Lida *et al.*, 2001). Por esta razão, ainda se conhece pouco sobre os seus verdadeiros teores nos péptidos e proteínas, e muitos dos D-AAs

identificados parecem, agora, ser apenas artefactos das técnicas utilizadas (Mitchell e Smith, 2003), decorrentes essencialmente das hidrólises realizadas. Assim, durante o isolamento e caracterização de novos péptidos, deve ser tida em conta a possibilidade da presença de D-AAs, devendo recorrer-se às mais modernas técnicas de sequenciação que permitem a sua diferenciação (Lida *et al.*, 2001, Mitchell e Smith, 2003).

Os enantiómeros dos AAs, embora aparentemente idênticos, podem exibir propriedades biológicas muito diferentes. Na realidade, os péptidos bioactivos em que um aminoácido é sinteticamente modificado da forma D para a L, ou *vice-versa*, mostram uma actividade reduzida, ou mesmo nula, comparativamente com os péptidos naturais. Aliás, foi desta forma que se descobriu a presença de D-alanina na dermorfina, um heptapéptido isolado da pele de rã, cerca de 10 vezes mais potente que a morfina na indução de analgesia. O heptapéptido sintético (com L-alanina) é virtualmente desprovido de actividade biológica (Kreil, 1997).

A isomerização dos AAs aumenta a diversidade dos péptidos que podem ser sintetizados por um gene. Consequentemente, novos elementos estruturais podem ser formados, o que nunca aconteceria com apenas L-AAs (Kreil, 1997). Para além disso as técnicas mais recentes de formulação de medicamentos utilizam já a substituição de alguns L-AAs pelos seus similares D-AAs. Esta operação conduz a um aumento da actividade e da semi-vida biológica, pois este tipo de compostos resistem mais tempo à degradação enzimática (Sela e Zisman, 1997). Assim, os D-AAs começam a ter um papel importante na preparação de análogos sintéticos de neuropéptidos, de análogos/antagonistas de hormonas peptídicas, de antibióticos, ou de vacinas sintéticas contra doenças infecciosas ou auto-imunes (Sela e Zisman, 1997, Friedman, 1999).

Os processamentos térmicos dos alimentos contribuem também para a formação destes compostos. Embora todos os aminoácidos isomerizem naturalmente com o tempo, a velocidades extremamente reduzidas, o calor provoca um acréscimo desta isomerização, principalmente em ambiente fortemente ácido ou alcalino. De todos os aminoácidos, o ácido aspártico é o que isomeriza com mais facilidade, ainda assim com uma semi-vida de isomerização de cerca de 15000 anos a 20°C. Como curiosidade, esta característica permite utilizá-lo para a determinação da idade aproximada de certos fósseis, em alternativa aos dispendiosos processos que utilizam carbono radioactivo (Abe *et al.*, 1997).

Por último, a síntese *de novo*. De facto, para além das bactérias capazes de produzir

e utilizar D-AAs (Friedman, 1999), também as plantas parecem ser capazes de os sintetizar (Brückner e Westhauser, 2003). Os caminhos biossintéticos que levam à sua formação e as suas funções nessas mesmas plantas ainda não são, no entanto, conhecidas (Friedman, 1999).

Assim se entende que, a principal origem dos D-AAs, nos mamíferos, pareça ser a dieta (alimentos fermentados e processados termicamente), embora não seja de excluir a acção de certas bactérias da flora oral e intestinal (Brückner *et al.*, 1993) e a ingestão de certos medicamentos que os contêm na sua composição (Brückner *et al.*, 1995, Susuki *et al.*, 1997).

2.3.3. Efeito biológico

Do ponto de vista nutricional, os D-AAs parecem contribuir escassamente para o valor biológico do alimento, pois as ligações peptídicas com D-AAs são mais resistentes às proteases do aparelho digestivo humano (Friedman, 1999). Dependendo da quantidade e posição desses D-AAs, podem originar xenobióticos com bioactividade desconhecida (Palla *et al.*, 1989, Brückner e Hausch, 1990). A perda da digestibilidade proteica parece ser devida à formação de ligações cruzadas e à modificação dos locais de ataque enzimático (Brückner e Hausch, 1990). Para além disso, a absorção dos enantiómeros D, a nível intestinal, é mais lenta que a dos L-AAs (Imai *et al.*, 1996) e, mesmo quando digeridos e absorvidos, a maior parte dos D-AAs derivados dos aminoácidos essenciais não parece ser utilizada pelo Homem. A reduzida utilização poderá dever-se aos baixos teores de D-aminoácido oxidases (DAAO), as enzimas que catalisam a sua desaminação oxidativa nos iminoácidos correspondentes, que posteriormente sofrem uma hidrólise não enzimática nos seus respectivos α -cetoácidos e amónia (Imai *et al.*, 1997) (Figura 2.5).

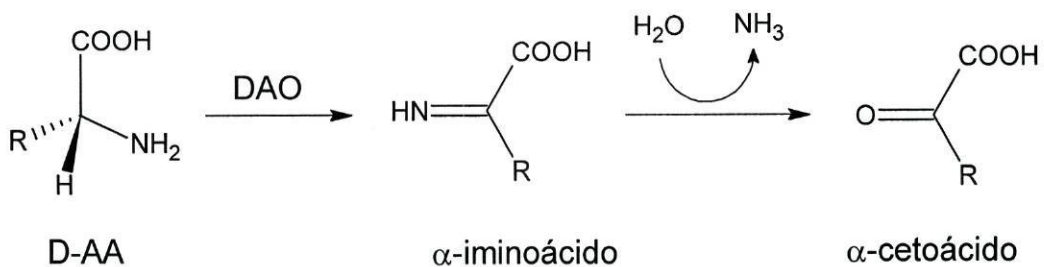


Figura 2.5. Desaminação oxidativa dos D-aminoácidos pela DAAO

Por estas razões, e segundo Brückner e Hausch (1990), quando se determina o teor de aminoácidos essenciais num alimento, deveria ter-se em consideração os D-AAs presentes e subtrair os seus teores ao total de AAs determinados.

Os possíveis efeitos tóxicos dos D-AAs têm sido investigados e intensamente discutidos no último meio século. Dependendo do modo e da quantidade administrada, em experiências com animais de laboratório, têm sido descritas muitas acções deletérias (Brückner e Hausch, 1989a). Estes estudos mostram que a ingestão destes compostos pelos humanos deveria ser questionada e, sempre que possível, ou em produtos onde há maior possibilidade de estarem presentes, os seus teores deveriam ser controlados. No entanto, estudos mais recentes não confirmam essas acções nefastas, demonstrando que os D-aminoácidos parecem ser efectivamente metabolizados e eliminados na urina sem toxicidade aparente (Ercal *et al.*, 1996, Schieber *et al.*, 1997).

Nos humanos, foi demonstrado que após administração parenteral de D-AAs, em doses muito superiores às esperadas pelo consumo de alimentos, estes são excretados, principalmente por via renal, oxidados a α -cetoácidos pela DAAO (Figura 2.5), presente principalmente no rim, fígado e cérebro (Imai *et al.*, 1996), e depois reaminados a L-AAs ou metabolizados (Brückner *et al.*, 1993). Embora inicialmente também fossem tidos como imunogénicos, mais recentemente foi demonstrado que os péptidos com D-AAs são tão imunogénicos como os contendo L-AAs (Sela e Zisman, 1997).

A presença de resíduos de D-AAs na proteína β -amilóide, em doentes com a doença de Alzheimer, como já foi referido, bem como o facto de alguns tumores conterem teores reduzidos de ácido D-aspártico e quantidades 2 a 5 vezes superiores de ácido D-glutâmico, comparativamente com tecidos de pacientes normais, embora com pouco significado estatístico (Fischer *et al.*, 1995), demonstra a importância de estudos mais completos nesta temática.

O consumo elevado de D-AAs poderá, no entanto, conduzir a uma sobrecarga do sistema da DAAO, que existe em quantidade reduzida nos humanos (Brückner *et al.*, 1995). Assim, parece legítimo inferir que os D-AAs poderão ter alguma toxicidade, em particular quando o sistema enzimático DAAO está reduzido (D'Aniello *et al.*, 1993), caso de crianças e grávidas ou de doentes renais (Fukushima *et al.*, 1995).

2.3.4. Importância dos D-AAs no controlo de qualidade

A presença de D-AAs nos alimentos pode ser devida, como já foi referido, à isomerização térmica durante o processamento, ou ser resultado de actividade

microbiológica (Marchelli *et al.*, 1996)

Do ponto de vista tecnológico, a ocorrência de D-AAs nos alimentos processados é uma indicação de tratamentos severos (Brückner e Hausch, 1990), particularmente o ácido aspártico, o aminoácido mais facilmente isomerizável. A sua determinação poderá, estão, servir como indicador de “alimento sobreprocessado”, ou ser comprovativo das condições de “boas práticas de fabrico” (Brückner *et al.*, 1989b, 1990).

Se a presença de D-AAs em alimentos fermentados é natural, já elevados teores destes, em alimentos não fermentados será, por seu lado, indicativo de contaminação microbiana.

A título de exemplo, apresentam-se, a seguir, alguns alimentos em que a quantificação dos D-aminoácidos poderá ser útil para o controlo da sua qualidade, incluindo o café:

Leite: O leite cru contém normalmente quantidades muito pequenas de D-AAs livres. No entanto, o teor destes nos primeiros jactos de leite de vacas saudáveis é cerca de cinco vezes superior ao obtido durante o decorrer da ordenha, devido à existência de uma flora normal do úbere que, naturalmente, contém microrganismos com D-AAs na sua constituição. Em situações de mastite verifica-se também um grande aumento de D-AAs no leite. Assim, o teor de D-AAs pode ser usado como indicador da inclusão de leite proveniente de vacas com mastite, diagnosticada ou subclínica, ou do leite dos primeiros jactos da ordenha que, por razões de higiene, deve ser rejeitado (Csapo *et al.*, 1995). O leite sujeito a diferentes tratamentos térmicos também contém pequenas quantidades de D-AAs e a sua percentagem não parece ser influenciada pela temperatura utilizada, devido ao pouco tempo de aquecimento praticado no processo (Palla *et al.*, 1989) (Tabela 2.2).

Gelatina animal: embora as gelatinas obtidas a partir de produtos ou subprodutos animais tenham os dias contados, o seu fabrico continua a ocorrer. Numa das primeiras fases realiza-se uma hidrólise, ácida ou alcalina, consoante a matéria-prima, a que se seguem etapas de neutralização, lavagem e extracção com água a temperaturas sucessivamente mais elevadas, desde 60°C até 90-100°C na última extracção (Brückner e Hausch, 1990, Lüpke e Brückner, 1998). Estes processos conduzem, inevitavelmente, à formação de D-AAs, embora em teores absolutos pequenos e sem implicações na qualidade nutricional do produto. No entanto, nas gelatinas provenientes das extracções a temperaturas superiores a 85°C, de menor qualidade, verifica-se um aumento drástico da isomerização do ácido aspártico. Assim, os teores de ácido D-aspártico podem ser usados como marcador químico do tratamento térmico das gelatinas e da qualidade da gelatina

utilizada na confecção de certos produtos alimentares.

Alimentos fermentados: De uma forma geral pode dizer-se que a presença de D-AAs nos alimentos fermentados é natural e superior à existente noutro tipo de alimentos, não podendo servir como indicador da sua qualidade. Os alimentos fermentados constituem uma parte importante da alimentação humana, e de entre estes, podem referir-se como mais comuns na alimentação portuguesa o queijo, o iogurte, a cerveja, o vinho e o vinagre.

A D-alanina e os ácidos D-aspártico e D-glutâmico são constituintes normais das paredes celulares de microrganismos usados nas fermentações (*Lactobacilli* e *Streptococci*) (Brückner e Hausch, 1989a), pelo que não é de estranhar que sejam esses os D-AAs mais frequentemente encontrados nos produtos fermentados (Tabela 2.2). O teor e a composição em D-AAs dos alimentos poderá ser útil para, por exemplo, determinar o processo biotecnológico utilizado na vinificação, bem como a idade de um vinho (Chaves das Neves *et al.*, 1990, 1995), o tempo de maturação de um queijo (Marchelli *et al.*, 1997), ou o tipo de culturas de arranque utilizadas num processo fermentativo (Brückner *et al.*, 1993).

A presença de D-AAs nos alimentos fermentados é, também, importante do ponto de vista das características organolépticas, pois os enantiómeros D de muitos AAs têm um sabor mais doce que os correspondentes L (Wong, 1995a). A relação entre os enantiómeros poderá, assim, contribuir para o “flavour” final dos alimentos fermentados (Brückner *et al.*, 1993).

Café: O grau de torra é um dos critérios mais utilizados na determinação do processamento do torrado e, conseqüentemente, da qualidade do produto final, como foi referido no capítulo 1.3.2. Com base no conhecimento de que o calor intenso produzido durante a torra conduz a uma formação de isómeros D dos AAs, com razões D/L que atingem 40% (Tabela 2.2), Nehring *et al.* (1992) tentaram correlacionar essa isomerização com o grau de torra. Embora seja um método demorado, permite uma determinação indirecta do grau de torra, independentemente do processo e da variedade do café utilizados.

Na Tabela 2.2 encontram-se compilados os teores de D-AA determinados em alguns alimentos. Como é facilmente observável, os alimentos que maior contribuição dão para o aporte diário de D-AAs, são os fermentados e, dentro destes, o queijo curado e o iogurte.

2.3.5. Metodologias analíticas

Os aminoácidos, independentemente de serem D ou L, carecem de propriedades químicas que os tornem fácil e selectivamente detectáveis em misturas complexas, caso dos fluidos biológicos ou dos alimentos (Dominguéz *et al.*, 1990).

No passado, a determinação dos isómeros dos AAs era difícil e morosa. Em resultado dos avanços nos métodos de separação quiral de AAs por cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida (HPLC), estão agora disponíveis métodos rápidos e precisos para a quantificação dos enantiómeros dos AAs, no estado livre ou ligado (Imai *et al.*, 1996).

Embora a forma mais usual seja utilizar fases estacionárias quirais para a sua separação, recorrendo aos métodos usuais de derivatização de aminoácidos, também é possível uma separação indirecta por GC ou HPLC após derivatização com agentes quirais. Um resumo dos métodos mais usuais encontra-se referido na pág. 130.

Tabela 2.2: Teores (%) de D-aminoácidos livres de alguns alimentos*

	ala	asx	glx	leu	fen	lis	pro	D-AA totais (mg/100g ou ml)	Referências
leite cru	3-4	2-3	2-3					0,1	Palla <i>et al.</i> , 1989, Gandolfi <i>et al.</i> , 1992, Czapo <i>et al.</i> , 1995
leite UHT	4-8	2-3	3-5						
iogurte	64-68	20-40	20-66					2,8	Brückner <i>et al.</i> , 1989c; Palla <i>et al.</i> , 1989
queijo curado	20-45	3-35	5-22	2-7	1-13	2	15	83,2	Brückner <i>et al.</i> , 1989a; Palla <i>et al.</i> , 1989
cerveja	1-13	4-36	2-16					0,6-9,6	Erbe e Brückner, 2000
vinho	1-3	2-4	0,1-3	<0,05				0,3-0,4	Brückner <i>et al.</i> , 1989a,b
vinagre vinho	11	5	6	2	1	2	10	11,6	Erbe e Brückner, 1998
vinagre cidra	22	7	5		7	3		1,7	Erbe e Brückner, 1998
café verde			<0,2						Palla <i>et al.</i> , 1989
café torrado		23-38	32-41		9-12				Palla <i>et al.</i> , 1989
café instantâneo		43	27				14	>24	Brückner e Hausch, 1989b

% = 100*D/(D+L); ala = alanina, asx = ácido aspártico + asparagina, glx = ácido glutâmico + glutamina, leu = leucina, fen = fenilalanina, lis = lisina, pro = prolina

* Retirado de Casal *et al.*, 1999.

As referidas metodologias cromatográficas requerem, antes da derivatização propriamente dita, um intenso e demorado trabalho de preparação da amostra para análise, envolvendo eliminação de interferentes, nomeadamente hidratos de carbono e lípidos. Por forma a criar alternativas de análise mais rápidas, têm vindo a ser desenvolvidos biosensores electroquímicos baseados na enzima DAAO que, não sendo específica para um determinado D-AA, poderá servir os propósitos das análises de rotina para quantificação do teor total de D-AAs num produto (Labadini, 1995). Já para a detecção específica de um determinado D-AA parece continuar a ser necessário recorrer à cromatografia.

2.4. Aminas biogénicas

2.4.1. Introdução

Segundo a definição consensualmente aceite, as aminas biogénicas correspondem a bases orgânicas de baixa massa molecular, dotadas de actividade biológica, que ocorrem naturalmente em animais superiores, plantas e microrganismos, em consequência do seu metabolismo normal. Englobam um conjunto heterogéneo de substâncias, com diferentes estruturas químicas, origens e acções biológicas.

As aminas biogénicas podem ser classificadas de acordo com o número de funções amina, estrutura química, ou processo de biossíntese. De acordo com o número de funções amina podem ser mono- (tiramina, feniletilamina), di- (histamina, serotonina, triptamina, putrescina, cadaverina), ou poliaminas (espermina, espermidina, agmatina). Com base na sua estrutura química podem ser alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina, espermidina, agmatina), aromáticas (tiramina, feniletilamina), ou heterocíclicas (histamina, serotonina, triptamina). Estas últimas podem ainda ser indolaminas (serotonina) ou imidazolaminas (histamina). Menos usualmente, e de acordo com o seu caminho biossintético, podem ainda ser classificadas naturais ou biogénicas. As naturais – espermina, espermidina, putrescina e histamina – são formadas por síntese *de novo* a partir de precursores. As aminas biogénicas são formadas por descarboxilação bacteriana de aminoácidos livres. Algumas estruturas químicas podem ser encontradas na Figura 2.6.

Largamente distribuídas na natureza, as aminas biogénicas podem actuar como substratos, intermediários, ou produtos finais de distintos processos metabólicos. Para além do seu papel como fontes de armazenamento de azoto, algumas actuam como precursores da síntese de hormonas, alcalóides, ácidos nucleicos e proteínas, desempenhando importantes papéis em várias funções fisiológicas dos seres vivos, nomeadamente regulação do crescimento celular, da temperatura corporal e da actividade cerebral (Santos, 1996). Em particular, as poliaminas desempenham papéis indispensáveis nas células vivas, estando envolvidas em praticamente todos os passos da síntese de DNA, RNA e proteínas, regulando ainda a permeabilidade e estabilidade da membrana celular (Bardócz *et al.*, 1995).

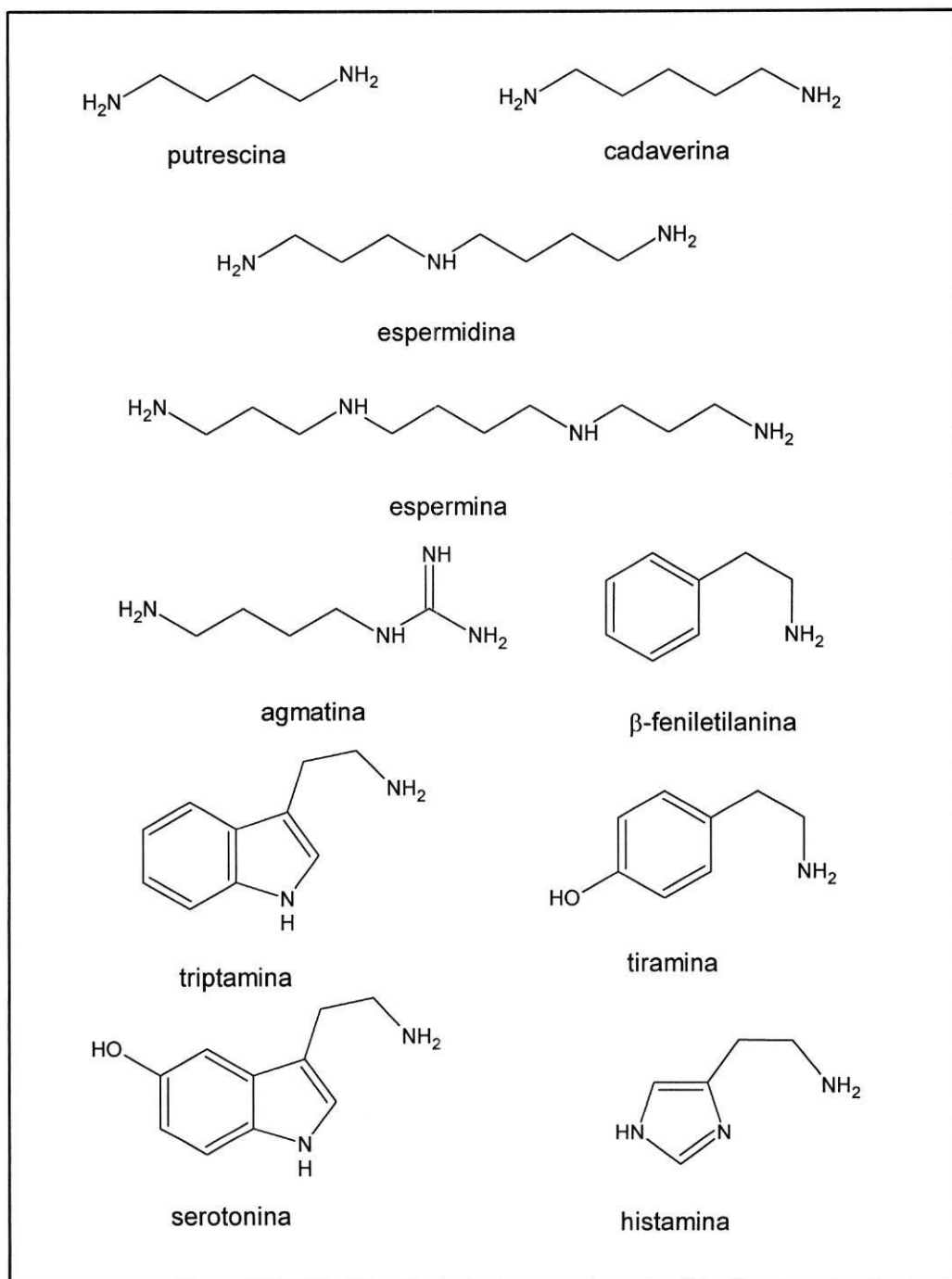


Figura 2.6 – Estrutura química de algumas aminas biogénicas.

2.4.2. Origem

As aminas biogénicas podem ser formadas nos próprios organismos, sejam eles microrganismos, plantas ou animais superiores, ou resultarem da ingestão de alimentos que as contenham.

Na verdade, estas aminas são constituintes normais de muitos alimentos, tais como frutos (banana e citrinos), alimentos fermentados (queijo, carnes, vegetais, vinho, cerveja) e,

especialmente, alimentos deteriorados (peixe, carne e queijo). O tipo e quantidade de cada amina depende, assim, da natureza e origem do produto em causa. Para além disso, os seus teores podem ser alterados com as condições de processamento, armazenamento e higiénicas. Dada a sua relativa termo-estabilidade os seus teores poderão ser indicadores de frescura, ou de contaminação, de alimentos frescos ou enlatados.

A putrescina e a espermidina podem ser consideradas ubiqüitárias nos alimentos, sejam estes de origem animal ou vegetal, podendo ser acompanhadas por outras aminas (Bardócz *et al.*, 1995). No entanto, os dados disponíveis na literaturas relativos aos seus teores incluem essencialmente peixe, queijo, carne e bebidas alcoólicas (Halász *et al.*, 1994). O conhecimento dos seus teores em alimentos de origem vegetal, incluindo o café, é muito reduzido. Este conhecimento seria, sem dúvida, importante do ponto de vista toxicológico e tecnológico.

Em qualquer caso, os pré-requisitos para a produção de aminas biogénicas nos alimentos, incluem a disponibilidade de aminoácidos precursores, a presença de microrganismos descarboxilase-positivo e condições favoráveis para o seu crescimento e actividade enzimática.

A síntese das poliaminas é um pouco mais complexa, embora os primeiros passos também incluam descarboxilações. São sintetizadas a partir dos seus precursores naturais – ornitina e/ou arginina e SAM, com a putrescina como intermediário obrigatório (Seiler, 1990). No caso das plantas e alguns microrganismos existe um caminho alternativo de formação da putrescina a partir da arginina, via agmatina (Figura 2.7). O teor celular em poliaminas é regulado por biossíntese, degradação, captação e excreção (Igarashi *et al.*, 2000).

2.4.3. Importância fisiológica nos humanos

As aminas biogénicas são usualmente vasoactivas ou psicoactivas. As aminas psicoactivas, tais como a histamina e a serotonina (5-hidroxitriptamina), actuam ao nível dos transmissores neuronais no sistema nervoso central. As aminas vasoactivas podem actuar directa, ou indirectamente, no sistema vascular. Algumas apresentam características pressoras – tiramina, triptamina e feniletilamina – causando um aumento na pressão sanguínea por constrição do sistema vascular, bem como um aumento do ritmo cardíaco e da sua força de contracção.

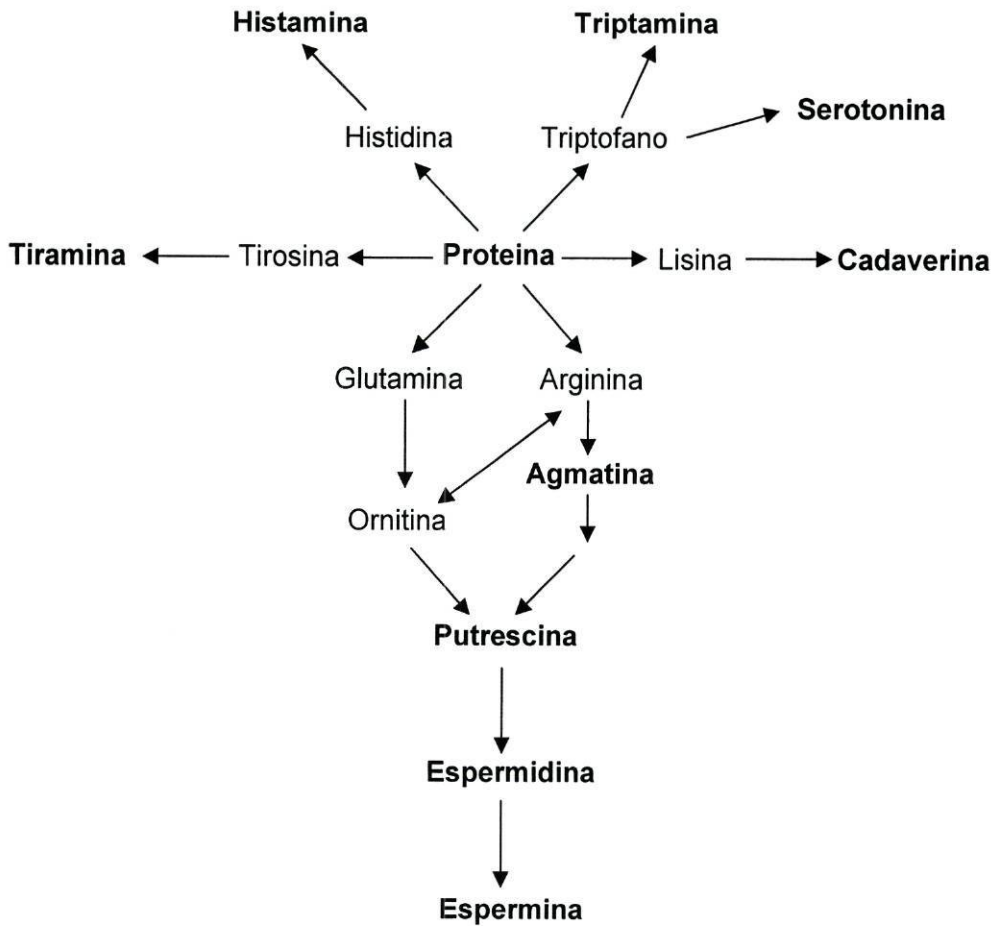


Figura 2.7 – Biossíntese de algumas aminas biogénicas (adaptado de Halász *et al.*, 1994)

Em particular, a histamina, fisiologicamente a mais importante e mais tóxica se em excesso, pode estimular directamente o coração, causar contracção ou relaxamento da musculatura lisa extravascular, estimular os neurónios motores e sensoriais e controlar a secreção gástrica. A histamina medeia ainda a sintomatologia primária e imediata associada à resposta alérgica.

A serotonina é vaso e broncoconstritora e reduz o volume e a acidez do suco gástrico. Tem efeito diurético, estimula a musculatura lisa e afecta o metabolismo dos hidratos de carbono (Glória, 2003).

A tiramina provoca um aumento da pressão sanguínea por libertação de noradrenalina e norepinefrina.

Foram identificadas para o organismo humano três fontes para as aminas bioactivas: biossíntese *in situ* a partir de aminoácidos; ingestão directa a partir da dieta; e síntese e libertação da flora bacteriana residente no tracto gastrointestinal, sendo claro que a alimentação constitui uma das principais fontes. Embora todas as células apresentem

capacidade para sintetizar poliaminas, o organismo humano tem na dieta uma importante fonte destas aminas. A necessidade em poliaminas parece variar com a idade e o estado fisiológico e patológico do indivíduo. A necessidade é superior nos mais novos, durante as fases de crescimento mais intenso (Bardócz *et al.*, 1995).

Ao pH fisiológico, as poliaminas encontram-se protonadas. A distribuição de cargas da espermina permite-lhe ligar-se fortemente a grupos fosfato, nomeadamente das cadeias da dupla hélice de DNA, estabilizando-a. O mesmo se passa para as zonas de duplas hélice de outras estruturas, como os “loops” de rRNA ou mRNA, podendo constituir a base do seu efeito no DNA, RNA e síntese proteica. Ligam-se ainda às zonas negativas dos fosfolípidos das membranas, ou outros locais aniónicos, alterando a sua estabilidade e permeabilidade (Tiburcio *et al.*, 1993).

Dada a actividade biológica que apresentam, as aminas em excesso deverão ser eliminadas. Nos indivíduos saudáveis, a destoxificação das aminas ingeridas pode ocorrer por acetilação e oxidação. As aminas biogénicas são oxidadas por mono e diaminoxidases (MAO, DAO). As poliaminas são usualmente primeiro acetiladas e posteriormente oxidadas por poliaminoxidases (PAO) (Seiler, 1990).

Os teores de aminas dos alimentos não deverão constituir perigo, excepto se forem ingeridas quantidades anormalmente elevadas, ou se os mecanismos de eliminação natural estiverem geneticamente deficientes, ou impedidos por alguma doença. Os indivíduos com problemas respiratórios, cardíacos, ou com carência em vitamina B₁₂ são particularmente sensíveis. Indivíduos com problemas gástricos também se encontram no grupo de risco, pois normalmente contêm menor actividade oxidativa intestinal. Para além disso, indivíduos sob terapia com inibidores da MAO ou DAO, como no caso do tratamento de depressões, stress, Alzheimer, Parkinson, tuberculose pulmonar, malária, etc, têm os mecanismos de destoxificação oxidativa reduzidos.

O efeito tóxico de algumas aminas pode ainda ser potenciado pela ingestão concomitante de álcool, ou de outras aminas (Glória, 2003).

Os casos mais reportados na literatura, relativamente a intoxicações alimentares por aminas, tratam mais frequentemente da histamina, a mais tóxica, sendo, inclusive, a única amina com teores máximos fixados em algumas matrizes alimentares, nomeadamente no peixe. A tiramina, existente principalmente no queijo, quando ingerida em quantidades elevadas, causa libertação de noradrenalina, conduzindo a uma variedade de reacções

fisiológicas. Nos indivíduos sob tratamento de inibidores da MAO, pode mesmo resultar numa intoxicação grave, conhecida por “reação ao queijo”. Mesmo as aminas menos activas, tais como a putrescina ou a cadaverina, podem, quando ingeridas em quantidades elevadas, conduzir a efeitos tóxicos, mas a mais importante consequência é, sem dúvida, o incremento da toxicidade das outras aminas.

A determinação da dose tóxica de cada amina é uma tarefa difícil, pois depende da eficiência dos mecanismos de destoxificação, os quais variam de indivíduo para indivíduo. Têm sido sugeridos valores da ordem dos 10 mg de histamina ou tiramina e 3 mg de feniletilamina por 100 g de alimento, bem como 2-8 mg de histamina ou tiramina por litro em bebidas (Glória, 2003).

As poliaminas desempenham, como já foi referido, papéis importantes no crescimento e metabolismo celulares. No entanto, a putrescina, espermina e espermidina também se apresentam como importantes no crescimento tumoral, sendo a inibição da sua biossíntese um dos mecanismos alvo para a terapia do cancro. Para além disso, a putrescina e a cadaverina podem ser convertidas em pirrolidina e piperidina, respectivamente, aminas estas que, juntamente com a espermidina, espermina e agmatina podem formar nitrosaminas carcinogénicas no tracto gastrointestinal por reacção com nitritos (Santos, 1996).

2.4.4. Importância fisiológica nas plantas

As poliaminas livres parecem acumular-se nas células em divisão activa, por acção da descarboxilase da ornitina (ODC), enquanto que a descarboxilase da arginina (ADC) é mais activa nas células em alongamento (Walden *et al.*, 1997).

Nas plantas, a putrescina, espermina e espermidina estão implicadas numa variedade de processos fisiológicos, tais como divisão celular, floração, desenvolvimento dos frutos, resposta ao stress e senescência. As poliaminas estimulam o crescimento e inibem a produção de etileno, modulando assim a senescência, a fase terminal do desenvolvimento (Pandey *et al.*, 2000b). Embora o modo de acção preciso das poliaminas ainda não seja conhecido, diversos estudos suportam que deverão ter importantes papéis na modulação de importantes processos desde a diferenciação celular a respostas ao stress (Pandey *et al.*, 2000b).

A putrescina apresenta-se, quantitativamente, como mais relevante, principalmente nas sementes e tecidos em rápido crescimento. Em condições de deficiência em potássio ou

magnésio e altas concentrações de amónia, ocorre acumulação de putrescina e agmatina (Smith, 1980), bem como em condições de stress osmótico, acidificação, ou alterações de temperatura (Babe, 1990). No caso de teores elevados de amónia, o problema parece surgir pela falta de mecanismos de inibição da captação de azoto pelas plantas, causando a sua acumulação e síntese preferencial de outros compostos aminados (Babe, 1990)

A serotonina, feniletilamina, triptamina e histamina também se encontram presentes nas plantas, onde parecem ter um papel protector contra predadores. Estas aminas também são, por vezes, importantes do ponto de vista taxonómico, embora a natural contaminação microbiológica possa causar o seu aumento, dificultando o processo.

Para além das formas livres também aparecem formas conjugadas de poliaminas, ou aminas aromáticas, por ligação covalente a ácidos hidroxicinâmicos (Pandey *et al.*, 2000b). A acumulação destes conjugados ocorre paralelamente ao aumento de actividade da ODC, uma das enzimas responsáveis pela síntese de poliaminas nas plantas. Embora a função destes conjugados ainda não seja conhecida, sugere-se o seu envolvimento nos mecanismos de defesa contra patogéneos e predadores (Smith 1975), nomeadamente vírus e fungos. A demonstrar esta teoria, foi recentemente encontrada similaridade entre a estrutura destes conjugados e a estrutura geral de algumas toxinas do veneno de cobras e vespas (Fixon-Owoo *et al.*, 2003). A hipótese de se tratar de formas de armazenamento também é sugerida (Pandey *et al.*, 2000b), ou de estarem implicadas no processo de floração (Kakkar e Kai, 1993). Aparentemente estes conjugados podem compreender até 90% do total de poliaminas (Walden *et al.*, 1997), parecendo ser específicos para cada espécie.

2.4.5. Metodologias analíticas

Para a determinação da histamina existem muitos métodos na literatura, nomeadamente métodos normativos dada a sua determinação obrigatória em alguns alimentos. Estas determinações baseiam-se, essencialmente, em metodologias cromatográficas, fazendo uso de reacções com reagentes fluorescentes, nomeadamente o OPA. Para a determinação simultânea de diversas aminas, as publicações são em menor número. Uma lista detalhada e bastante completa dos métodos publicados desde 1980 pode ser encontrada em Gennaro *et al.* (1996).

A extracção das aminas representa um passo crítico. Muitos procedimentos têm sido propostos, fazendo uso de diversos solventes tais como os ácidos perclórico, tricloroacético

ou clorídrico, o metanol ou outros solventes orgânicos. As metodologias mais actuais utilizam essencialmente HPLC em fase reversa, associado a detecção por UV ou fluorescência, após derivatização. Como reagentes derivatizantes mais comuns são de destacar o cloreto de dansilo (cloreto de 5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonilo), cloreto de dabsilo (cloreto de 4-dimetilaminoazobenzeno – 4-sulfonilo), OPA, fluorescamina e ninidrina (Gennaro *et al.*, 1996).

2.5. Aminas heterocíclicas aromáticas

2.5.1. Introdução

Desde sempre que os humanos estão expostos a uma larga variedade de substâncias potencialmente tóxicas, incluindo agentes mutagénicos e carcinogénicos de origem natural. As aminas heterocíclicas aromáticas (HAs) representam um desses grupos, sendo encontradas principalmente na carne e no peixe, cozinhados a elevadas temperaturas.

Estes compostos começaram a ser isolados e estudados na década de 70 (Miller, 1989, Shibamoto e Bjeldanes, 1993), encontrando-se entre as mais potentes substâncias mutagénicas testadas pelo teste de Ames (Smith *et al.*, 1992), sendo ainda classificados como carcinogéneos moderadamente activos em roedores e macacos (Ohgaki *et al.*, 1991). Com o aumento da sensibilidade das metodologias analíticas, as HAs vão sendo detectadas num crescente número de matrizes, incluindo ar e água, sabendo-se hoje que têm uma distribuição praticamente ubiqüitária (Kataoka, 1997a).

A investigação no campo das HAs tem sido exponencial, estimando-se que, nos últimos 30 anos, tenham sido publicados mais de 2000 artigos nesta área (Dashwood, 2002). A literatura contém informação numa grande variedade de tópicos, incluindo detalhes da sua química, formação, teor nos alimentos, metabolismo *in vitro* e *in vivo*, mutagenicidade, genotoxicidade, carcinogenicidade em roedores e primatas e de epidemiologia humana.

Este constante desenvolvimento faz com que não seja possível utilizar uma pequena revisão bibliográfica realizada em 2000 (Casal *et al.*, 2000a), para introduzir o tema das HAs, porque já estaria sobejamente desactualizada. Assim, optou-se por utilizar a referida revisão como base de trabalho, actualizando-a com as mais importantes referências publicadas desde então.

2.5.2. Alimentação *versus* incidência de cancro

Vários estudos epidemiológicos permitem inferir que o factor dietético é um dos mais importantes no desenvolvimento de cancro humano, estando envolvido em cerca de 35% dos mais de 10 milhões de novos casos reportados por ano (Miller, 1989). Esta incidência de cancro parece ainda estar relacionada com a região e com o estilo de vida das populações (Sugimura, 1986), incluindo-se nos erros mais frequentemente descritos o

consumo excessivo de carne vermelha e de produtos salgados e/ou ricos em gordura, bem como a ingestão deficiente de vegetais e fibra (Knize *et al.*, 1999). Simultaneamente com os erros dietéticos referidos, parece também haver uma forte evidência de que o modo de preparação da carne e do peixe, nomeadamente a drasticidade e o tipo do tratamento térmico, pode levar à formação de compostos mutagénicos iniciadores da carcinogénese (Sugimura, 1986).

O cozinhar dos alimentos visa aumentar a sua palatabilidade (“flavour”, aparência e textura), a sua estabilidade e digestibilidade, destruindo simultaneamente microrganismos tóxicos e inibidores enzimáticos. Os efeitos são de tal forma agradáveis, que esse benefício se contrapõe a qualquer outro. No entanto, o processamento culinário conduz a alterações profundas nos alimentos, levantando-se, inclusive, questões acerca da redução do seu valor nutricional e da associação possível à carcinogenicidade (Shibamoto e Bjeldanes, 1993).

De entre as práticas culinárias mais comuns, o grelhar (em placa ou directamente sobre chama), ou o fritar, em que ocorre uma acentuada perda de água, produzem compostos que se revelam mutagénicos quando avaliados pelo teste de Ames com activação metabólica, proporcional à intensidade do escurecimento que ocorre à superfície do alimento. Já a cozedura, em água ou em vapor, e a utilização de microondas, parecem não produzir efeito mutagénico relevante pelo teste de Ames com activação metabólica (Weisburger, 1991).

Os estudos epidemiológicos efectuados até final dos anos 60 eram pouco específicos, relacionando apenas a prática culinária e o grau de escurecimento que ocorre na superfície da carne com a incidência de cancro. Só nas últimas três décadas é que estes estudos passaram a associar a mutagenicidade não específica destes alimentos à presença de HAs, e a outros compostos heterocíclicos de azoto, abrindo novas perspectivas nesta problemática. Assim, hoje pensa-se que o consumo de HAs em quantidades elevadas possa estar implicado na etiologia do cancro. Por tal facto, verificar a presença de HAs em alimentos converteu-se num problema de segurança alimentar e, conseqüentemente, de saúde pública, tornando-se urgente a criação de legislação limitativa adequada e de metodologias para a sua detecção e quantificação (Chen e Chiu, 1998).

2.5.3. As aminas heterocíclicas aromáticas

As HAs são um grupo de compostos com estrutura heterocíclica de azoto, aromática e multi-anelar, com um grupo amina exterior à estrutura cíclica. Pensa-se que têm origem na

interacção térmica de açúcares com compostos nitrogenados (como aminoácidos e creatinina) durante o processamento culinário/tratamento térmico.

O isolamento e identificação deste tipo de compostos nos alimentos iniciou-se há três décadas, sendo hoje conhecidas cerca de 23 HAs. A Tabela 2.3 apresenta o seu nome químico e respectivas abreviaturas utilizadas internacionalmente. Para efeitos de simplificação, serão estas as abreviaturas utilizadas ao longo do texto. As estruturas químicas das HAs mais estudadas podem encontrar-se na pág. 199. Existem ainda outras HAs, isoladas apenas em sistemas modelo, não sendo por esse facto referidas na tabela.

Tabela 2.3 - Designações comuns das amins heterocíclicas aromáticas isoladas de alimentos^a

Classe	Nome químico	Abreviatura
Imidazoquinolinas	2-amino-3-metilimidazo[4,5- <i>f</i>]quinolina	IQ *
	2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5- <i>f</i>]quinolina	MelQ *
Imidazoquinoxalinas	2-amino-3-metilimidazo [4,5- <i>f</i>]quinoxalina	IQx
	2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxalina	MelQx *
	2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxalina	4-MelQx
	2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxalina	4,8-DiMelQx
	2-amino-3,7,8-trimetilimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxalina	7,8-DiMelQx
	2-amino-4-hidroximetil-3,8-dimetilimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxalina	4-CH ₂ OH-8-MelQx
	2-amino-1,7,9-trimetilimidazo[4,5- <i>g</i>]quinoxalina	7,9-DiMelgQx
Imidazopiridinas	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5- <i>b</i>]piridina	PhIP*
	2-amino-1-methyl-6-(4-hidroxifenil)-imidazo[4,5- <i>b</i>]piridina	4'-OH-PhIP
	2-amino-1,6-dimetilimidazo[4,5- <i>b</i>]piridina	DMIP
	2-amino-3,5,6-trimetilimidazo[4,5- <i>b</i>]piridina	1,6-TMIP
	2-amino-1,5,6-trimetilimidazo[4,5- <i>b</i>]piridina	1,5,6-TMIP
	2-amino-3,5,6-trimetilimidazo[4,5- <i>b</i>]piridina	3,5,6-TMIP
	2-amino-1,6-dimetilfuro[4,5- <i>b</i>]piridina	IFT
Piridoindol	3-amino-1,4-dimetil-5 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indol	Trp-P-1 *
	3-amino-1-metil-5 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indol	Trp-P-2 *
	2-amino-9 <i>H</i> -pirido[2,3- <i>b</i>]indol	A α C *
	2-amino-3-metil-9 <i>H</i> - pirido[2,3- <i>b</i>]indol	MeA α C *
	1-metil-9 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indol	harmane
Piridoimidazol	9 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indol	norharmane
	2-amino-5-metildipirido[1,2- α :3',2'- <i>d</i>]imidazol	Glu-P-1 *
	2-aminodipirido[1,2- α :3',2'- <i>d</i>]imidazol	Glu-P-2 *

^aadaptado de Pais e Knize, 2000 e Kataoka, 1997a; * com comprovada actividade carcinogénica em animais de experiência.

De entre os compostos testados pelo teste de Ames, as HAs encontram-se entre os mais potentes, como já foi referido, podendo a característica mutagénica ser detectada em teores inferiores ao nanograma. A título de exemplo, poderá referir-se que a MelQ apresenta uma actividade mutagénica avaliada em cerca de 700.000 revertentes/ μ g, quando

comparada com 6.000 revertentes/ μg para a aflatoxina B₁ (TA98 com activação metabólica) (Miller, 1989, Wong, 1989b).

A harmane e a norharmane são dois co-mutagêneos que não apresentam, isoladamente, actividade mutagénica no teste de Ames com as estirpes TA98 e TA100. No entanto, verificou-se que a primeira aumenta os efeitos mutagénicos da Trp-P-1 e 2, pelo que a sua presença nos alimentos não deve ser negligenciada (Skog *et al.*, 1997).

Uma estirpe de *S. typhimurium* mais recente, a YG1024, com actividade aciltransferásica, mostrou ser 10 a 20 vezes mais sensível aos efeitos genotóxicos das HAs IQ, MeIQ e MeIQx, que a estirpe normalmente utilizada (TA98), parecendo fornecer resultados mais próximos da realidade nos animais (Steinhart *et al.*, 1996).

2.5.4. Metabolismo e toxicidade das HAs

A detecção de actividade mutagénica na urina de voluntários, após ingestão de carne de porco frita (Baker *et al.*, 1982), constituiu a primeira observação de que os mutagêneos induzidos termicamente eram absorvidos e excretados pelos humanos. Em estudos realizados em roedores, observou-se que a absorção das HAs ocorre no intestino, seguindo-se a distribuição e a metabolização nos microsomas hepáticos, com posterior excreção, predominantemente biliar (Inamasu *et al.*, 1989). Na realidade, os mutagêneos induzidos termicamente parecem tratar-se de mutagêneos indirectos, ou pró-mutagêneos, requerendo biotransformação até um forma final activa, hidroxilada (Miller, 1989), sendo o fígado o órgão descrito como mais interventivo nesta activação (Turesky, 1990).

As HAs são metabolizadas por enzimas de fase I e II. A *N*-hidroxilação do grupo amina exocíclico, catalisada pelo citocromo P450 1A2 (CYP1A2), é a principal via de metabolização das HAs. Os metabolitos na forma de *N*-hidroxilaminas são acilados por enzimas citosólicas, para produzirem o que se pensa ser a espécie mutagénica última. Esta forma tem capacidade de ligação à guanidina, originando emparelhamentos defeituosos, ou alterações estruturais, que afectarão posteriormente a replicação e a transcrição dos ácidos nucleicos (Schut e Snyderwine, 1999). Em contraste com o fígado, o cólon parece desempenhar um papel menor na activação inicial das HAs via *N*-hidroxilação, uma vez que a principal enzima catalisadora da reacção está presente em níveis reduzidos. No entanto, sabe-se que outras enzimas, incluindo a β -glucoronidase, a sulfotransferase e a acetiltransferase, contribuem para a metabolização da IQ nos tecidos extrahepáticos (Turesky, 1990).

O mecanismo de destoxificação parece envolver a CYP1A1 que, por N-hidroxilação e O-hidroxilação do anel, em várias posições química e biologicamente possíveis, facilita as reacções de conjugação de fase II, nomeadamente com ácido glucurónico, e posterior eliminação dos metabolitos na urina e fezes (Yu *et al.*, 2001).

As HAs têm sido alvo de intensa investigação no que concerne à avaliação da sua carcinogenicidade, especialmente em ratos e ratinhos, tendo-se observado actividade carcinogénica em vários órgãos após ingestão oral. Em particular, a IQ, a MeIQ e a MeIQx, promovem o desenvolvimento de tumores no fígado de ratinhos, embora também possam desenvolver-se nos pulmões, estômago e outros órgãos. Os ratos, quando sujeitos a tratamento semelhante, desenvolvem tumores principalmente no intestino, pele, fígado e pulmão (Ohgaki *et al.*, 1991).

A dose tóxica média das HAs (TD₅₀) no ratinho ronda os 8mg/kg/dia (Sugimura, 1986). De entre as várias HAs, a PhIP parece ser a menos tóxica, com uma TD₅₀ de 31,3mg/kg/dia, enquanto que a maior carcinogenicidade foi observada com a MeIQ, com uma TD₅₀ de 0,1-8,4mg/kg/dia (Sugimura, 1990). Para os ratos, a TD₅₀ média situa-se entre 0,1-7,5 mg/kg/dia. Foi ainda verificado que nestes roedores o fígado é o órgão mais vulnerável na indução da carcinogenicidade (Chen e Chiu, 1998).

Embora em alguns estudos *in vitro* e em animais de experiência muitas aminas heterocíclicas se mostrem potentes mutagêneos e carcinogêneos, o seu potencial efeito adverso no homem permanece duvidoso (Steineck *et al.*, 1993).

Os bioensaios de carcinogenicidade utilizam frequentemente doses de HAs muito superiores aos ingeridos na dieta. Os dados disponíveis sobre a ingestão destes compostos oscilam entre menos de 1 e 50 µg/dia (Knize *et al.*, 1995, Chen e Chiu, 1998, Augustsson *et al.*, 1999a, Zimmerli *et al.*, 2001, Keating, 2001, Skog, 2002a). Mesmo sendo valores com uma grande gama de variação, trata-se de quantidades muito pequenas comparativamente com as TD₅₀ determinadas em roedores (correspondem a cerca de 0,002%). O nível de variação pode ser explicado por diferenças nas metodologias analíticas aplicadas, no protocolo dos estudos, nos hábitos alimentares e de culinária. Para além disso, o metabolismo destes compostos varia frequentemente nas diferentes espécies animais, para além de variar também nos humanos, de acordo com os seus polimorfismos genéticos (Ishibe *et al.*, 2002). Por tudo isto, a extrapolação das observações nos animais para o homem é questionável, sendo aconselhável o seu estudo epidemiológico mais aprofundado.

Os estudos epidemiológicos mais recentes têm sido baseados essencialmente em inquéritos alimentares, considerando o tipo de alimentos ingeridos e a preferência pelo escurecimento superficial. Os teores reais de HAs ingeridos são calculados após análise química das dietas mais comuns nas populações em estudo.

Num estudo europeu bastante alargado, envolvendo 10 países, infelizmente sem a participação de Portugal, foram avaliadas as diferenças nos teores de carne e peixe ingeridos, bem como os métodos culinários mais comuns (Rohrmann, 2002). Enquanto que o grelhar parece ser mais usual no norte da Europa, os assados e salteados são mais comuns no sul. Foi avaliado o consumo médio de carne e peixe grelhado, frito ou em churrasco, variando desde 12g/dia no norte de Espanha até 91g/dia no sul do mesmo país, demonstrando uma grande variação de consumo que, obrigatoriamente, deverá ser tida em conta nos estudos epidemiológicos. Já o consumo de carne vermelha, essencialmente frita, embora também muito elevado naquele país, foi igualado ou mesmo ultrapassado pela Dinamarca e Holanda, quando comparado com outros tipos de carne e peixe.

Um estudo epidemiológico sueco (Augustsson, 1999a,b) permitiu concluir que as HAs nas doses ingeridas pela população de Estocolmo, em média 2 ng/kg/dia, não parece ser a causa etiológica provável para os tipos de cancro avaliados. Apenas nos casos com ingestão superior a 1900 ng/dia se verificou poder existir alguma correlação HAs *versus* cancro. Não puderam ser retiradas conclusões precisas porque o universo em estudo era constituído por um reduzido número de pessoas nessa situação. Num estudo suíço (Zimmerli *et al.*, 2001), a exposição média foi avaliada em 5 ng/kg/dia, também com associações pouco significativas com cancro. Na população americana foram encontrados teores médios de 7,0 ng/kg/dia (Keating *et al.*, 2001).

A falta de relação entre a ingestão de HAs e certos tipos de cancro vem confirmar a ideia generalizada de que o cancro humano não deverá ser atribuído a apenas um composto. No entanto, tendo em conta alguns estudos americanos, baseados em inquéritos alimentares detalhados, parece haver bastantes evidências acerca do envolvimento da PhIP, MeIQx e 4,8-DiMeIQx na etiologia do cancro humano (Sinha *et al.*, 1999), nomeadamente a PhIP no cancro da mama (Sinha *et al.*, 2000a), a MeIQx no cancro do pulmão e do cólon (Sinha *et al.*, 2000b, Ishibe *et al.*, 2002) e a 4,8-DiMeIQx no cancro do cólon (Sinha *et al.*, 2001, Butler *et al.*, 2003).

Embora os teores de HAs constituam um bom marcador da exposição recente a estes compostos, são necessários biomarcadores que reflectam a exposição a longo prazo, provavelmente o parâmetro mais importante em relação ao cancro. Nesta área, existem já

trabalhos em marcadores urinários, onde é possível determinar o composto não alterado e seus metabolitos, embora traduzam apenas a exposição recente (Reistad *et al.*, 1997, Frandsen *et al.*, 2002). A determinação dos aductos proteicos no sangue parece reflectir até um mês de exposição e o os teores no cabelo reflecte mais tempo (Alexander *et al.*, 2002).

A Tabela 2.4 inscreve os teores de HAs encontrados em vários alimentos, agrupados de acordo com a sua origem, englobando diferentes métodos culinários efectuados com diferentes drasticidades.

Tabela 2.4 - Teores de HAs encontrados em alguns alimentos (ng/g)*

Alimento	IQ	MeIQ	MeIQx	DiMeIQx	PhIP	Trp-P-1	Trp-P-2	H	NH	A α C	MeA α C
Porco	nd-3,7	nd-1,2	nd-4,8	nd-2,2	nd-12,4	nd-5,3	nd-7,4	nd-6,0	nd-200	nd	nd-3,2
Bacon	nd-0,1		nd-27	nd-9,3	nd-36			nd-5,5	nd-40,2		
Salsicha	0,05-0,2		nd-5,4	nd-3,9	nd-5,8			nd-2,53	nd-10,6		
Vaca	nd-1,9	nd-0,3	nd-12,3	nd-3,9	nd-48,5	nd-5,0	nd-6,4	0,04-200	nd-100	nd-95	nd-1,6
Hamburguer	nd		nd-8,2	nd-1,0	nd-32			nd-7,0	nd-12,0	nd	
Frango	nd-0,5	nd-1,2	nd-10,4	nd-3,1	nd-480	nd-3,7	nd-5,1	nd-9,6	nd-12,9	nd-0,2	nd-6,8
Extractos de carne	0,2-40	0,2	1,0	1,4	0,4-10	0,4-13	0,8-14	0,08-135	0,1-61	0,3-2	0,4
Peixe	nd-1,7		nd-6,44	nd-0,1	nd-73	nd-13	nd-13	21-130	2-184	nd-109	

*Compilado de Abdulkarim e Smith, 1998; Chiu *et al.*, 1998; Galceran *et al.*, 1996; Gross *et al.*, 1990, 1992; Keating *et al.*, 2000; Knize *et al.*, 1994, 1995a, 1997ab, 1998; Murdovic *et al.*, 1997; Pais *et al.*, 1997ab; Sinha *et al.*, 1998; Skog *et al.*, 1995, 1997, 1998a, 2002b; Solyakov *et al.*, 1999, 2002; Totsuka *et al.*, 1999; Turesky, 1988. nd = não detectado; H = harmane; NH = norharmane

2.5.5. Formação de HAs e medidas preventivas

Reconhece-se que a formação das HAs é influenciada por vários factores:

- i) tipo de alimento,
- ii) método de preparação,
- iii) temperatura atingida,
- iv) duração do processamento.

Em alimentos com elevado teor proteico (carne e peixe) são vários os métodos de processamento culinário que conduzem à formação de HAs, nomeadamente: fritura, assadura, fumagem e grelhamento. Sendo a temperatura atingida pelo alimento um dos factores mais importantes na formação das HAs (Skog *et al.* 1997, Chiu *et al.*, 1998), facilmente se compreenderá que um produto grelhado em placa, que se encontra

directamente em contacto com a superfície quente, origina maior quantidade de HAs, do que o mesmo produto assado, mesmo que seja utilizada igual temperatura. A cozedura, a vapor ou em água, ocorre a temperaturas de cerca de 100°C, originando quantidades negligenciáveis destes compostos.

A quantidade total de HAs detectada em carne cozinhada a 200°C é, em geral, pelo menos o dobro da detectada a 175°C. Para 225°C, uma temperatura alta, mas não extrema, o teor total aumenta drasticamente, principalmente no resíduo que fica no recipiente onde o alimento foi cozinhado (Skog *et al.*, 1997). Para além disso, a transferência directa de calor entre a fonte térmica e a superfície da carne, parece ser um dos factores preponderantes no teor de mutagénicos produzidos nas carnes fritas. A gordura, embora não pareça ser um intervenor directo na formação dos mutagénicos, está certamente envolvida na transferência efectiva desse calor, requerendo-se, assim, menor temperatura ou tempo de processamento (Chen e Chiu, 1998).

Para prevenir ou reduzir a formação térmica de HAs, nos alimentos são usualmente descritas cinco tipos de estratégias (Miller, 1989):

- i) destruição dos precursores,
- ii) diminuição da formação dos promutagénicos,
- iii) ligação ou degradação dos promutagénicos,
- iv) prevenção da bioactivação no mutagénico final activo ,
- v) bloqueio das interacções mutagénico-DNA.

A adição de creatinase (Gross, 1990), bem como um pré-tratamento com microondas (Felton *et al.*, 1994) reduz os teores de precursores das HAs, conduzindo a uma acentuada diminuição na formação destas.

A diminuição da formação de promutagénicos tem sido a vertente mais explorada. A diminuição da temperatura de processamento para valores inferiores a 200°C, principalmente pelo uso de práticas culinárias que reduzam a temperatura superficial do alimento, bem como a redução do tempo do processamento, sem pôr em causa, obviamente, a destruição dos microrganismos patogénicos, parecem ser as estratégias mais directas (Knize *et al.*, 1994). Uma forma de diminuir a temperatura na superfície do alimento consiste na sua trituração e mistura com proteínas de soja, ou outros componentes que retenham água (Steinhart *et al.*, 1996).

Foi já testada a adição de numerosos compostos à carne antes do seu aquecimento. Citam-se, entre eles, L-triptofano, L-prolina (Weisburger, 1991) e antioxidantes, tais como

ácido ascórbico, tocoferóis, TBHQ (Chen e Chiu, 1998), BHA (Weisburger, 1991), ou licopeno (Weisburger *et al.*, 1998), tendo conduzido a resultados pouco consistentes. A simples adição de NaCl, ao aumentar a capacidade de retenção de água do produto, conduz a uma menor formação de HAs (Persson *et al.*, 2003).

Diversos alimentos têm sido testados por ensaios *in vitro* (teste de Ames e linhas celulares) e em animais de experiência, visando avaliar a capacidade de diminuir a mutagenicidade /carcinogenicidade da HAs. A Tabela 2.5 apresenta alguns exemplos.

Tabela 2.5 - Alguns alimentos potencialmente protectores

Alimento	Explicação provável	Referências bibliográficas
chá verde e preto	antioxidantes naturais (polifenóis e clorofilas)	Dashwood <i>et al.</i> , 1999; Embola <i>et al.</i> , 2001; Edenharder <i>et al.</i> , 2002.
vinho tinto e uvas	antioxidantes naturais (polifenóis)	Edenharder <i>et al.</i> , 2002
frutos silvestres, kiwi, salsa	antioxidantes naturais (polifenóis)	Edenharder <i>et al.</i> , 2002
bróculos, couves de Bruxelas	antioxidantes naturais indol-(3-carbinol)	Xu <i>et al.</i> , 1997, Murray <i>et al.</i> , 2001
tomate	antioxidantes naturais (licopeno)	Weisburger <i>et al.</i> , 1998
azeite virgem	maior teor em antioxidantes naturais os óleos refinados	Monti <i>et al.</i> , 2001; Persson <i>et al.</i> , 2003
derivados da soja	antioxidantes naturais	Weisburger <i>et al.</i> , 1998
ác. gordos w-3	inibem formação de aductos de DNA	Josyula <i>et al.</i> , 1999
ác. gordos conjugados (CLA)	inibem activação das HAs	Liew <i>et al.</i> , 1995
leite fermentado	protecção do cólon	Tavan <i>et al.</i> , 2002
trigo integral	fibra adsorbe as HAs	Yu <i>et al.</i> , 2001

2.5.7. HAs versus café

Dada a elevada popularidade desta bebida, numerosos estudos têm sido conduzidos no sentido de avaliar a sua segurança. No entanto, a significância dos efeitos anti- e pro-mutagénicos do café no risco/benefício para a saúde humana, permanece incógnita (WHO/IARC, 1991, Nehlig e Debry, 1994, 1996, Turesky *et al.*, 2003). A associação a diversos tipos de cancro humano demonstra correlações muito fracas ou mesmo nulas (IARC, 1991), havendo até dados epidemiológicos mostrando que o café pode exercer efeitos quimioprotectores contra o cancro colo-rectal (Turesky *et al.*, 2003). Na verdade, e dada a riqueza em compostos fenólicos que caracteriza o chá e o café, estas bebidas também têm sido avaliadas na perspectiva de serem meios de protecção contra as espécies

reactivas de oxigénio e subsequente dano oxidativo que pode conduzir ao desenvolvimento de doenças, incluindo o cancro (Turesky *et al.*, 2003).

A cafeína parece induzir a expressão do citocromo CYP1A2, em animais de experiência, levantando receios no sentido de poder ter efeitos co-carcinogénicos com químicos que são activados pela CYP1A2, como as HAs. Por outro lado, a cafeína também parece prevenir os efeitos mutagénicos das HAs em concentrações inferiores a 5 µg/ml, em linhas celulares humanas em cultura (Sanyal *et al.*, 1997, Weisburger *et al.*, 1998).

No entanto, o café também apresenta efeitos fortemente antioxidantes e quimioprotectores, *in vitro* e em animais de experiência (Nehlig e Debry, 1994b, Stadler *et al.*, 1994, Abraham, 1996, Daglia *et al.*, 2000), ou mesmo inibição da genotoxicidade de variados compostos (Abraham, 1996, Stadler *et al.*, 1994, Yamaguchi e Iki, 1996), incluindo a HAs PhiP (Turesky *et al.*, 2003).

Na realidade, o café é sujeito a um tratamento térmico drástico durante a torra, sendo possível a formação de HAs. Embora os estudos de Kikugawa *et al.* (1989) descrevam a provável presença de MeIQ, estes dados não foram confirmados por Gross e Wolleb (1991). Certo é que a actividade mutagénica positiva da bebida no teste de Ames/*Salmonella* (Albertini *et al.*, 1985, Nagao *et al.*, 1986, Aeschbacher *et al.* 1989, Johansson *et al.*, 1995) sugere que deverão estar envolvidas aminas aromáticas e/ou compostos nitrosados (Johansson *et al.*, 1995). Para além de poderem estar ausentes os precursores das HAs, como a creatinina, como avançado por Gross (1990), as metodologias analíticas têm vindo a desenvolver-se muito nos últimos anos. Desta forma justifica-se a confirmação destes resultados.

2.5.6. Metodologias analíticas

Muito antes da estrutura química das HAs estar definida, o teste de Ames permitiu detectar a acção mutagénica dos alimentos cozinhados (Miller, 1989). Assim, os primeiros trabalhos de isolamento destes compostos foram realizados por cromatografia preparativa, seguida de análise da actividade mutagénica, pelo teste de Ames, das fracções recolhidas. Este método é útil para a caracterização de amostras contendo mutagénicos desconhecidos, ou quando não estão disponíveis padrões químicos. Contudo, é muito trabalhoso e a quantificação é limitada, já que envolve um grande manuseamento das amostras. Foi este trabalho cromatográfico intenso que permitiu, no entanto, isolar e identificar estruturalmente os primeiros compostos mutagénicos dos alimentos cozinhados.

Actualmente, conhecidos já muitos desses compostos, a tarefa que se impõe é a sua correcta quantificação, por forma a calcular os níveis de exposição do ser humano e encontrar estratégias de preparação dos alimentos, que reduzam a formação destes compostos (Knize *et al.*, 1992). Existem diversos factores que dificultam a análise destes compostos nos alimentos, nomeadamente os baixos teores em que estão presentes (ng/g) e a complexidade da matriz. É necessário um trabalho prévio de extracção, de eliminação de interferentes e de concentração dos compostos. Para o doseamento, exigem-se técnicas cromatográficas sensíveis com detectores selectivos.

O método publicado em 1990 por Gross veio revolucionar a metodologia de extracção das HAs. Anteriormente utilizavam-se métodos baseados em precipitações proteicas, filtrações e evaporações, naturalmente morosos, pouco eficientes na eliminação de interferentes e com perdas parciais elevadas. Na sequência desse primeiro trabalho, Gross e Grüter (1992) desenvolveram um método mais preciso e reprodutível para a extracção das HAs de produtos contendo carne, método este que tem servido de referência, desde então. O fundamento deste processo consiste na aplicação sequencial de várias colunas de extracção em fase sólida, com diferentes selectividades, que reduzem as substâncias interferentes da matriz, permitindo baixos limites de detecção. Contudo, estes passos múltiplos de purificação são ainda inevitáveis fontes de erro, conduzindo a recuperações por vezes baixas (44-85% para o peixe e 33-84% para a carne).

Este método tem vindo a ser tentativamente melhorado por vários autores, em diferentes matrizes alimentares. Galceran *et al.* (1996) realizaram um trabalho exaustivo com vista a melhorar as fases em que ocorria a perda das HAs. Para além de uma melhor recuperação, conseguiram extrair os compostos imidazopiridínicos (PhIP e Glu-P-1), o que até então não tinha sido possível.

Para a análise de extractos de carne processados utilizados para tempero, Perfetti (1996) adaptou o método anterior e introduziu um passo de extracção em fase sólida com uma coluna fortemente catiónica. Desta forma, reduziu drasticamente os níveis de compostos interferentes, característicos desta matriz, e melhorou a recuperação da PhIP para 80-90%. Na sequência deste trabalho, Solyakov *et al.* (1999) utilizaram um passo adicional, como Perfetti, mas com uma coluna catiónica mais fraca (carboxipropil), obtendo melhores recuperações.

Num estudo de comparação entre os métodos desenvolvidos até à data, Toribio *et al.* (1999) verificaram que com o método original de Gross e Grüter (1992) se obtinham, na

generalidade, melhores resultados. Embora o método de Perfetti (1996) fosse o mais eficiente para as aminas polares, apresentou uma baixa recuperação das aminas apolares e perda total de algumas delas. A recuperação obtida com os diferentes métodos depende, em grande parte, da complexidade da matriz em estudo, pelo que é difícil estabelecer métodos gerais para a extração das HAs. Em geral, é necessário encontrar um compromisso entre recuperação e eficiência na remoção dos interferentes. Assim, o método de Gross e Grüter (1992) parece ser o mais adequado para a análise simultânea das aminas polares e apolares e o método de Toribio *et al.* (1999) melhor para a triagem de amostras desconhecidas. Amostras complexas como os extractos de carne requerem sempre passos adicionais de purificação (Perfetti, 1996).

As dificuldades referidas, tais como, melhorar a reprodutibilidade e eficiência dos métodos de pré-concentração disponíveis, estão ainda longe de resolução, sendo necessário um grande investimento nesta área de conhecimento.

A cromatografia líquida (HPLC) é uma das técnicas mais utilizada na análise das HAs. Todas as HAs têm espectros de UV característicos e elevados coeficientes de extinção, sendo ainda electroquimicamente oxidáveis (Kataoka, 1997a). Para além disso, muitas exibem também fluorescência (Knize *et al.*, 1992). Desta forma, a associação de HPLC a sistemas de detecção de UV/díodos, de fluorescência e electroquímicos, torna-se bastante útil.

Neste tipo de análise, em que se trabalha com concentrações muito reduzidas, a confirmação dos picos é crucial, dado que pode ocorrer co-extração e/ou co-eluição de outros compostos. O instrumento mais acessível, que permite a identificação durante a separação cromatográfica, é o detector de díodos (DAD). A maioria dos instrumentos permite analisar os espectros em concentrações da ordem de 0,1 ng. Estes sistemas de detecção previnem a falsa identificação de picos, tornando-se essenciais para evitar a interpretação de resultados falsamente positivos (Pais *et al.*, 1998). A estrutura aromática estável destes compostos origina uma fragmentação reduzida, pelo que a espectrometria de massa também é um bom método de detecção e confirmação, hoje já mais facilmente associado à HPLC (Barceló-Barrachina *et al.*, 2004) e largamente utilizado para estes compostos.

A cromatografia gasosa (GC) é outro tipo de técnica utilizada na análise de aminas. A maior parte das aminas heterocíclicas são polares e pouco voláteis, pelo que tendem a ser adsorvidas no injector e na coluna, não podendo ser detectadas em concentrações

baixas sem derivatização. Esta, para além de reduzir a polaridade, aumenta a volatilidade, a selectividade, a sensibilidade e a separação destas aminas para a técnica de GC (Kataoka, 1997b). Os processos de derivatização mais usuais encontram-se descritos na pág. 194. Tal como já foi referido para a cromatografia líquida, a baixa fragmentação originada pela estrutura aromática destas aminas, torna a espectrometria de massa um bom método de detecção, também para GC.

Quando comparada com HPLC, a electroforese capilar de zona (CZE) pode apresentar uma melhor eficiência de separação, além de um uso reduzido de solventes orgânicos, tornando-a menos nefasta para o ambiente. A CZE, acoplada à detecção de massa, fornece resultados muito satisfatórios, podendo ser considerada uma alternativa à HPLC com o mesmo tipo de detecção, embora apresente menor sensibilidade e estabilidade (Zhao *et al.*, 1998).

Uma excelente revisão sobre os métodos cromatográficos utilizados na análise das HAs foi publicada recentemente por Pais *et al.* (2000).

2.6. 4-Metilimidazol

2.6.1. Introdução

O 4-metilimidazol, ou 4-metil-1*H*-imidazol é um pequeno composto heterocíclico contendo azoto, facilmente solúvel em água. Apresenta dois tautómeros, cujas estruturas químicas se apresentam na Figura 2.8, sendo o primeiro tautómero o mais estável (Worth, 1989). Assim, a designação mais correcta para este composto será 4-(5-)metilimidazol, embora seja mais usual designá-lo apenas por 4-metilimidazol, ou abreviadamente 4-MI.

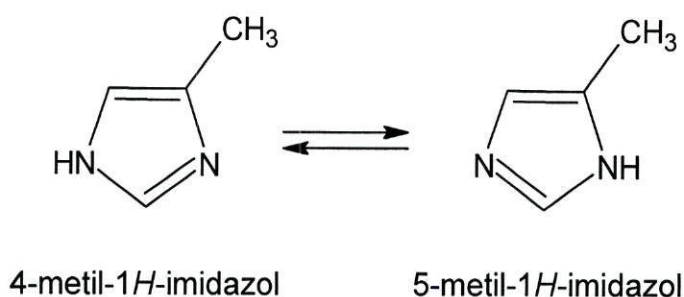


Figura 2.8 – Tautomerismo do 4-metilimidazol.

Este composto apresenta uma larga variedade de aplicações, em diversas áreas. Na indústria farmacêutica, apresenta-se como um importante material de partida na síntese de várias fármacos, nomeadamente agentes antifúngicos de largo espectro e anti-ulcerosos (Yuan e Burka, 1995). É usado ainda na produção de químicos para fotografia, tintas, pigmentos, entre outros.

O 4-MI também foi já reportado como constituinte de diversos produtos, tais como o corante caramelo e produtos que o contenham, molho de soja, silagens amonizadas ou fumo de tabaco. O 4-MI forma-se por interação da amónia com açúcares redutores, conforme provado em sistemas modelo (Karangwa, 1990). Um dos mecanismos prováveis compreende a degradação alcalina da glucose a gliceraldeído e dihidroxicetona, seguida de degradação do segundo em piruvaldeído. Por condensação do piruvaldeído, formaldeído e amónia forma-se o 4-MI (Carnevale, 1975). No caso do fumo do tabaco, o mecanismo de termólise poderá ser diferente, como será apresentado posteriormente (Moree-Teste *et al.*, 1984).

O interesse neste composto advém principalmente da sua neurotoxicidade. Trata-se de um composto com actividade a nível do SNC, capaz de provocar convulsões e apoplexia

em diversos animais, tendo sido durante muitos anos associado ao fenómeno frequentemente designado por “histeria bovina”, decorrente da ingestão de forragem amonizada. A sintomatologia aguda inclui hipersalivação, diarreia, fasciculação muscular, tremores, hiperexcitabilidade, convulsões e coma (Müller *et al.*, 1995).

Assim, dado o seu uso alargado e falta de informação relativamente à sua toxicidade e carcinogenicidade, numerosos estudos têm sido conduzidos no sentido de apurar a sua segurança nos humanos, bem como a sua implicação na neurotoxicidade, resultante da ingestão da forragem tratada com amónia, como será descrito com mais pormenor a seguir.

Num estudo com diversos produtos utilizados no fabrico de cerveja, Buckee e Bailey (1978) analisaram cevada torrada, tendo encontrado quantidades vestigiais de 4-MI numa amostra (num teor inferior a 1 mg/kg). Esta descoberta poderá levantar a hipótese da presença de 4-MI, também, no café torrado. Além disso, o 4-MI é um dos imidazóis maioritários no fumo do tabaco, conforme reportado por Moree-Testa *et al.* (1984). Este facto constitui mais um factor a validade da hipótese, já que os mesmos percursores alegados pelos autores, o glioxal e o metilglioxal, se encontram presentes também no café (WHO/IARC, 1991).

A questão levanta-se ainda com maior significado no caso dos cafés torrefactos referidos no capítulo 1, que são torrados na presença de açúcar, ficando no final cobertos de uma camada lustrosa de caramelo.

2.6.2. Ingestão pelos humanos

Para os humanos, a maior fonte de ingestão deste composto parece ser o corante caramelo amoniaco. Este corante corresponde a 90%, em peso, de todos os corantes utilizados em alimentos, sólidos ou bebidas, com um consumo mundial de cerca de 200.000 toneladas por ano, sendo mais de metade destinado ao sector das bebidas (Royle *et al.*, 1998).

O corante caramelo é fabricado recorrendo ao aquecimento controlado de um ou vários hidratos de carbono, na presença de ácidos, bases ou sais (Tomasik, 2003). De acordo com a forma como são produzidos, com a sua composição, propriedades funcionais e aplicações, os corantes caramelo comerciais podem ser divididos em 4 classes. Na Tabela 2.6 apresentam-se as nomenclaturas utilizadas internacionalmente, segundo a Associação Internacional de Técnicos de Caramelo (ITCA), bem como de acordo com o sistema internacional de numeração dos aditivos alimentares (INS).

Tabela 2.6. Classificação do corante caramelo

	ITCA	INS
Classe I	corante caramelo simples	E150a
Classe II	corante caramelo sulfito-cáustico	E150b
Classe III	corante caramelo amoniacal	E150c
Classe IV	corante caramelo sulfito-amónia	E150d

Durante o processo de obtenção dos caramelos das classes III e IV forma-se, entre outros compostos, 4-MI por reacção da amónia com os açúcares, constituindo um problema que tem ocupado diversas entidades, nomeadamente a OMS. A classe III é utilizada essencialmente em cervejas, molhos de carne, misturas e temperos e a classe IV em bebidas não alcoólicas, tais como as colas. Esta última classe compreende 70% da produção mundial (Royle *et al.*, 1998).

Com base em diversos estudos que têm vindo a ser realizados há mais de 3 décadas, a OMS estabeleceu como teor máximo admitido de 4-MI de 300 mg/kg para a classe III e 1000mg/kg para a classe IV, embora, numa base equivalente de cor de 20.000 unidades EBC (European Brewery Convention), esses valores sejam apenas de 200 e 250 mg/kg respectivamente, mantendo-se este limite até aos nossos dias (WHO, 1997). A WHO estabeleceu ainda a dose diária admissível para cada tipo de corante caramelo, sendo esta ilimitada para a classe I e inferior a 200 mg/kg de peso corporal para as restantes três classes.

O 4-MI e o imidazol são também abundantes no fumo de tabaco, conforme reportado por Moree-Testa *et al.* (1984), não devendo ser negligenciada esta provável fonte adicional de absorção. Dois mecanismos foram propostos pelos autores para a sua formação durante a pirólise no tabaco: degradação térmica da histidina e síntese a partir de compostos como glicoxal, metilglicoxal e diacetilo que reagem com amónia e com um aldeído, para originar diversos imidazóis. A presença de amónia no tabaco advém, provavelmente, de uma prática tecnológica com mais de 15 anos, cuja intenção é elevar o pH do tabaco para que a nicotina libertada para a fase gasosa esteja mais disponível. Esta prática tem sido acusada de aumentar a dependência no composto, embora também seja alegado que, ao aumentar a absorção de nicotina, poderá aumentar a sensação de satisfação, levando a um menor consumo (WHO, 2000).

2.6.3. Ingestão pelos ruminantes

Desde a década de 50 que tem vindo a ser cada vez mais frequente a amonização de silagens, principalmente das mais fracas, com vista a aumentar as suas características nutritivas. Neste procedimento, as silagens são colocadas em contacto com amoníaco, numa ambiente hermético, durante um período de 1 a 4 semanas. Assim, a respiração e a proteólise da forragem são inibidas, o que acarreta uma conservação da fracção nitrogenada proteica, para além de levar a um aumento directo do azoto não proteico, pela amónia, já de si importante. Verifica-se ainda um aumento da digestibilidade da forragem pela solubilização parcial da hemicelulose e quebra parcial da celulose, bem como uma inibição do desenvolvimento de fungos e leveduras, um factor importante para a sua conservação (Pires *et al.*, 2003).

Em alguns casos foi reportada uma hiperexcitabilidade anormal de gado e ovelhas alimentados com este tipo de forragem. Durante a amonização das forragens formam-se um elevado número de compostos, tais como pirazinas e imidazóis, principalmente 2- e 4-MI. As pirazinas são geralmente consideradas não tóxicas e anticonvulsivantes em ratinhos, mas o 2- e 4-MI são agentes convulsivantes nos mesmos, sendo o segundo marcadamente mais potente (Nielsen, 1993). Daí que a acção neurotóxica destas silagens lhe tenha sido atribuída. O 4-MI passa também para o leite afectando as crias, que se apresentam como mais sensíveis aos efeitos neurotóxicos deste composto.

A amonização não deve ser realizada em silagens frescas ou de melhor qualidade, dado que do seu teor natural em açúcares solúveis pode resultar a reacção com amónia e consequente formação de 4-MI (Bergström, 1991). Nas forragens secas este risco é mínimo.

Estudos mais recentes parecem, no entanto, revelar que o 4-MI não deverá ser o único composto activo que origina a intoxicação. Estudos de biodisponibilidade do 4-MI em cabras e novilhos (Nielsen, 1993), utilizando doses elevadas (20 mg/kg), superiores às ingeridas através da forragem contaminada, levaram a que os animais apresentassem sinais muito ligeiros de intoxicação, sendo o mesmo reportado por Sievertsen *et al.* (1993). Na verdade, muitos outros imidazóis ainda não identificados são formados no decorrer da amonização. Müller *et al.* (1998) encontraram novos dialquilimidazóis nas forragens, mas estes compostos não parecem ser mais tóxicos que o 4-MI, estando ainda presentes em doses muito menores que este. Provavelmente, trata-se de uma intoxicação devida à acção conjunta de mais do que uma substância, o que dificultará a resolução do problema.

2.6.4. Toxicocinética, mutagenicidade e carcinogenicidade

Há várias descrições da absorção, distribuição e metabolismo do 4-MI na literatura, em animais de experiência. Este composto é prontamente absorvido por via oral, apresentando uma biodisponibilidade de cerca de 70% nas ovelhas (Karangwa *et al.*, 1990a). Após administração oral é bem absorvido no rato e apresenta uma eliminação renal saturável, com um tempo de semi-vida de cerca de 2 horas.

O principal metabolito, encontrado na urina e plasma, parece tratar-se de um composto sulfatado, mas cerca de 90% do composto é recuperado inalterado na urina (Yuang e Burka, 1995). Na ovelha, pelo contrário, apenas 7% são recuperados na forma original (Karangwa *et al.*, 1990a), o que sugere que deverá haver marcadas diferenças na metabolização do 4-MI entre espécies. Quando administrado a cabras o composto é detectado também no leite, numa concentração mais elevada que no plasma, apresentando-se como uma importante via de eliminação do composto (4%) essencialmente inalterado (Nieslen, 1993).

Diversos ensaios de toxicidade têm sido realizados, conforme reportado nos diversos relatórios do comité científico para os assuntos alimentares da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1974, 1979, 1984, 1989 e 1997). Com base nesses ensaios, não foram verificados efeitos adversos resultantes da ingestão dos caramelos da classes III e IV (NOAEL de 20 g/kg peso corporal), apresentando-se também com pouco significado no que respeita a potenciais efeitos genotóxicos nos humanos. No entanto, a administração dos corantes da classe III em ratos conduziu a um decréscimo na contagem de linfócitos. Este efeito é rapidamente reversível e parece ser causado por um derivado imidazólico, o 2-acetil-4-tetrahydroxibutilimidazol (THI). Estudos recentes demonstram que este efeito não é verificado nos humanos para a dose diária admissível de 200 mg/kg peso corporal, conforme estipulado pela OMS. De qualquer forma, os caramelos de classe III passaram a ser também limitados pelo teor no imunossupressor THI, actualmente com um máximo admissível de 10 mg/kg, para uma base de cor equivalente.

Um estudo recente demonstrou ainda a capacidade do 4-MI em inibir uma isoenzima do citocromo P450 (P450 2E1), implicada na oxidação, no fígado humano, de muitos compostos de baixa massa molecular, com provável ou confirmada acção carcinogénica (Hargreaves *et al.*, 1994).

2.6.5. Metodologias analíticas

Inicialmente foram reportadas determinações baseadas em extracções líquido-líquido e determinações colorimétricas, ou por TLC, caracterizadas por baixa especificidade e sensibilidade e, obviamente, bastante morosas. Um resumo dos mais importantes métodos reportados na literatura, ordenados por antiguidade, encontra-se descrito na Tabela 2.7.

Tabela 2.7 - Alguns dos métodos descritos na literatura para determinação quantitativa do 4-MI

matriz	Extracção	quantificação	limite de detecção	referência
corante caramelo	líquido-líquido múltipla	TLC	-	Wilks et al., 1973
corante caramelo	líquido-líquido múltipla	GC/FID	-	Wilks et al., 1973
corante caramelo	fase sólida (catiónica fraca) + líquido-líquido	GC/FID	-	Carnevale, 1975
corante caramelo	líquido-líquido múltipla	GC/FID	10 mg/kg	Fuchs e Sundell, 1975
corante caramelo	terra de diatomáceas, diclorometano	GC/FID	0,2 mg/kg	Wilks et al., 1977
matérias-primas da cerveja	fase sólida (catiónica fraca) + líquido-líquido	GC/FID	1 mg/kg	Buckee e Bailey, 1978
corante caramelo	líquido-líquido simples	GC/FID	0,1 mg/kg	Cerny e Blumenthal, 1979
corante caramelo	par-iónico (BEHPA pH 6,0)	HPLC/UV	4 mg/kg	Thomsen e Willumsen, 1981
fumo de tabaco	-	HPLC/UV	-	Moree-Testa et al., 1984
forragem, fluidos biológicos	par-iónico (BEHPA pH 6,0)	HPLC/UV	0,5 mg/kg	Karangwa et al., 1990
fluidos biológicos	par-iónico (BEHPA pH 6,0)	HPLC/UV	-	Sivertsen et al., 1993
corante caramelo	-	ECZ/UV	-	Ong et al., 1994
corante caramelo	par-iónico (BEHPA pH 7,6)	GC/MS	0,25 mg/kg	Fernandes e Ferreira, 1997
corante caramelo e sumos	-	HPLC/DAD	-	Ciolino, 1998

No campo da extracção destes compostos a utilização de resinas de troca inónica constituiu um dos primeiros avanços importantes, embora a utilização da extracção selectiva por par-iónico tenha, de facto, marcado definitivamente esta área, sendo posteriormente um dos métodos mais utilizados. O carácter hidrofílico do 4-MI origina baixa eficiência de extracção com a maioria dos solvente orgânicos, tornando difícil uma extracção quantitativa. Usando a técnica do par-iónico, com hidrogenofosfato de 2-etil hexilo (BEHPA), conforme descrito pela primeira vez para este composto por Thomsen e Willumsen (1981), torna-se possível a obtenção de um produto mais hidrofóbico. Para além disso, este procedimento tem a vantagem de favorecer extractos finais mais limpos.

Para a quantificação, tem sido utilizada essencialmente a cromatografia, nomeadamente HPLC, GC e ECZ. No primeiro caso é, por vezes, reportada a problemática

do “tailing” naturalmente associado a substâncias básicas como os imidazóis. No segundo, e dada a baixa volatilidade e elevada polaridades destes compostos, a necessidade de derivatização é o factor negativo mais frequentemente descrito. As determinações mais recentes fazem já determinação simultânea do 4-MI e do THI, os dois imidazóis com teores legislados nos corantes caramelo (Kjeldus *et al.*, 2003).

PARTE EXPERIMENTAL

Capítulo 3 - Amostragem

3.1. Amostragem

3.2. Caracterização geral da amostras

3.3. Processos extractivos

3.3.1. Cafeína, trigonelina e ácido nicotínico

3.3.2. D,L-Aminoácidos

3.3.3. Aminas biogénicas

3.3.4. Aminas heterocíclicas aromáticas

3.3.5. 4-Metilimidazol

3.1. Amostragem

Com vista a cumprir os objectivos delineados para este trabalho, analisaram-se diversas amostras de café, arábica e robusta, no estado verde e após torra. As amostras, de diversas origens geográficas, foram fornecidas por uma indústria torrefactora local.

Conforme referido na introdução, Portugal consome, contrariamente à maioria dos países, principalmente café robusta. As amostras avaliadas traduzem inevitavelmente essa realidade, com um total de 20 cafés robusta e 10 arábica. Posteriormente, verificou-se não ter sido a melhor aproximação, dado que para efeito de tratamento estatístico, as duas espécies deveriam ter igual representatividade. Além disso, e no decorrer da análise discriminativa, surgiu ainda a possibilidade da discriminação do café verde de acordo com o tipo de processamento realizado (a seco ou a húmido), objectivo não considerado no início dos trabalhos. Verificou-se ainda que uma amostra estava mal classificada, como aliás pode ser verificado no primeiro artigo da discriminação (pág. 119). Na altura pensou tratar-se de um café robusta um pouco diferente dos restantes mas, como no segundo trabalho de discriminação o comportamento se manteve, verificou-se que, na realidade, se tratava de um café arábica. Trata-se de uma amostra das Honduras, um país que produz as duas variedades. Assim, a amostragem nos restantes artigos foi corrigida para 11 arábicas e 19 robustas.

O controlo do processo da torra a nível industrial é feito, como detalhadamente discutido no capítulo 1, recorrendo à avaliação da tonalidade dos grãos. Trata-se, obviamente, de uma avaliação pouco precisa, conduzindo a alterações químicas de lote para lote, que se traduzem em produtos finais com características organolépticas diferentes. Neste âmbito, pretendeu-se verificar o comportamento dos composto nitrogenados com a torra, por forma a verificar se algum se poderia adequar aos propósitos de controlo do processo.

Com este intuito, optou-se por seleccionar as amostra de café arábica e robusta mais representativas. Assim, escolheu-se um café arábica brasileiro, simultaneamente o maior produtor mundial e maior fornecedor português e um café robusta da Costa do Marfim, o principal fornecedor de café robusta do continente africano e, simultaneamente, um dos maiores fornecedor daquela indústria. Embora Angola seja também um importante fornecedor de Portugal, a nível mundial a sua produção é hoje pouco significativa.

O processo usual de torra naquela indústria, comum a muitas outras, consiste na torra dos grãos durante cerca de 14-15 minutos, entrando no torrefactor a cerca de 160°C e atingindo temperaturas da ordem dos 220°C. Trata-se de uma torra escura, ideal para café expresso, o mais comum em Portugal. Assim, optou-se por realizar torras experimentais durante os referidos 15 minutos, a diversas temperaturas, englobando as descritas (140°C, 160°C, 180°C, 200°C, 220°C e 240°C). Desta forma, pretendeu-se verificar não só o comportamento dos compostos com a temperatura, mas também as possíveis diferenças que poderiam ocorrer entre as duas espécies. No primeiro trabalho (capítulo 4) avaliou-se ainda as constantes para as reacções a 240°C, para o que se realizaram torras experimentais a esta temperatura com tempos variáveis, desde 5 até 20 minutos.

As amostras foram conservadas a -18°C, em frascos hermeticamente fechados. Para a determinação dos diversos compostos contemplados na parte experimental, as amostras de café, verde e torrado, foram sempre previamente moídas e passadas por um peneiro de 25 mesh, equivalente a uma abertura de malha de cerca de 0,7 mm, imediatamente após serem retiradas do congelador. Parte do pó obtido era utilizada para a determinação do teor em humidade das amostras, por forma poder exprimir os resultados em peso seco.

3.2. Caracterização geral das amostras

As características físico-químicas dos grãos de café torrados dependem não só da razão tempo/temperatura utilizada no processo de torra, mas também de uma multiplicidade de factores que incluem, inevitavelmente, as características dos próprios grãos e do instrumento utilizado.

Assim, e por forma a permitir comparar os resultados obtidos com os de outros autores, é usual recorrer a uma medida da perda de massa durante a torra, a chamada “organic roast loss” (ORL). Para o seu cálculo, é necessário conhecer o peso dos grãos antes e depois da torra, bem como o teor em humidade. A determinação da perda de massa das amostras correspondentes às torras experimentais foi determinada, após libertação da maior parte do dióxido de carbono, que usualmente ocorre nas primeiras 24 horas. O teor em humidade foi também calculado, em todas as amostras, após moagem, recorrendo à secagem em estufa com circulação forçada de ar, a 103±2°C, até peso constante. Os resultados obtidos para a avaliação das respectivas ORL podem ser consultados na pág. 124.

Para além disso, foi ainda caracterizado o teor em gordura bruta das amostras, por extracção com éter de petróleo em dispositivo de Soxhlet (método AOAC 920.97, 2000),

bem como o teor em compostos proteicos, através método de Kjeldhal. Estes resultados encontram-se descritos na Tabela 1 da pág.152.

3.3. Processos extractivos

Consoante a determinação pretendida e o tipo de compostos a extrair, a extracção procedeu-se de forma diversa.

3.3.1. Cafeína, trigonelina e ácido nicotínico

Para a determinação simultânea da cafeína, trigonelina e ácido nicotínico, procedeu-se a uma extracção com água quente, fraccionada em porções de 20 ml (2 g/100 ml), conforme detalhadamente descrito na pág.109. O extracto assim obtido era injectado em HPLC, após filtração.

3.3.2. D,L-Aminoácidos

Para a determinação dos aminoácidos livres foi realizado um desengorduramento prévio das amostras, com éter de petróleo em dispositivo de Soxhlet (pág. 150), seguido de extracção com ácido sulfossalicílico a 2% (1g/50 ml). Os aminoácidos eram posteriormente isolados por limpeza em colunas de extracção em fase sólida, recorrendo a resinas de troca catiónica forte, com terminais de ácido sulfónico. Para determinação dos aminoácidos totais, as amostras de café eram sujeitas a uma hidrólise com ácido metilsulfónico 4M, durante 16h a 110°C, seguidas de diluição e limpeza nas mesmas colunas de extracção em fase sólida descritas para os aminoácidos livres. Os extractos finais obtidos eram, posteriormente, convertidos em ésteres etoxicarbonilheptafluoro-butíricos com vista à sua determinação por cromatografia gasosa.

3.3.3. Aminas biogénicas

No caso das aminas biogénicas realizou-se uma extracção com ácido tricloroacético a 5%, equivalente a 3g/25 ml no primeiro trabalho (pág. 162) e posteriormente a 500mg/8ml (pág. 187). Enquanto que no primeiro trabalho se determinaram apenas as aminas biogénicas livres, nos restantes procedeu-se à hidrólise do extracto assim obtido, bem como do resíduo insolúvel, por forma a determinar também as aminas biogénicas conjugadas (pág. 187). Os extractos obtidos foram, em todos os casos, sujeitos a uma limpeza por um processo de par-iónico, com hidrogenofosfato de bis(2-etil-hexilo) (BEHPA), a pH 7,4, seguidos de derivatização com cloreto de dansilo (pág. 162-163) para análise em HPLC, com detector de díodos em série com detector de fluorescência.

3.3.4. Aminas heterocíclicas aromáticas

O processo de extracção das aminas heterocíclicas aromáticas do café baseou-se nos métodos usualmente descritos na literatura, consistindo numa primeira limpeza com terra de diatomáceas, sendo o diclorometano eluído sujeito a uma extracção em fase sólida sequencial, com resinas de ácido propilsulfónico (PRS) e C₁₈ (pág. 196). As aminas eram eluídas com metanol-amónia (9:1 v/v), levadas à secura em corrente de azoto e redissolvidas numa solução metanólica do padrão interno. Para a determinação por HPLC as soluções eram injectadas directamente. Para a determinação por cromatografia gasosa era ainda necessário proceder à sua derivatização, conforme descrito na pág. 198.

3.3.5. 4-Metilimidazol

Para a determinação do 4-metilimidazol o café foi extraído com metanol (2g/ 30 ml). O extracto assim obtido foi filtrado e levado à secura, em evaporador rotativo, sendo posteriormente redissolvido em tampão fosfato (pH 6,0; 0,2M) e sujeito ao mesmo processo de limpeza descrito para as aminas biogénicas, com BEHPA (pág. 208). Após derivatização com isobutilcloroformato, o metilimidazol foi determinado por GC-MS.

Capítulo 4 – Cafeína, trigonelina e ácido nicotínico

“Development of an HPLC/diode-array detector method for simultaneous determination of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee”

in *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol*, 21(20) 3187-3195, 1998

“Discriminate analysis of roasted coffee varieties for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine content”

in *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3420-3424, 2000

“HPLC/diode-array applied to the thermal degradation of trigonelline, nictotinic acids and caffeine in coffee”

in *Food. Chem.*, 68, 481-485, 2000.

J. LIQ. CHROM. & REL. TECHNOL., 21(20), 3187-3195 (1998)

**DEVELOPMENT OF AN HPLC/DIODE-ARRAY
DETECTOR METHOD FOR SIMULTANEOUS
DETERMINATION OF TRIGONELLINE,
NICOTINIC ACID, AND CAFFEINE
IN COFFEE**

S. Casal, M. B. Oliveira, M. A. Ferreira*

CEQUP/Lab. de Bromatologia
Faculdade de Farmácia
Universidade do Porto
Aníbal Cunha
4050 Porto, Portugal

ABSTRACT

This paper describes an adequate procedure of reversed-phase HPLC/diode-array detector to be used in quality control to simultaneously quantify three nitrogen compounds: trigonelline, nicotinic acid, and caffeine, in coffee samples either in the green or roasted states. The chromatographic separation was achieved using a reversed-phase column (Spherisorb ODS2) with gradient elution of 0.01M phosphate buffer pH 4.0 (A) and methanol (B). The effluent was monitored by a diode-array detector and the chromatograms were recorded at 265 nm. The sample preparation was quite simple involving only boiling water extraction and filtration.

A linear relationship was found between peak area and concentration range of 0.15-450 µg/mL, 0.10-500 µg/mL, and 0.05-500 µg/mL for trigonelline (at 268 nm), nicotinic acid (at 264 nm), and caffeine (at 276 nm), respectively.

3187

Extensive quality assurance of the proposed method was performed by the standard addition method in both green and roasted coffee.

The precision in green coffee samples was better than 1.3, 5.8, and 1.1% and, for roasted coffee, better than 0.5, 2.4, and 1.2% for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine, respectively. Also, for green coffee, the mean recovery values were $98 \pm 1\%$, $84 \pm 5\%$, and $99 \pm 1\%$ and for roasted coffee, these were $101 \pm 1\%$, $98 \pm 1\%$, and $99 \pm 1\%$ for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine, respectively.

The proposed method appears to be an adequate method for quality control in the coffee industry.

INTRODUCTION

Flavours, nutritional and toxicological properties of coffee, are affected by roasting as a consequence of thermal degradation of several endogenous compounds. Trigonelline (N-methylbetaine of pyridine-3-carboxylic acid) (I), nicotinic acid (pyridine-3-carboxylic acid) (II), and caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) (III) are natural nitrogen compounds present in coffee beans described^{1,2} as suffering modifications during the roasting procedure.

Due to the variations in contents of trigonelline, nicotinic acid, and caffeine in commercial coffee brought about by botanical, ecological, and roasting reasons, the simultaneous quantification of these three nitrogenous components should be useful both for quality control of raw materials and roasted coffee and to follow the technology of the thermal procedure used for roasting.

Several chromatographic methods are found in the literature³⁻⁷ for the individual quantification of these compounds and for biparametric determinations of trigonelline and caffeine in coffee.⁸⁻¹⁰ Nicotinic acid is usually determined by microbiological assays.

Several chromatographic attempts to analyse it in coffee by reversed-phase have been tried, however complete peak resolution due to certain interfering components has not yet been achieved.¹

As far as we know, this paper represents the first attempt to simultaneously quantify trigonelline, nicotinic acid, and caffeine free from interferences by a reversed-phase HPLC/diode-array method.

EXPERIMENTAL

Apparatus

The chromatographic analysis was carried out in a analytical HPLC unit (Jasco) equipped with two PU-980 pumps, a MD-910 diode-array detector (DAD) and a AS-950 auto-sampler.

Reagents and Standards

Trigonelline, nicotinic acid, and caffeine were purchased from Sigma. Potassium dihydrogen phosphate (p.a.) and methanol (LiChrosolv - gradient grade) were purchased from Merck.

Coffee Samples

Two samples from Brazil and Ivory Coast, before and after roasting were provided by a local coffee industry. The beans were ground and powdered to pass through a 0.75mm sieve. Sample moisture was determined by drying at $103 \pm 2^\circ\text{C}$ until constant weight.

Extraction of Compounds from Coffee

A 2 g portion of each powdered coffee bean sample was blended with several portions of 20 mL of water in a Erlenmeyer flask and boiled during 5 min on a heated magnetic stirrer. The extracts were combined and transferred to a 100 mL volume flask and diluted to the volume mark. The mixture was filtered through 0.2 μm filter paper and 20 μL was analysed by HPLC.

HPLC Analysis

The chromatographic separation of compounds was achieved with a reversed-phase Spherisorb ODS2 (5 μm , particle size; 25.0 x 0.46 cm) column. The solvent system used was a gradient of phosphate buffer (pH 4.0) (A), prepared with 5% of potassium dihydrogen phosphate 0.2 M, and methanol (B). The gradient was as follows: 0'-7% B, 4'-9% B, 6'-25% B, 13'-29% B, and 21'-50% B with a flow rate of 1.0 mL/min. Detection was accomplished with a diode-array detector at 268 nm for trigonelline, 264 nm for nicotinic acid, and 276 nm for caffeine.

The chromatograms were recorded at 265 nm. The compounds under study were identified by chromatographic comparisons with authentic standards, by coelution and by their UV spectra. Quantification was based on the external standard method.

RESULTS AND DISCUSSION

Analytical Curve and Detection Limit

The above mentioned extraction procedure has proved to be the best of several attempts, involving time and temperature variations. The use of acid or basic conditions was also tested.

In order to study the precision of the chosen extraction method one sample was extracted three times. The coefficients of variation were 1.6, 1.0, and 2.3% for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine, respectively.

Under the assay conditions, a linear relationship between the concentration of the compounds in study and the UV absorbance was obtained. This linearity was maintained over the concentration range 0.15-450 µg/mL, 0.10-500 µg/mL, and 0.05-500 µg/mL for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine, respectively. The correlation coefficient for each standard curve invariably exceeded 0.999.

The calibration curves were obtained by triplicate determinations of each calibration standard with the peak area values (arbitrary units) plotted as average values. The relative average deviations of triplicates were less than 2% in all cases. The average regression equations found were: $y = 60.26362x - 1.57708$, $y = 73.55656x + 0.25439$, and $y = 111.53150x + 1.36925$ for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine, respectively.

The detection limit values were calculated as the concentration corresponding to three times the standard deviation of the background noise and were 0.15 µg/mL for trigonelline, 0.10 µg/mL for nicotinic acid, and 0.05 µg/mL for caffeine.

Validation of the Method

The chromatograms obtained for green and roasted coffee samples from Ivory Coast (*Coffea canephora* var. *robusta*) are shown in Figures 1 and 2. The retention times (RT) obtained were: RT 3m 34s for trigonelline, RT 4m 36s for

TRIGONELLINE, NICOTINIC ACID, AND CAFFEINE

3191

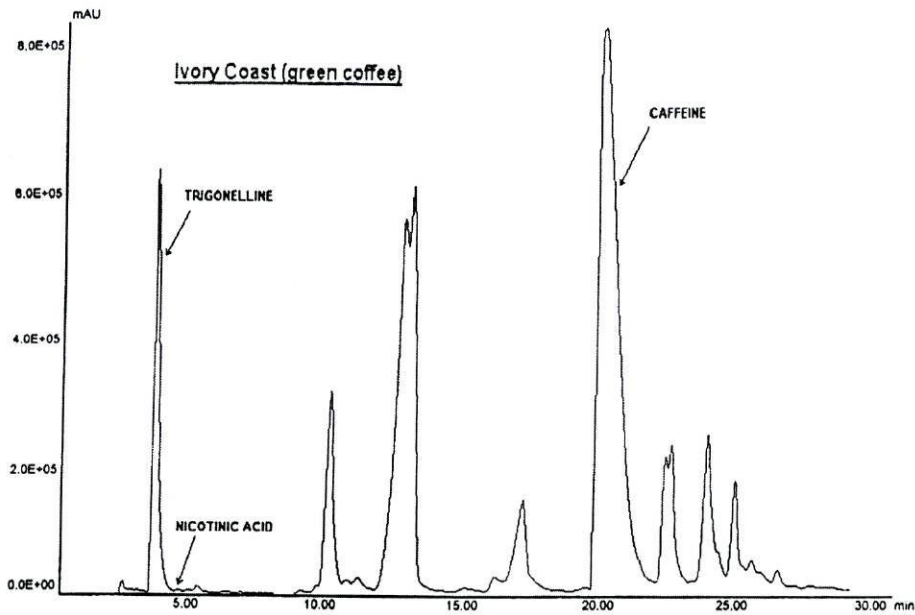


Figure 1. HPLC profile of a green coffee sample from Ivory Coast. Recorded at 265 nm.

nicotinic acid, and RT 20m 10s for caffeine. The unidentified peaks had identical UV spectra when recorded with a diode-array detector, with identical shape and maximum at 320 nm, which suggested that they could be hydroxycinnamic acids, which were not identified because they were not in the scope of this research work.

Results from the quantification applied to one sample of *Coffea arabica* (Brazil) and one sample of *Coffea canephora* var. *robusta* (Ivory Coast) are shown in Table 1. All determinations were referred to dry base as the average of triplicate determinations.

The values in both coffee species are in good agreement with those reported in the literature where they were measured by other different methodologies except for M.J. Martin³ and Mazzafera⁷ who found higher contents of trigonelline and M. Daglia⁹ who found higher contents of nicotinic acid. The precision of the analytical method was evaluated by measuring the peak chromatographic area of the three compounds 10 times on the same sample. The relative standard deviations for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine were, respectively, 1.3, 5.8 and 1.1 % in the green and 0.5, 2.4 and 1.2% in the roasted coffee.

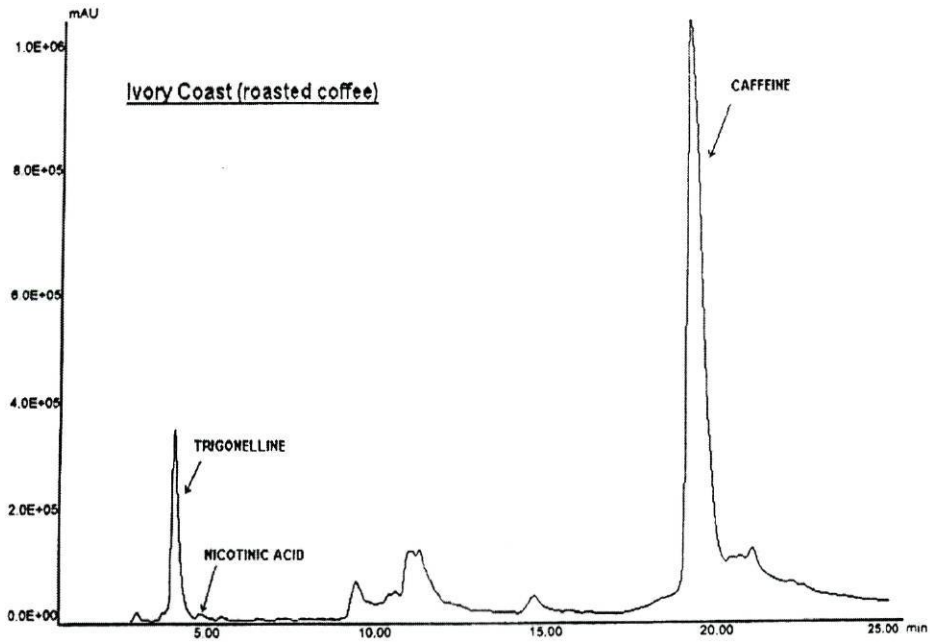


Figure 2. HPLC profile of a roasted coffee sample from Ivory Coast. Recorded at 265 nm.

Table 1

Trigonelline, Nicotinic Acid, and Caffeine Content in Green and Roasted Coffee Samples from Brazil (*Coffee Arabica*) and Ivory Coast (*Coffee Canephora Var. Robusta*) (db)

	Brazil		Ivory Coast	
	Green g/kg ± sd	Roasted g/kg ± sd	Green g/kg ± sd	Roasted g/kg ± sd
Trigonelline	8.912±0.006	5.499±0.013	6.162±0.059	3.600±0.081
Nicotinic Acid	0.028±0.001	0.114±0.011	0.025±0.004	0.095±0.007
Caffeine	12.361±0.101	16.128±0.005	20.832±0.224	25.551±0.185

In order to demonstrate the effectiveness of the extraction procedure and the accuracy of the proposed method, one sample of green coffee was analysed in triplicate before and after the addition of three known quantities of trigonelline, nicotinic acid, and caffeine. The same procedure was applied to a

TRIGONELLINE, NICOTINIC ACID, AND CAFFEINE

3193

Table 2
Recovery of Trigonelline, Nicotinic Acid, and Caffeine From a Spiked Green Coffee Sample*

	Present (g/kg)	Added (g/Kg)	Found (g/Kg)	Standard Deviation	CV%	Recovery %
Trigonelline	7.063	0.981	7.936	0.100	1.3	98.7±1.2
		0.742	7.591	0.070	0.9	97.3±0.9
		0.534	7.440	0.019	0.3	97.9±0.3
Nicotinic acid	0.018	0.196	0.183	0.012	6.6	85.5±5.6
		0.148	0.136	0.006	4.4	81.9±3.6
		0.097	0.097	0.005	6.2	84.3±5.2
Caffeine	15.487	3.091	18.668	0.186	1.0	100.5±1.0
		1.682	16.771	0.114	0.7	97.7±0.7
		0.631	15.972	0.003	0.0	99.1±0.0

* Mean value found for 3 assays for each studied concentration

roasted coffee sample. The results are listed in Tables 2 and 3. The mean recovery values for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine were, respectively, $98 \pm 1\%$, $84 \pm 5\%$, and $99 \pm 1\%$ in green coffee and $101 \pm 1\%$, $98 \pm 1\%$, and $99 \pm 1\%$ in roasted coffee. The low recovery for nicotinic acid in the green coffee can be explained by its small concentration, near to the detection limit. These results confirm no interference effects due to matrix composition.

For the simultaneous determination of trigonelline and nicotinic acid it was very important to control the pH of the solvent used in the chromatographic separation, therefore, it was essential to work close to pH 4.0 (3.9-4.1). At higher pH the separation of compounds was compromised. With pH=6 an overlapping of both compounds was observed. The use of the diode-array detector was crucial to achieve a chromatographic gradient with no interfering components in the area of the nicotinic acid peak in both green and roasted coffee.

In conclusion, this study suggests that the technique herein proposed is a new useful approach for the simultaneous analysis of trigonelline, nicotinic acid, and caffeine in both green and roasted coffee samples.

Table 3

Recovery of Trigonelline, Nicotinic Acid and Caffeine from a Spiked Roasted Coffee Sample*

	Present (g/kg)	Added (g/Kg)	Found (g/Kg)	Standard Deviation	CV%	Recovery %
Trigonelline	3.393	1.143	4.490	0.016	0.36	99.0±0.4
		0.747	4.419	0.051	1.22	101.2±1.2
		0.549	3.996	0.102	2.55	101.4±2.6
Nicotinic acid	0.191	0.519	0.688	0.008	1.16	96.8±1.1
		0.449	0.643	0.005	0.78	100.5±0.8
		0.249	0.430	0.003	0.70	97.7±0.7
Caffeine	19.478	2.701	21.810	0.020	0.09	98.3±0.1
		1.644	20.891	0.158	0.76	98.6±0.7
		0.549	20.364	0.616	3.02	101.7±3.1

* Mean value found for 3 assays for each studied concentration.

Despite the complexity of the matrix, the sample pre-treatment applied is simple and this approach only requires an HPLC/diode-array detector. This method is suitable for rapid routine assays and could indirectly be helpful to study the evolution of these compounds with the roasting procedure or to help in the differentiation of coffee varieties.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to JNICT (Project PBIC/C/TPR/2656/95) and S. Casal is grateful to Sub-programa Ciência e Tecnologia do 2º Quadro Comunitário de Apoio (BD 9580/96) for financial support of this work.

REFERENCES

1. R. Macrae, "Nitrogenous Components," in **Coffee Vol. I: Chemistry**, R. J. Clarke, R Macrae, eds., Elsevier Applied Science, Publishers Ltd., London, 1987.

TRIGONELLINE, NICOTINIC ACID, AND CAFFEINE

3195

2. M. N. Clifford, "Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products," in **Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage**, M. N. Clifford, K. C. Wilson, Croom Helm, New York, 1985.
3. M. J. Martín, F. Pablos, M. A. Bello, A. G. González, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **357**, 357-358 (1997).
4. H. Terada, A. Suzuki, H. Tanaka, M. Miyabe, *Jap. J. Food Chem.*, **3(2)**, 125-128 (1996).
5. A. Stennert, H. G. Maier, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **202**, 45-47 (1996).
6. A. Stennert, H. G. Maier, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **199**, 198-200 (1994).
7. P. Mazzafera, *Phytochemistry*, **30(7)**, 2309-2310 (1991).
8. C. A. B. De Maria, L. C. Trugo, R. F. A. Moreira, M. Petracco, *Food Chemistry*, **52**, 447-449 (1995).
9. M. Daglia, M. T. Cuzzoni, C. Dacarro, *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 2273-2277 (1994).
10. L. C. Trugo, R. Macrae, J. Dick, *J. Sci. Food Agric.*, **34**, 300-306 (1983).
11. P. Chambel, M. B. Oliveira, P. B. Andrade, R. M. Seabra, M. A. Ferreira, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **20(18)**, 2949-1957 (1997).

Received January 24, 1998

Accepted April 7, 1998

Manuscript 4723

Discriminate Analysis of Roasted Coffee Varieties for Trigonelline, Nicotinic Acid, and Caffeine Content

S. Casal,[†] M. B. P. P. Oliveira,^{*,†} M. R. Alves,[†] and M. A. Ferreira[†]

CEQUP/Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto. Rua Aníbal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal, and ESTG, Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Av. do Atlântico, Apartado 574, 4900 Viana do Castelo, Portugal

Arabica and *robusta* roasted coffees from several geographical origins, in a total of 29 samples, were characterized for their contents in caffeine, trigonelline, and nicotinic acid by a recently developed HPLC/diode-array detector method. All samples were subjected to the same roasting procedure in order to eliminate the variations due to this process. Characterization was achieved by applying multivariate and nonparametric analysis to the chromatographic results. The two coffee varieties were clearly separated by their trigonelline and caffeine contents. Nicotinic acid could not be used as a variety discriminate factor. There was no association with the geographical origin of the samples.

Keywords: Roasted coffee; caffeine; trigonelline; nicotinic acid; multivariate and nonparametric analysis

INTRODUCTION

More than 80 species of the genus *Coffea* L. (Rubiaceae) are known. The most important are *Coffea arabica* and *Coffea canephora*, which account, respectively, for about 75% and 24% of the world production. Coffee is an expensive raw material, especially *arabica* coffee, and over the years many fraudsters have been tempted to falsify the product declaration due to the increasing practice of selling coffees on the basis of their botanical and/or geographic origin (Prodolliet, 1996).

International coffee trade is conducted almost exclusively with green coffee. In this state, *arabica* and *robusta* coffees are easily distinguished by their appearance (e.g., size, shape and color). Once roasted and/or ground, the form in which the coffee is commercially available to the consumers, this visual criterion is eliminated. Efficient methods are thus required for authentication of roasted coffee beans and for detecting trading fraud.

Efforts have been made to characterize the two coffee species using chemical data. Nevertheless, the chemical composition depends not only on the species and variety in question, but also on the degree of roasting and, to a lesser extent, on other factors such as agricultural practices, degree of maturation, storage conditions, and geographical origin. These factors are not under the analyst's control which makes it extremely difficult to quote average values for any type of coffee (Macrae, 1989). The main difference between the *arabica* and *robusta* roasted coffee seems to be the composition of the unsaponifiable matter (Folstar, 1989), specifically

the presence of 16-*O*-methylcafesfestol in *robusta* coffee (Speer et al., 1991). Chlorogenic acids can also be successfully applied to this discrimination and, either alone or in conjunction with caffeine, have been used to characterize commercial and noncommercial species of coffee (Clifford, 1989; Correia et al., 1995; Andrade et al., 1997; Bicchi et al., 1995). Caffeine is probably the single most analyzed chemical factor in coffee and has also been frequently used in the discrimination of green coffee varieties (Clifford, 1987; Macrae, 1989). Several approaches to coffee authenticity have also been reported based on spectroscopic techniques (Kemsley et al., 1995; Briandet et al., 1996; Downey et al., 1997), aroma discrimination (Aishima, 1991), solid-phase microextraction-gas chromatography (Bicchi et al., 1997), and volatile profiles (Martín et al., 1996). Several of these works associated chemical analysis with pattern recognition techniques.

The aim of this work represents a contribution to the discrimination of the most representative coffee varieties and eventually to access their geographical origins. The compounds analyzed simultaneously were trigonelline (*N*-methylnicotinic acid), nicotinic acid, and caffeine by a recently developed HPLC/diode-array detector method (Casal et al., 1998). It was our objective to find out whether nicotinic acid could be used as a discriminate factor and to confirm the ability of caffeine and trigonelline contents to discriminate *arabica* and *robusta* roasted coffees.

MATERIALS AND METHODS

Coffee Samples. Roasted beans samples from both *Coffea canephora* var. *robusta* and *Coffea arabica* were studied. *Coffea robusta* samples ($n = 20$) were from several geographical origins: Ivory Coast (IC), India (IN), Honduras (H), Vietnam (VN), Angola (A), Uganda (UG), and Cameroon (CM). *Coffea arabica* samples ($n = 9$) were from Brazil (Br), Mexico (MX), Colombia (CO), Guatemala (GO), and Costa Rica (CR).

* To whom correspondence should be addressed (e-mail bromato@ff.up.pt; telephone 351-22-2078902; fax 351-22-2003977).

[†] CEQUP/Serviço de Bromatologia.

[†] ESTG, Instituto Politécnico de Viana do Castelo.

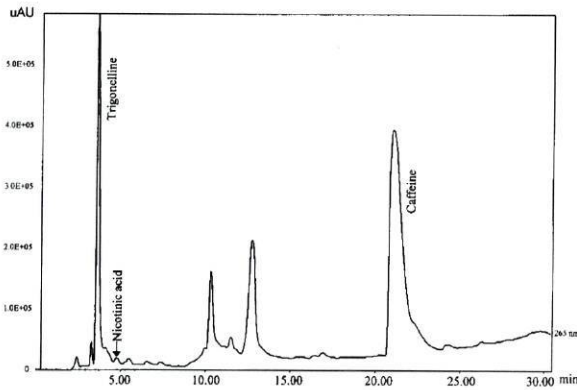


Figure 1. Typical HPLC profile of a roasted *arabica* coffee from Brazil.

A local importer and roaster of coffee supplied all coffee samples and was able to confirm their botanical and geographical origin. A standard method was used in the roasting procedure in order to eliminate the variations due to this process. Samples were hermetically sealed and stored at -20 °C until used for chemical analysis.

Sample moisture was determined in order to compare the results in a dry weigh basis.

Sample Preparation for Chemical Analysis. For extraction of the compounds in study, 2-g portions of each powdered coffee sample (25-mesh) were extracted with a total of 100 mL of boiling water (Casal et al., 1998). The solution was filtered into appropriate vials for use in the autosampler.

HPLC Analysis. HPLC analysis was achieved as described by Casal et al. (1998) with an analytical HPLC unit (Jasco) consisting of two PU-980 pumps, a MD-910 diode-array detector, and an AS-950 autosampler. A reversed-phase Spherisorb ODS2 (5 µm particle size, 25.0 × 0.46 cm) column was used. The solvent system used was a gradient of phosphate buffer pH 4.0 (0.1M) and methanol performed at a constant flow rate of 1.0 mL min⁻¹ at room temperature. Detection was accomplished with a diode-array detector, and chromatograms were recorded at 265 nm.

The compounds were identified by their retention times, chromatographic comparisons with authentic standards, and their UV spectra. Quantification was based on the external standard method. Under the assay conditions described, a linear relationship between the concentration and the UV

absorbance was obtained at 268 nm for trigonelline, 264 nm for nicotinic acid, and at 276 nm for caffeine.

To study the recovery of the procedure, known quantities of the three standards were added to one sample of roasted coffee, and the percentage recovery was calculated after triplicate analyses. These recovery values were 101 ± 1% for trigonelline, 98 ± 1% for nicotinic acid, and 99 ± 1% for caffeine.

Statistical Analysis. Principal Component Analysis was carried out after standardization of data to mean zero and unit variance and following standard procedures (Mardia et al., 1979).

Cluster analyses were performed after standardization of variables to unit variance and mean zero and using Euclidean distances as the distance measure and following the un-weighted pair group average method as the linking method (Mardia et al., 1979) as implemented in the Statistica for Windows Statistical package.

Spearman's Rho was calculated by substitution of the actual values observed by the respective ranks, followed by computation of

$$\rho = \text{SUM} [R(x) - (n + 1)/2][R(y) - (n + 1)/2] / n(n^2 - 1) / 12$$

where $R(x)$ and $R(y)$ represent the ranks for each pair of observations and n equals the total number of observations (or pairs).

Kendall's Tau was calculated by checking the number of concordant (N_c) and discordant (N_d) pairs of observations out of the total possible pairs of observations and computing the quantity

$$T = (N_c - N_d) / n(n - 1) / 2$$

where n refers to the total number of possible pair of observations.

Both measures of correlations (ρ and T) were then compared with appropriate tables to check for significance (Conover, 1980).

RESULTS AND DISCUSSION

A typical chromatogram obtained with a roasted sample from Brazil (*Coffea arabica*) is represented in Figure 1.

Summary results are presented in Figure 2, in the form of conventional box and whiskers plots, displaying,

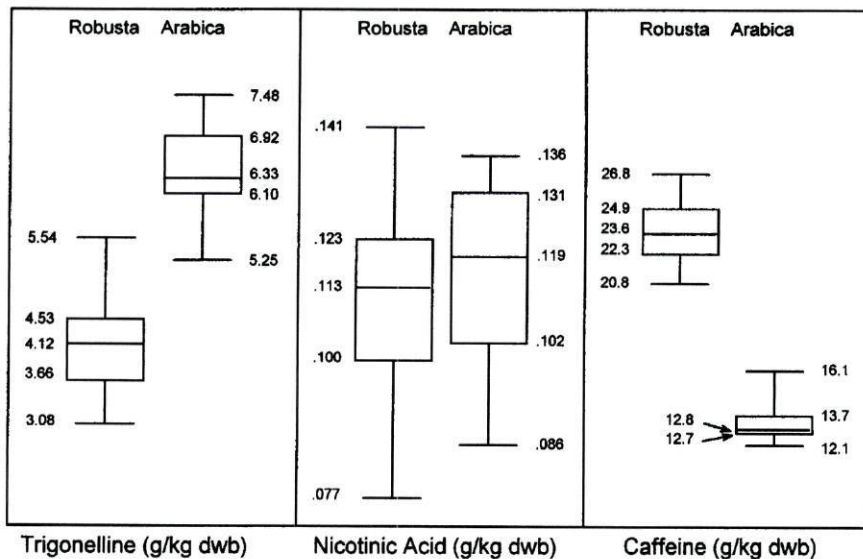


Figure 2. Univariate nonparametric analysis of trigonelline, nicotinic acid, and caffeine in roasted coffee samples.

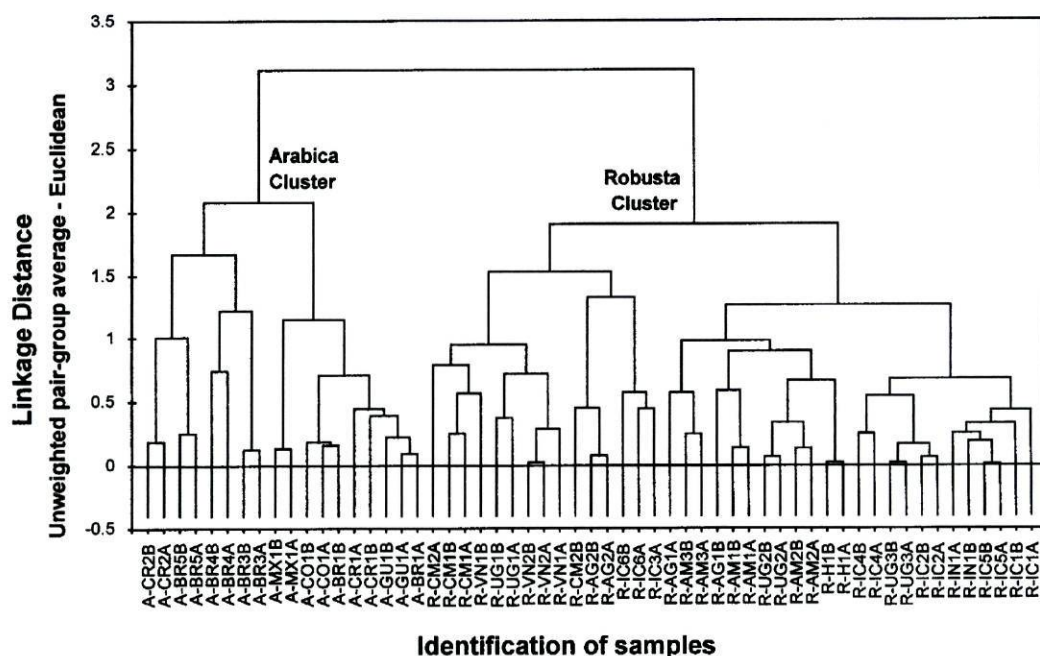


Figure 3. Cluster analysis of roasted coffee samples.

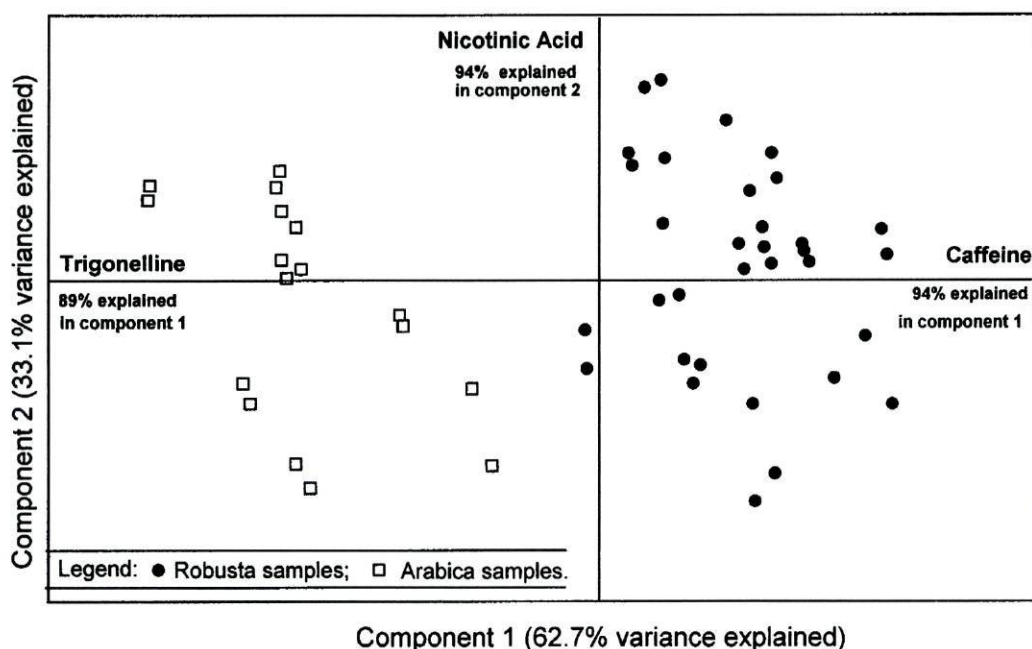


Figure 4. Principal component analysis of coffee samples on the three chemical parameters.

for each variable and for each coffee variety, the minimum values, first quartile, median, third quartile, and maximum values observed. All values are expressed in $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ on a dry weight basis (dwb).

It can be seen that there is a clear distinction between *arabica* and *robusta* samples in what concerns the caffeine levels. The levels found are in accordance with the literature (Clifford, 1987; Macrae, 1989). The variation between *arabica* and *robusta* coffees is mainly due to genetic differences found in the varieties of coffee beans, as it is stable on roasting (Macrae, 1989).

In the same figure we can observe that the differences in trigonelline between varieties are also apparent, but

Table 1. Overall and Pooled within Groups Simple Linear Correlations of Trigonelline, Nicotinic Acid, and Caffeine in the Roasted Coffee Samples^a

	overall correlations			pooled within groups correlations		
	trig	nic	caf	trig	nic	caf
trig	1.00			1.00		
nic	0.01	1.00		-0.11	1.00	
caf	-0.85 ^b	-0.21	1.00	-0.29	-0.42 ^b	1.00

^a trig = trigonelline; nic = nicotinic acid; caf = caffeine.
^b Significant correlations at $p = 0.05$

the nicotinic acid levels vary widely and assume similar levels in both varieties. Trigonelline and nicotinic acid

Table 2. Spearman Rho and Kendall Tau Measure Correlations: (a) Overall Correlations, (b) Correlations within *arabica* Variety, and (c) Correlations within *robusta* Variety

		Spearman Rho			Kendall Tau		
		trigonelline	nicotinic acid	caffeine	trigonelline	nicotinic acid	caffeine
all samples	trigonelline	–	–	–	–	–	–
	nicotinic acid	–0.03625	–	–	–0.018303	–	–
	caffeine	–0.740277 ^a	–2.51137 ^a	–	–0.516291 ^a	–0.207642 ^a	–
<i>arabica</i>	trigonelline	–	–	–	–	–	–
	nicotinic acid	0.108359	–	–	0.071895	–	–
	caffeine	0.001032	–0.686275 ^a	–	0.045752	–0.542484 ^a	–
<i>robusta</i>	trigonelline	–	–	–	–	–	–
	nicotinic acid	–0.276739	–	–	–0.158372	–	–
	caffeine	–0.303441	–0.391752 ^a	–	–0.192982	–0.232098 ^a	–

^a Significant correlations at $p = 0.05$

levels are known to be related with the intensity of roasting being the former progressively degraded and partially converted into nicotinic acid (Macrae, 1989). As our objective was to find correlation with the botanical and eventually geographical origin we have eliminated this variation factor by subjecting all samples to the same exactly roasting procedure (14 min from 160 to 220 °C).

A cluster analysis was carried out, with the corresponding dendrogram show in Figure 3. Two distinct clusters representing each coffee variety are obvious, but other clusters, formed at lower levels, although apparent, could not be attributed to the geographical origin or to any other specific reason.

As cluster analysis shows the existence of clusters without explaining the reasons assisting their formation, a principal component analysis was done, as shown in Figure 4. It becomes clear that the first principal component, which explains two-thirds of the total information, represents an opposition, or strong negative correlation, between the levels of trigonelline and caffeine, the former being lower and the latter higher in *robusta* than in *arabica* samples. The second principal component, which explains roughly one-third of the total information, represents differences in composition of nicotinic acid, which, being represented in the second component, is not correlated with the first two parameters under study. It is important to note that, as already observed in Figure 2, there is a great variability within each variety cluster in what concerns the nicotinic acid levels.

The strong negative correlation between caffeine and trigonelline and the absence of correlation between these two variables and nicotinic acid, as displayed in Figure 4, must be seen with caution since all data is analyzed simultaneously, without taking notice of the existence of clusters. Consequently, a correlation analysis was carried out, with all coffee samples together and also analyzing the pooled within groups correlation, taking *arabica* and *robusta* samples as two distinct groups. The results are summarized in Table 1.

When coffee varieties are analyzed separately, the correlation between trigonelline and caffeine is not significant, and a significant negative correlation between nicotinic acid and caffeine is observed.

Using more powerful, nonparametric statistics, which overcome the high variations observed within each coffee group, such as the Spearman's Rho and Kendall's Tau, results are obtained as represented in Table 2 were found. Considering overall correlation, significant negative correlation between trigonelline and caffeine are observed, but also a negative correlation between caf-

feine and nicotinic acid becomes apparent even when all samples are considered together. Analyzing coffee varieties separately, only negative correlation between nicotinic acid and caffeine are significant, in accordance with the linear correlation results.

Therefore it seems that the negative correlation between trigonelline and caffeine is only expressing general differences between the levels of these substances in *arabica* and *robusta* coffees, i.e., is caused by the fact that caffeine is higher in *robusta* samples while trigonelline is lower. However, when the pooled within groups correlation are analyzed, one can see that there is no correlation between these two components. An important feature of these results is the negative correlation between nicotinic acid and caffeine, which can be observed within each coffee variety and also when all data is taken together.

CONCLUSIONS

From the results obtained we can concluded that trigonelline and caffeine can be used in the discrimination of pure roasted coffees. The results show that nicotinic acid cannot be used in the discrimination of these two coffee varieties contradicting what was initially thought (Macrae, 1989). Neither trigonelline nor caffeine can be used for identification of the geographical origin of the roasted coffee. As the nature of the green beans' processing employed may affect the final concentration in the roasted product, further studies are recommended to confirm this possibility.

The conjunction of these chemical parameters may be helpful in the identification of coffee varieties, and the methodology proposed is appropriate for routine analysis in the coffee industry.

ACKNOWLEDGMENT

S. Casal is indebted to Subprograma Ciência e Tecnologia do 2° Quadro Comunitário de Apoio (BD/9580/96).

LITERATURE CITED

- Aishima, T. Aroma Discrimination by Pattern Recognition Analysis of Responses from Semiconductor Gas Sensor Array. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 752–756.
- Andrade, P. B.; Leitão, R.; Seabra, R. M.; Oliveira, M. B.; Ferreira, M. A. 3,4-Dimethoxycinnamic acid levels as a tool for differentiation of *Coffea canephora* var. *robusta* and *Coffea arabica*. *Food Chem.* **1997**, *61* (4), 511–514.
- Bicchi, C. P.; Panero, O. M.; Pellegrino, G. M.; Vanni, A. C. Characterization of Roasted Coffee and Coffee Beverages by Solid-Phase Microextraction – Gas Chromatography and

- Principal Component Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45* (12), 4680–4686.
- Bicchi, C. P.; Binello, A.; Pellegrino, G. M.; Vanni, A. C. Characterization of Green and Roasted Coffees through the Chlorogenic Acid Fraction by HPLC–UV and Principal Component Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1549–1555.
- Briandet, R.; Kemsley, E. K.; Wilson, R. H. Discrimination of *Arabica* and *Robusta* in Instant Coffee by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 170–174.
- Casal, S.; Oliveira, M. B.; Ferreira, M. A. Development of an HPLC/Diode-array detector method for simultaneous determination of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee. *J. Liq. Chrom., Relat. Technol.* **1998**, *21* (20), 3187–3195.
- Clifford, M. N. Chemical and Physical aspects of green coffee and coffee products. In *Coffee: botany, biochemistry, and production of beans and beverage*; Clifford, M. N., Wilson, K. C., Eds.; Croom Helm: Beckenham, U.K., 1987; pp 305–374.
- Clifford, M. N. Chlorogenic acids. In *Coffee: Chemistry*; Clarke, R. J., Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science Publishers: London, 1989; Vol. 1, pp 153–202.
- Conover, W. J. *Practical Nonparametric Statistics*; John Wiley & Sons: New York, 1980.
- Correia, A. M. N. G.; Leitão, M. C. A.; Clifford, M. N. Caffeoyl-tyrosine and Angola II as characteristic markers for Angolan *robusta* coffees. *Food Chem.* **1995**, *53*, 309–313.
- Downey, G.; Briandet, R.; Wilson, R. H.; Kemsley, E. K. Near- and Mid-Infrared Spectroscopies in Food Authentication: Coffee Varietal Identification. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 4357–4361.
- Folstar, P. Lipids. In *Coffee: Chemistry*; Clarke, R. J., Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science Publishers: London, 1989; Vol. 1, pp 203–222.
- Kemsley, E. K.; Ruault, S.; Wilson, R. H. Discrimination between *Coffea arabica* and *Coffea canephora* variant *robusta* beans using infrared spectroscopy. *Food Chem.* **1995**, *54*, 321–326.
- Macrae, R. Nitrogenous components. In *Coffee: Chemistry*; Clarke, R. J., Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science Publishers: London, 1989; Vol. 1, pp 115–137.
- Mardia, Kent and Bibby. *Multivariate Analyses*; Academic Press: London, 1979.
- Martín, M. J.; Pablos, F.; González, A. G. Application of pattern recognition to the discrimination of roasted coffees. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *320*, 191–197.
- Prodolliet, J. Authenticity of coffee. In *Food Authentication*; Ashurst, P. R., Dennis, M. J., Eds.; Blackie Academic & Professional: London, 1996; pp 304–338.
- Speer, K.; Tewis, R.; Montag, A. 16-O-methylcafestol. A quality indicator for coffee. In *14th Colloque Scientifique International sur le Café-San Francisco*; ASIC: Paris, 1991; pp 237–244.

Received for review June 28, 1999. Revised manuscript received May 11, 2000. Accepted May 13, 2000.

JF990702B



Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section

HPLC/diode-array applied to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee

S. Casal, M. Beatriz Oliveira*, Margarida A. Ferreira

CEQUP/Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 4050-047 Porto, Portugal

Received 9 April 1999; received in revised form; accepted 9 September 1999

Abstract

A simultaneous determination of trigonelline, nicotinic acid and caffeine was performed in samples of *arabica* and *robusta* coffees, before and after roasting at either different temperatures (160–240°C) or different periods of time exposures, in order to study their thermal degradation. A reverse-phase HPLC/Diode-array detector method was used. The results were compared with a model dry system roast of the compounds under study, individually and in mixture. The loss of trigonelline was strongly dependent upon the degree of roast and was associated with the formation of nicotinic acid. A slight decrease in caffeine was verified in both species. This study showed diversified behavior of the compounds when in their native form or in an artificial mixture, eliciting the chemical environmental influence. Rate constants for the chemical reactions at 240°C were determined. © 2000 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: HPLC; Diode-array; Trigonelline; Nicotinic acid; Caffeine; Coffee

1. Introduction

Roasting is a time-temperature dependent process, whereby chemical changes are induced in the coffee beans. Different treatments in the roasting step modify the composition of the final product. Excessive temperature during roasting is known to cause undesirable chemical changes, especially at the bean surface requiring considerable control of the process and objective means for its quality control (Clarke, 1989; Clifford, 1985).

Several techniques have been reported for the control of the coffee roasting, namely trigonelline/nicotinic acid ratio (Stennert & Maier, 1996; Taguchi, Sakaguchi & Shimabayashi, 1985), chlorogenic acids (Trugo & Macrae, 1984), hydroxycinnamic acids (Casal et al., 1999), amino acids (Nehring & Maier, 1992), methylpyrazine (Hashim & Chaveron, 1996) and physicochemical properties (Ortolá, Londono, Gutiérrez & Chiralt, 1998; Nunes, Coimbra, Duarte & Delgado, 1997). Some of these parameters are also recognized as important features in the discrimination of coffee varieties (Andrade, Leitão, Seabra, Oliveira & Ferreira,

1997; Macrae, 1989; Martín, Pablos & González, 1996). However, there are few data available on the kinetics of the degradation process as a tool for the knowledge of the coffee roasting process.

The aim of this work was to simultaneously quantify three important nitrogenous components of coffee (trigonelline, nicotinic acid and caffeine), by a rapid and accurate HPLC method and to apply the analytical technique to the study of the influence of roasting on these products.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Trigonelline hydrochloride was purchased from Fluka (Neu-Ulm, Germany), nicotinic acid and caffeine were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other chemicals used were of analytical grade (Merck, Darmstadt).

2.2. Coffee thermal treatments and sample preparation

A *Coffea arabica* sample from Brazil and another of *Coffea canephora* var. *robusta* from the Ivory Coast

* Corresponding author.

E-mail address: bromato@ff.up.pt (M. Beatriz Oliveira).

were subjected to two different protocols of roasting in a WTC blinder (Tuttlingen, Germany) stove. The first protocol was carried out at constant time (15 min) and different temperatures, ranging from 140 to 240°C and the second one was performed at constant temperature (240°C) with variation of the exposure time (5–20 min).

All samples were grounded and screened through a 25-mesh sieve immediately before sample analyses and moisture determination. Moisture was determined by drying the samples at 103°C until constant weight. A 2-g portion of grounded coffee was extracted with a total of 100 ml boiling water (Casal, Oliveira & Ferreira, 1998) and an aliquot of this solution was filtered through a 0.2 µm pore size membrane (Schleicher & Schuell, Germany) into an appropriate vial for use in the auto-sampler without further dilutions. All determinations were performed in duplicate.

2.3. Pyrolysis of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in dry model systems

Trigonelline, nicotinic acid and caffeine (10.0 mg each) and a mixture which contained the proportions usually present in coffee (7.5 mg of trigonelline, 0.6 mg of nicotinic acid and 15.0 mg of caffeine) were placed in sealed silanised vials (Supelco, Bellefont, PA, USA) and heated at 240°C for 5, 8, 12, 15 and 20 min, in the same stove used for roasting the coffee. The vials were left standing to attain room temperature and the residues were dissolved in 100 ml of water. The solutions were filtered (0.2 µm) and directly analyzed by HPLC.

2.4. HPLC analysis

HPLC was carried out using two PU-980 Intelligent Pumps, a HG-980-30 Solvent Mixing Module, an AS-950 Intelligent Sampler and a MD-910 Multiwavelength Detector all from Jasco Corporation (Tokyo, Japan). A Spherisorb S5 ODS2 cartridge column (0.46 × 25.0 cm) was used coupled to a guard cartridge µBondapak C18 (10 µm particle size) from Waters Assoc. (Milford, MA, USA). The injection volume was 20 µl for all analyses performed.

A solvent gradient was formed with phosphate buffer 0.1 M (pH 4.0) and methanol (Casal et al., 1998). The eluents were filtered and degassed under reduced pressure in an ultrasonic bath Sonorex RK 100 (Bandelin electronic, Germany).

Quantification was carried out using calibration curves obtained with standard solutions of trigonelline, nicotinic acid and caffeine at 268, 264 and 276 nm, respectively, as recently reported (Casal et al., 1998). The determinations were performed in the linear range within 0.15–450, 0.10–500, and 0.05–500 µg ml⁻¹ for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine, respectively.

3. Results and discussion

The characteristics of the coffee samples used in this study are represented in Table 1. Fig. 1 shows a typical chromatogram obtained with a green *arabica* coffee sample (A) and after roasting at 240°C for 15 min (B). Although many interfering substances were present in the matrix, which complicated the chromatograms, the peaks were detected and identified by their UV spectra and by comparison with authentic standards.

3.1. Effect of roast temperature treatments in coffee

The results of the roasting trial conducted at constant time (15 min) and several temperatures are presented in Table 2. Trigonelline and caffeine contents were significantly different ($p < 0.99$) in the two species, both in green and roasted states. *Robusta* coffee beans contained the highest concentration of caffeine compared with *arabica*, while *arabica* was richer in trigonelline than the former, which confirms the ability of caffeine and trigonelline to discriminate these two coffee varieties. Furthermore, the values observed were in good agreement with those reported in the literature (Clifford, 1985; De Maria et al., 1995; Macrae, 1989; Martín, Pablos, Bello & González, 1997; Stennert & Maier, 1993; Stennert & Maier, 1994; Stennert & Maier, 1996; Taguchi et al., 1985; Trugo, Maria & Werneck, 1991) where they were measured by diversified methodologies. The trigonelline degradation increased after 200°C and only 5% remained in *arabica* and 15% in *robusta* at 240°C. The nicotinic acid levels increased more than 500% in both species and the caffeine levels slightly decreased.

3.2. Effect of roasting time in coffee and model dry systems

The evolution of the roast performed at constant temperature (240°C) with variation of the exposure time

Table 1
Roasting characteristics of the coffees used

Roasting temperature (°C)	Roasting time (min)	<i>Arabica</i>	<i>Robusta</i>
		Total roast loss (%) ^a	
140	15	5.0	7.6
160	15	7.8	15.8
180	15	10.0	18.0
200	15	15.5	22.7
220	15	17.7	24.1
240	5	10.8	10.1
240	8	11.9	11.8
240	12	17.3	18.9
240	15	22.6	22.8
240	20	26.1	27.9

^a Dry matter basis.

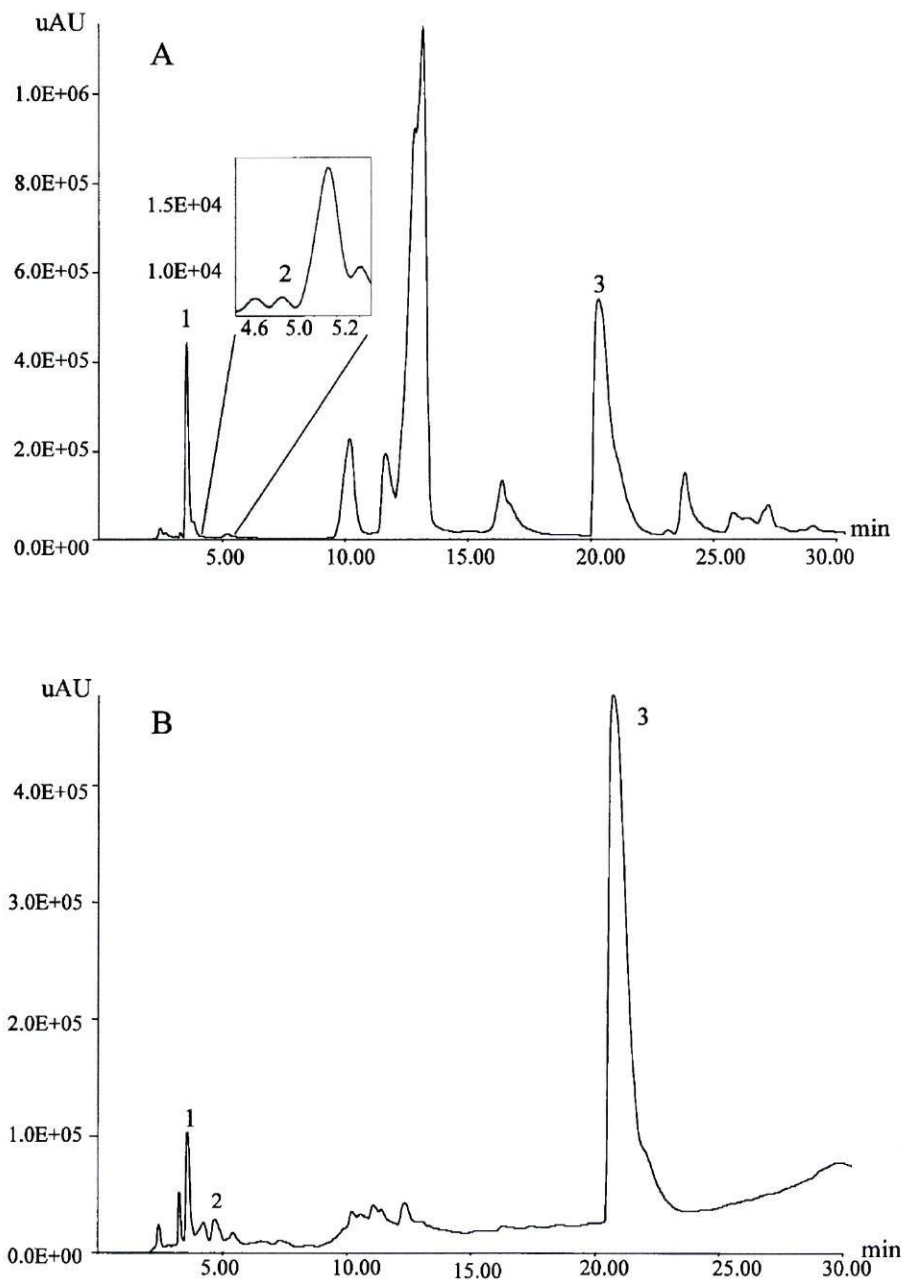


Fig. 1. Chromatograms of green *arabica* coffee (A) before roast and (B) after roast at 240°C for 15 min (recorded at 265 nm). Peaks: 1 = trigonelline; 2 = nicotinic acid; 3 = caffeine.

is reported simultaneously with the dry model system roasts of the pure standards (individually or in mixture). Results are reported as percentage of the initial content after being corrected for a dry green bean basis.

Native trigonelline (Fig. 2) was almost completely degraded in both varieties although with a higher degradation rate in *arabica* than in *robusta*. When a mixture of

standards was treated under the same conditions this compound presented a similar behavior to that of its native form in coffee, although the degradation was initiated immediately. Finally, isolated trigonelline showed a similar degradation pattern but with a smaller rate.

The nicotinic acid content increased after 8 min of heating and continued up to 15 min. For an exposure

Table 2
Results (mean ± sd in mg/kg dmb) for the roast program performed at different temperatures and constant time (15 min)

	Trigonelline		Nicotinic acid		Caffeine	
	Arabica	Robusta	Arabica	Robusta	Arabica	Robusta
Green	8.91	6.32	0.03	0.02	12.36	20.84
140°C	8.47	6.37	0.06	0.06	14.37	22.12
160°C	8.31	5.86	0.08	0.05	15.18	21.71
180°C	8.29	5.78	0.06	0.04	13.57	19.81
200°C	7.80	5.43	0.07	0.06	13.87	19.93
220°C	5.57	4.20	0.13	0.06	12.95	19.88
240°C	0.49	0.97	0.17	0.13	10.96	19.25

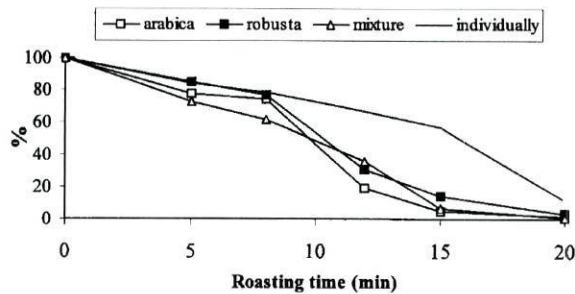


Fig. 2. Experimental influence of the time of roast (at 240°C) on the concentrations of trigonelline in coffee and model systems.

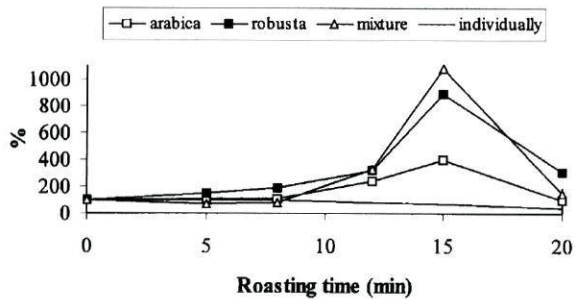


Fig. 3. Experimental influence of the time of roast (at 240°C) on the concentrations of nicotinic acid in coffee and model systems.

time greater than 15 min a gradual decrease of the nicotinic acid content was observed. The formation of nicotinic acid in the mixture of standards corresponded to a tenfold increase of its initial content. This fact clearly demonstrates that other compounds exist in coffee matrix, which avoid demethylation of trigonelline into nicotinic acid and probably allow the production of other compounds. Moreover the observation that this thermodegradation reaction took place upon 8 min of heat exposure (or after 200°C) indicates that some time is needed for the coffee bean to reach the convenient

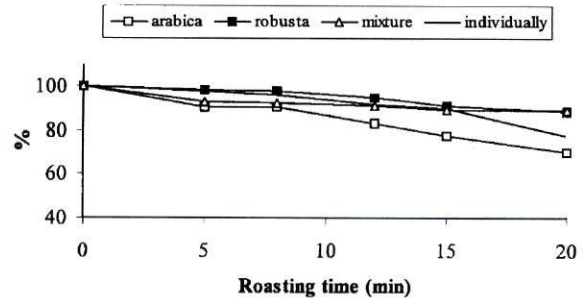


Fig. 4. Experimental influence of the time of roast (at 240°C) on the concentrations of caffeine in coffee and model systems.

Table 3
Rate constants (g/kg/min) for the thermochemical reactions in roasted coffee at 240°C

	Arabica		Robusta	
	K	R ²	K	R ²
Trigonelline	-0.344	0.995	-0.262	0.996
Nicotinic acid	0.186	0.998	0.214	0.928
Caffeine	-0.231	0.997	-0.161	0.974

energy for starting the chemical degradation reactions. According to Macrae (1989) the roasting procedure of coffee involves an initial step during which the contained water in beans is removed. After such step the real roasting is initiated only when an energetic level of about 60–100 kcal per kilo of coffee is attained, which occurs at about 200°C (activation time). Because industrial roasting is made by revolving the beans in a container with circulation of hot gases, the time necessary to achieve this temperature is shorter than in our laboratorial trials. Caffeine (Fig. 4), the third nitrogenic compound included in our study, showed a slight decrease after 10 min of roasting. It would be expected that caffeine sublimation might have occurred to a higher extent when its sublimation temperature was reached (185°C). As Macrae (1989) concluded, this observation should be related with porosity and the internal pressure created within the beans that may cause some difficulties for caffeine sublimation. Nevertheless, in the standard mixture, where caffeine is probably free of chemical and physical linkages, a similar gradual decrease of its content was also observed.

By applying linear regression analyses on the concentration (C-C0 in g kg⁻¹) in coffee versus time data (5–20 min), the constant rates at 240°C were calculated from the slope of linear regression analyses and were assumed to be first-order for trigonelline and nicotinic and zero-order for caffeine. The results are reported in Table 3.

4. Conclusions

The results indicate that the technique proposed herein allows a simultaneous study of the roasting evolution (trigonelline and nicotinic acid contents) and discrimination of varieties (trigonelline and caffeine contents).

The study showed diversified behaviour of these compounds when found in their native form or in an artificial mixture, eliciting the chemical environmental influence.

Acknowledgements

This work was partially supported by the JNICT (National Joint of Scientific and Technological Research) (project PBIC/C/TPR/2565/95) and by the Sub-program of Science and Technology — 2nd Community support board (BD/9580/96) which is gratefully acknowledge.

References

- Andrade, P. B., Leitão, R., Scabra, R. M., Oliveira, M. B., & Ferreira, M.A. (1997). 3,4-Dimethoxycinnamic acid levels as a tool for differentiation of *Coffea canephora* var. *robusta* and *Coffea arabica*. *Food Chem.*, 61(4), 511–514.
- Casal, S., Andrade, P. B., Oliveira, M. B., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., & Ferreira, M. A. (1999). Analysis of hydroxycinnamic acids of coffee: a comparison of high performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 22(4), 513–521.
- Casal, S., Oliveira, M. B., & Ferreira, M. A. (1998). Development of an HPLC/diode-array detector method for simultaneous determination of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 21(20), 3187–3195.
- Clarke, R. J. (1989). Roasting and grinding. In R. J. Clarke, & R. Macrae, *Coffee: technology*, Vol. 2 (pp. 73–107). London: Elsevier Applied Science Publishers Ltd.
- Clifford, M. N. (1985). Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. In M. N. Clifford, & K. C. Wilson, *Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage* (pp. 305–374). London: Croom Helm Publishers Ltd.
- De Maria, C. A. B., Trugo, L. C., & Moreira, R. F.A (1995). Simultaneous determination of total chlorogenic acid, trigonelline and caffeine in green coffee samples by high performance gel filtration chromatography. *Food Chem.*, 52, 447–449.
- Hashim, L., & Chaveron, H. (1996). Use of methylpyrazine ratios to monitor the coffee roasting. *Food Research International*, 28(6), 619–623.
- Macrae, R. (1989). Nitrogenous components. In R. J. Clarke, & R. Macrae, *Coffee: chemistry*, Vol. 1 (pp. 115–152). London: Elsevier Applied Science Publishers Ltd.
- Martín, M. J., Pablos, F., Bello, M. A., & González, A. G. (1997). Determination of Trigonelline in green and roasted coffee from single column ionic chromatography. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 357, 357–358.
- Martín, M. J., Pablos, F., & González, A. G. (1996). Application of pattern recognition to the discrimination of roasted coffees. *Anal. Chim. Acta*, 320, 191–197.
- Nehring, U. P., & Maier, H. G. (1992). Indirect determination of the degree of roast in coffee. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 195, 39–42.
- Nunes, M. F., Coimbra, M. A., Duarte, A. C., & Delgado, I. (1997). Foamability, foam stability, and chemical composition of espresso coffee as affected by the degree of roast. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3238–3243.
- Ortolá, M. D., Londono, L., Gutiérrez, C. L., & Chiralt, A. (1998). Influence of roasting temperature on physicochemical properties of different coffees. *Food Sci. and Technol. Int.*, 4, 59–66.
- Stennert, A., & Maier, H. G. (1993). Trigonelline in coffee: I. Comparison of thin-layer with high-performance chromatography. Simultaneous determination of caffeine. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 196, 430–434.
- Stennert, A., & Maier, H. G. (1994). Trigonelline in coffee: II. Content of green, roasted and instant coffee. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 199, 198–200.
- Stennert, A., & Maier, H. G. (1996). Trigonelline in coffee: III. Calculation of the degree of roast by the trigonelline/nicotinic acid ratio. New gas-chromatographic method for nicotinic acid. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 202, 45–47.
- Taguchi, H., Sakaguchi, M., & Shimabayashi, Y. (1985). Trigonelline content in coffee beans and the thermal conversion of trigonelline into nicotinic acid during the roasting of coffee beans. *Agric. Biol. Chem.*, 49(12), 3467–3471.
- Trugo, L. C., De Maria, C. A. B., & Werneck, C. C. (1991). Simultaneous determination of total chlorogenic acid and caffeine in coffee by high performance gel filtration chromatography. *Food Chem.*, 42, 81–87.
- Trugo, L. C., & Macrae, R. (1984). A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chem.*, 15, 219–227.

Capítulo 5 – D,L-Aminoácidos

“Gas chromatographic quantification of amino acid enantiomers in food matrices by their N(O,S)-ethoxycarbonyl heptafluorobutyl ester derivatives”

in *J. Chromatogr. A.*, 866, 221-230, 2000

“Discrimination between Arabica and Robusta Species on the basis of their amino acid enantiomers”

in *J. Agric. Food Chem.*, 51, 6495-6501, 2003

“Roast effects on coffee amino acid enantiomers”

in *Food Chem.*, in press, 2004



ELSEVIER

Journal of Chromatography A, 866 (2000) 221–230

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

Gas chromatographic quantification of amino acid enantiomers in food matrices by their *N(O,S)*-ethoxycarbonyl heptafluorobutyl ester derivatives

Susana Casal, M. Beatriz Oliveira*, Margarida A. Ferreira

CEQUI/Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal

Received 1 July 1999; received in revised form 20 September 1999; accepted 13 October 1999

Abstract

Several amino acid enantiomer derivatives were prepared with different chloroformates and analysed by gas chromatography (GC) on a Chirasil-L-Val GC column, at a temperature below 200°C. Among them the *N(O,S)*-ethoxycarbonyl heptafluorobutyl esters presented the best compromise between short retention times, high yield responses and good resolution for almost all the tested amino acids. These derivatives proved to be suited for quantification of amino acids in aqueous media, with *L-p*-chlorophenylalanine as internal standard. The developed procedure was applied to several food samples for determination of their free amino acid profiles. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Enantiomer separation; Derivatisation, GC; Amino acids; *N(O,S)*-Ethoxycarbonyl heptafluorobutyl ester

1. Introduction

Over the past years, D-amino acids have been found in several species ranging from bacteria to humans [1–3], and significant amounts are commonly found in processed foods [3], especially in fermented beverages and dairy products, owing to the bacterial or starter cultures involved [4]. Heat treatments employed during food processing have also been shown to produce racemization of amino acids [3,5]. On account of their importance in biosciences and their possible nutritional implications, the occurrences, biological functions and metabolic fates of

D-amino acids are the subject of an increasing number of studies.

In the past, the determination of amino acid (AA) enantiomers was a difficult and time-consuming task. In the present decade, gas–liquid chromatography employing chiral stationary phase such as Chirasil-Val (*tert.*-butylamide-linked polydimethylsiloxane) [6,7] or others [8–12] and, more recently high-performance liquid chromatography (HPLC) using either diastereomeric derivatives [2,3,13–16] or chiral stationary phases [17,18], have enabled the determination of amino acid enantiomers. Gas chromatographic methods have some inherent advantages over HPLC methods; gas chromatography (GC) gives shorter analysis times and needs less expensive equipment and maintenance.

In contrast to the procedures used for HPLC, for

*Corresponding author. Tel.: +351-22-2078-902; fax: +351-22-2003-977.

E-mail address: bromato@ff.up.pt (M.B. Oliveira)

GC the amino acids must be converted into volatile derivatives, which are suitable for separation and elution within a reasonable time. Due to the wide differences in chemistry of the amino acid side chains it is not always easy to achieve reproducible sample preparation and derivatisation. The use of different internal standards is a common procedure and, among them, the enantiomer labelling technique has become increasingly popular with positive outcomes [19,20]. An additional problem in the analysis of amino acid enantiomers is the low thermal stability of the chiral stationary phases, with maximum operating temperatures allowed near 200°C. Therefore, the development of suitable derivatisation techniques for amino acids, in general, and their enantiomers, in particular, is considered to be a pre-requisite to obtain successful separations.

Although much progress has been made regarding this aspect, a procedure suitable for the quantitative and reproducible derivatisation of all amino acids in a single reaction remains to be developed. In general, the major derivatisation procedures for amino acid analysis by GC have been based on the preparation of *N(O)*-trifluoroacetyl alkyl esters, *N*-perfluoroacyl alkyl esters and *N*-alkyloxycarbonyl-trimethylsilyl derivatives [21–23]. These procedures involve such laborious multi-steps as the total removal of water from the sample and intense heating, from 60°C up to 150°C during 20 to 60 min. Temperature is known to cause conversions of amino acid enantiomers, hence a derivatisation method without heating steps would be the best approach for their analysis.

Another class of derivatives, the *N*-alkyloxycarbonyl alkyl esters, although time-consuming in the past have been, more recently, the subject of several improvements. In 1991, Hušek [24,25] described a fast method for GC analysis of amino acids in achiral phases with formation of *N*-ethoxycarbonyl ethyl esters. This derivatisation procedure took place within 1 min, at room temperature and used an aqueous medium. Wang et al. [26] extended this method to different chloroformates and alcohols in order to obtain a variety of different esters. An extensive review on chloroformates was recently published by Hušek [27]. To our knowledge, Abe et al. [28] were pioneers in applying this derivatisation procedure for the analysis of amino acid enantiomers; in their work they prepared methoxycarbonylmethyl and ethoxy-

carbonylethyl esters which were analysed in a Chirasil-Val column at maximum temperature of 220°C. In order to improve the volatility of the derivatives and achieve shorter analysis times and longer column lifetime, the same working group extended this derivatisation procedure by using 2,2,2-trifluoroethylchloroformate [29] and a wide variety of alcohols. Nevertheless, they assumed that the derivatisation method was more suitable for separation of enantiomers than for quantitative analysis.

The study presented herein investigated a more extended approach for the quantification of amino acid enantiomers using heptafluoro-1-butanol and a variety of chloroformates based on the knowledge that the introduction of fluoride atoms improves the volatility of the derivatives and that the flame ionisation detection (FID) response is proportional to the size of the alkyl group in the chloroformate [26]. Our objective was to achieve a reproducible derivatisation procedure suitable for separation of amino acid enantiomers in a Chirasil-L-Val column below 200°C, the maximum operating temperature suggested for this stationary phase, and for quantification of amino acid enantiomers.

2. Experimental

2.1. Chemicals

All the amino acids used in this study were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Ethylchloroformate (ECF), isobutyl chloroformate (iBuCF), ethanol (EtOH), isobutanol (iBuOH) and pyridine (Py) were from Fluka (Neu-Ulm, Germany) and 2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-butanol (HFB) was from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). All other chemicals were analytical grade.

2.2. Amino acid solutions

The D- and L-amino acid solutions were prepared separately. The L-amino acid solution contained 16 L-amino acids plus glycine, 4 µmol/ml each in 0.1 M HCl. The D-amino acid solution was prepared with the corresponding 16 D-amino acids at the same concentrations. Solutions of the individual amino

acids were also prepared in order to allow for their identification. L-*p*-Chlorophenylalanine and D-nor-leucine were used as internal standards and prepared at 16 $\mu\text{mol/ml}$ in 0.1 M HCl.

2.3. GC–FID

GC–FID analysis was carried out on a Chrompack CP-9001 gas chromatograph (Middelburg, The Netherlands).

The temperatures of the injector and detector were 250 and 280°C, respectively. Separation was achieved on a Chirasil-L-Val (25 m \times 0.25 mm I.D.) fused-silica capillary column with a 0.12 μm film coating (Chrompack), with a maximum operating temperature of 200°C. Helium was used as carrier gas at an initial inlet pressure of 60 kPa. Splitless injection was used with a purge time delay of 0.9 min.

The column temperature was 80°C, 1 min hold, and then programmed to increase at a rate of 5°C/min to 150°C, 7 min hold, and a further increase at a rate of 7°C/min to 200°C, 15 min hold. The carrier gas flow-rate was kept at 0.7 ml/min for the first 36 min and at this time it was increased to 1.7 ml/min until the end of the chromatographic run. This increase in the carrier gas flow-rate towards the end of the chromatographic run seems to avoid peak broadening and adsorption of the derivatives with high boiling points on the column.

2.4. Derivatisation procedure

Standard amino acid stock solutions (100 μl) plus internal standard solution (25 μl) were transferred into a silanised screw capped vial and 30 μl of alcohol–Py mixture (2:1, v/v) was added. After brief shaking 7 μl of the chloroformate was added. The vial was tightly capped, and vortexed for 15 s. Subsequently, 100 μl of chloroform and ca. 10 mg of NaCl were added and the vial thoroughly shaken for extraction of the derivatives into the organic layer. The vials were stored below 4°C until the chromatographic analysis. About 1.0 μl of the organic phase was injected directly into the gas chromatographic system.

2.5. Application to food samples

The derivatisation method was applied to the free amino acid determination in several food sample matrices following the classical approach of protein precipitation with acid solutions and ion-exchange clean-up [30]. For each matrix we have used the sample preparation methodology described by each of the authors as follow: UHT cow's milk, pasteurised fermented milk with *Bifibobacterium bifidum* and low-fat UHT yoghurt [31], black beer (4.3%, v/v) [32], balsamic vinegar from Modena (6°) [33] and *Coffea robusta* green coffee [34]. The internal standards were added to each sample proceeding any manipulation. The calibration curves were determined after subjecting standards to the same total procedure in order to compensate for the losses during protein precipitation, clean-up and derivatisation steps.

3. Results and discussion

In order to find the best amino acid derivatives, characterised by short retention times and high detectability, for separation in the Chirasil-L-Val column at a temperature below 200°C, several derivatives were prepared using a series of ethyl and isobutyl esters with the corresponding alcohols (EtOH and iBuOH) and HFB.

Table 1 shows the retention times (t_R) and the relative retention times (RRTs) of all L-amino acid derivatives. The RRTs were calculated in relation to the ECF–EtOH derivatives. The t_R values of all amino acids increased with the size of the alkyl group, both in the chloroformate and in the alcohol, and the introduction of fluoride atoms decreased, in general, the t_R . With the iBuCF–iBuOH derivatives the last peaks (associated with His, Lys, Tyr and Trp) presented intense peak broadening. Except for Glu, all the D-amino acid derivatives eluted faster in this column than the corresponding L-derivatives.

The FID response increased with the increasing sizes of the alkyl group and, was enhanced with the introduction of the fluoride atoms as represented in Table 2 for some L-AAs. As already described by Hušek in his initial work with chloroformates [24,25], not all the reactive groups in the amino acids

Table 1
Retention times and relative retention of L-amino acid derivatives^a

Amino acid	Derivative			
	ECF–EtOH	ECF–HFB	iBuCF–iBuOH	iBuCF–HFB
Ala	9.80	9.70 (0.99)	16.26 (1.66)	12.64 (1.29)
Gly	10.35	10.38 (1.00)	17.29 (1.67)	13.56 (1.31)
Val	11.82	11.01 (0.93)	18.42 (1.56)	13.82 (1.17)
Pro	13.12	11.37 (0.87)	21.10 (1.61)	14.34 (1.09)
Ile	13.72	12.66 (0.92)	21.74 (1.58)	15.40 (1.12)
Leu	14.25	13.42 (0.94)	22.80 (1.60)	16.23 (1.14)
Asp	19.10	16.06 (0.84)	27.21 (1.42)	19.86 (1.04)
Met	23.42	21.46 (0.92)	29.83 (1.27)	25.88 (1.11)
Fen	25.82	23.52 (0.91)	31.47 (1.22)	27.00 (1.05)
Cys	27.24	24.99 (0.92)	33.93 (1.25)	30.02 (1.10)
His	36.02	32.42 (0.90)	52.77 (1.47)	40.65 (1.13)
Lys	39.48	35.26 (0.89)	55.38 (1.40)	43.90 (1.11)
Tyr	41.40	37.42 (0.90)	59.88 (1.45)	46.96 (1.13)
Trp	55.20	46.23 (1.02)	67.46 (1.49)	54.10 (1.19)

^a The data represent retention time (min); data in parentheses represent relative retention time to ECF–EtOH.

are altered by the action of the reagent. The guanidine group of arginine remains untouched. For the determination of arginine an additional reaction step would be necessary or, alternatively, its conversion into ornithine by arginase before derivatisation. Asn and Gln are converted to Asp and Glu during derivatisation. In most cases, AAs with one hydroxyl group, namely serine or threonine, only gave one small peak that was difficult to identify in some occasions. In fact, serine had to be excluded from

our studies owing to its extremely low FID response. For all the other AAs the highest yields were achieved when HFB was used. Other perfluoroalcohols could also have been tested as well but it has been well established from studies by Wang et al. [26] that the detectability increases with the size of the perfluoroalcohol.

Table 3 shows the separation factors and resolution of all the derivatives tested. Except for proline, all eluted amino acids were almost completely

Table 2
Ratio of peak area^a of indicated L-amino acid derivatives relative to those prepared with EtCF–EtOH

Amino acid	Derivative		
	ECF–HFB/ECF–EtOH	iBuCF–iBuOH/ECF–EtOH	iBuCF–HFB/ECF–EtOH
Ala	2.5	1.9	2.6
Gly	2.5	2.9	ns ^b
Val	5.3	1.5	3.1
Pro	3.0	1.7	3.5
Ile	5.5	1.5	4.1
Leu	2.7	2.1	2.5
Asp	9.0	1.0	6.5
Met	4.8	2.7	3.8
Fen	4.5	2.8	6.0
His	2.0	1.2	6.5
Lys	1.3	1.4	1.1
Tyr	3.8	0.8	4.3
Trp	6.8	6.5	8.4

^a FID responses are the average of results from triplicate analyses.

^b ns: Not separated.

Table 3
Resolutions of amino acid derivatives

Amino acid	Derivative			
	ECF–EtOH	ECF–HFB	iBCF–iBOH	iBCF–HFB
Ala	1.74	1.50	2.92	2.27
Val	1.56	1.52	2.49	ns ^a
Ile	1.94	1.70	2.38	1.67
Leu	3.41	2.42	2.78	3.40
Asp	1.40	1.03	1.74	1.27
Met	3.51	2.83	2.31	7.34
Fen	2.26	1.91	1.95	1.93
His	3.01	1.70	2.45	1.90
Lys	1.80	1.81	1.65	1.91
Tyr	1.43	1.58	1.77	1.66
Trp	1.41	1.40	1.91	1.33

^a ns: Not separated.

separated into their enantiomeric pairs, especially those derivatives obtained from treatment with ECF. The iBuCF derivatives of the AAs eluted in the first half of the chromatographic run showed a better resolution than their ECF counterparts; unfortunately, owing to the already mentioned low vapour pressures of the AAs eluted in the second half of the chromatographic run, after the end of the temperature program, a broadening of their peaks was

observed. Temperatures higher than 200°C would be needed for the correct elution of these derivatives but these would lead to loss of stationary phase and decrease in column lifetime.

Based on these results the ECF–HFB derivatives [*N*(*O,S*)-ethoxycarbonyl heptafluorobutyl esters] were adopted for further studies, since they present the best compromise between short retention times, high yield responses and good resolution for almost

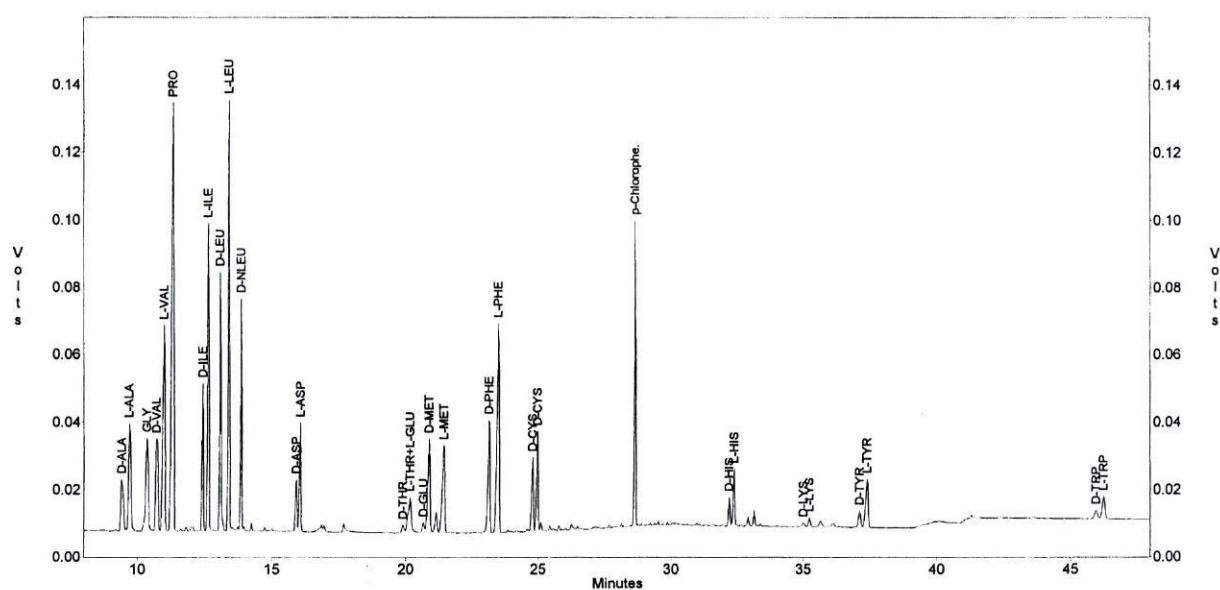


Fig. 1. Gas chromatogram of *N*(*O,S*)-ethoxycarbonyl heptafluorobutyl ester derivatives of standard L-amino acids (4 μ mol/ml each) and D-amino acids (2 μ mol/ml each) with *p*-chlorophenylalanine as internal standard (I.S.). For chromatographic conditions see Experimental.

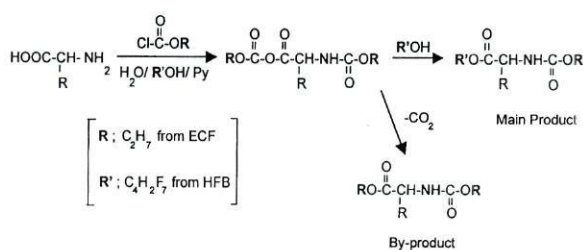


Fig. 2. Reaction mechanism of amino acids with ethylchloroformate and heptafluorobutanol.

all amino acids. A chromatogram of a mixture at 4 $\mu\text{mol/ml}$ of L-AAAs and at half concentration for D-AAAs is shown in Fig. 1.

3.1. *N(O,S)*-ethoxycarbonyl heptafluorobutyl ester derivatives

The reaction mechanism of an amino acid with alkyl ethylchloroformate in a reaction medium containing HFB can be described as depicted in Fig. 2 based on work by Wang et al. [26], where it is described in detail. The double derivative formation prevents the correct determination of the peak area and the rapid identification of the correct signal, especially when using a FID system. For the complete suppression of by-product formation the authors suggested that the electronegativity of the

alcohol must be larger than that of the chloroformate donor group.

In this particular case, when using HFB, it was found that the excess of chloroformate contributed to by-product formation. Thus, careful adjustment of the quantity of ethylchloroformate added was needed for derivatisation with single peaks, although in some cases complete elimination of the by-product was not achieved.

The yield of some amino acids can also be partially influenced by the water–alcohol ratio used in the derivatisation and the total HFB should be kept at ca. 16%. The pyridine proportion, provided that it was present in molar excess, did not influence the yields of the amino acid derivatives.

These observations clearly demonstrate that the proportion of the reagent used in the derivatisation procedure have to be stringently controlled.

The addition of NaCl slightly improved the relative molar response (RMR) of some amino acid derivatives, especially of the most hydrophilic. The addition of carbonate/hydrogencarbonate solutions, in order to eliminate the HCl dissolved in the chloroformic and hydroalcoholic layers did not improve the chromatographic baseline or the yields; instead a decline of the RMR was observed for some amino acids.

A tentative answer to the query on whether the reaction of the amino acids with chloroformates is

Table 4

Relative molar responses (RMRs) of *N(O,S)*-ethoxycarbonyl heptafluorobutyl ester derivatives with different internal standards

Amino acid	L- <i>p</i> -Chlorophelylalanine			D-Norleucine			Enantiomer labelling method RSD (%)
	RMR	SD ^a	RSD (%)	RMR	SD ^a	RSD (%)	
Ala	0.88	0.05	5.5	0.55	0.02	4.1	1.5
Gly	0.90	0.06	6.6	0.56	0.03	5.1	2.3
Val	1.49	0.06	3.8	1.00	0.03	3.1	2.2
Pro	1.82	0.07	4.0	1.21	0.04	3.6	3.2
Ile	1.52	0.09	5.9	1.02	0.05	4.5	5.0
Leu	1.56	0.11	7.0	1.01	0.02	2.0	2.3
Asp	0.82	0.05	6.3	0.49	0.04	8.4	1.0
Met	0.62	0.00	1.9	0.39	0.03	7.7	4.7
Phe	1.24	0.01	0.9	0.81	0.07	8.6	1.0
Cys	0.62	0.01	1.7	0.39	0.05	12.9	1.8
Hys	0.11	0.01	7.3	0.07	0.01	13.7	0.8
Lys	0.03	0.00	4.6	0.02	0.00	11.8	1.3
Tyr	0.34	0.00	5.5	0.21	0.02	11.4	0.7
Trp	0.14	0.01	4.2	0.08	0.01	13.7	1.3

^a $n=6$.

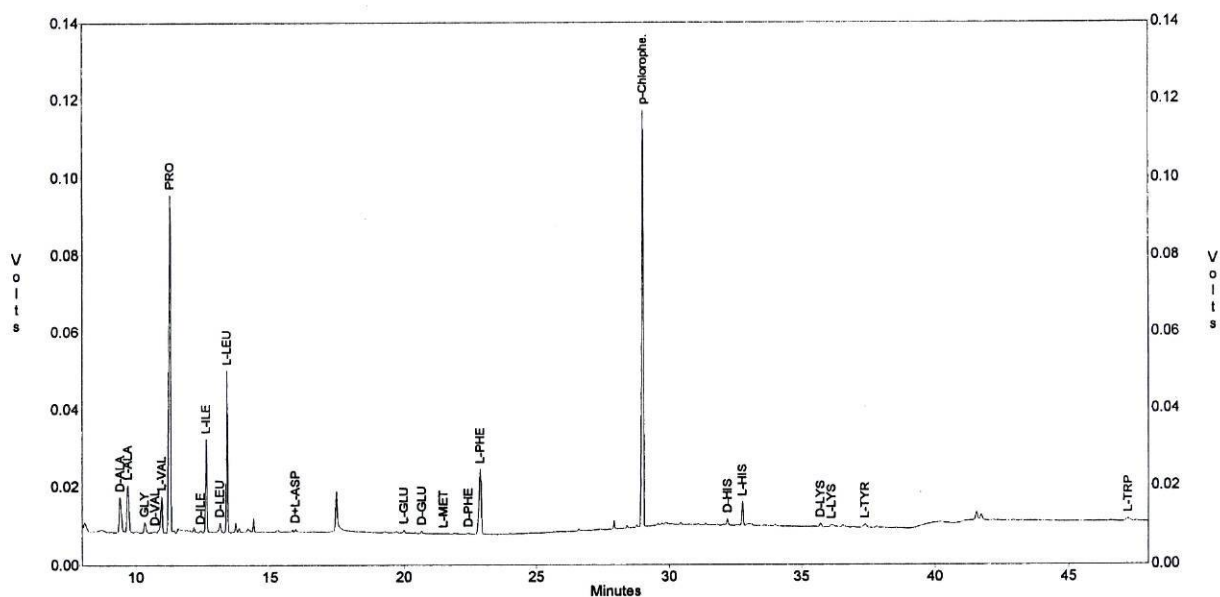


Fig. 3. Gas chromatogram of *N(O,S)*-ethoxycarbonyl heptafluorobutyl ester derivatives of a fermented milk sample. For chromatographic conditions see Experimental.

instantaneous [24,25,27] or, on the other hand, whether it is not rapidly completed [29], was pursued. In order to study the reaction time the relative peak area of some derivatives was determined from 0

up to 4 h upon the addition of ECF and before the extraction with chloroform derivatives. No significant alterations ($P < 0.05$) were found in the peak areas with the reaction time provided that the

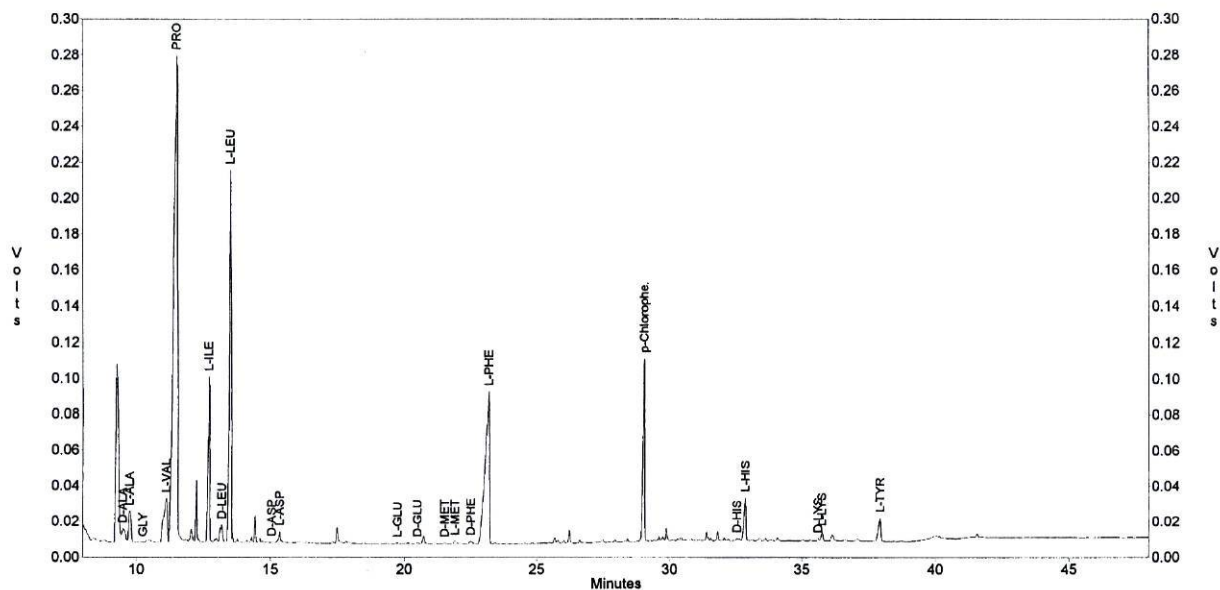


Fig. 4. Gas chromatogram of *N(O,S)*-ethoxycarbonyl heptafluorobutyl ester derivatives of a balsamic vinegar from Modena. For chromatographic conditions see Experimental.

Table 5
Free amino acid content in several food samples

Amino acid	UHT cow's milk		Fermented milk		Yoghurt		Black beer		Balsamic vinegar		Robusta green coffee	
	ρ (mg/100 ml)	ι (mg/100 ml)	ρ (mg/100 g)	ι (mg/100 g)	ρ (mg/100 g)	ι (mg/100 g)	ρ (mg/100 ml)	ι (mg/100 ml)	ρ (mg/100 ml)	ι (mg/100 ml)	ρ (mg/100 g)	ι (mg/100 g)
Alanine	0.01 (3.4%)	0.28	2.86 (45.9%)	3.37	0.62 (60.2%)	0.41	NC ^a	1.51	1.46 (28.3%)	3.70	–	38.60
Glycine	0.18	0.99	0.99	0.56	0.56	0.81	0.81	0.81	1.82	–	2.79	–
Valine	– ^b	0.29	0.04 (5.0%)	0.76	0.01 (2.9%)	0.33	0.02 (9.5%)	0.19	–	3.35	–	14.56
Proline	0.36	–	5.02	–	1.61	–	30.17	–	33.70	–	38.30	–
Isoleucine	–	0.16	0.02 (2.7%)	0.72	0.03 (20.0%)	0.12	0.01 (5.3%)	0.18	–	2.83	–	12.11
Leucine	0.04 (17.4%)	0.19	0.09 (9.6%)	0.85	0.04 (12.1%)	0.29	–	0.38	0.38 (5.2%)	6.98	–	17.03
Aspartic acid ^c	–	0.49	0.68 (43.9%)	0.87	0.74 (9.6%)	6.99	0.37 (20.9%)	1.40	0.54 (16.2%)	3.12	–	53.15
Glutamic acid ^c	–	4.67	0.12 (10.0%)	1.08	0.33 (44.6%)	0.41	0.21 (18.3%)	0.94	0.75 (37.7%)	1.24	–	NC
Methionine	–	0.36	–	0.10	–	0.08	0.01 (8.3%)	0.11	0.10 (16.1%)	0.52	–	–
Phenylalanine	–	0.08	0.01 (0.9%)	1.09	0.06 (15.8%)	0.32	0.04 (10.8%)	0.33	0.13 (1.1%)	11.38	–	35.38
Histidine	–	0.03	0.22 (26.8%)	0.60	0.03 (7.7%)	0.36	0.03 (12.0%)	0.22	0.09 (1.8%)	4.98	–	4.40
Lysine	–	1.46	1.16 (36.3%)	2.04	0.75 (29.3%)	1.81	–	0.69	1.77 (28.8%)	4.38	–	13.80
Tyrosine	–	0.25	–	0.04	0.01 (11.1%)	0.08	–	0.26	–	4.56	–	14.67
Tryptophan	–	–	–	0.07	–	0.05	0.08 (12.9%)	0.54	–	–	–	23.59
Free D-AAs	0.05	–	5.20	–	2.62	–	0.77	–	5.22	–	1.93	–
Total free AAs	8.85	–	22.80	–	16.04	–	38.50	–	87.78	–	270.31	–

^a NC=Not calculated due to incomplete separation from interference peak.

^b –=No significant amounts found.

^c Aspartic acid=Asp+Asn; glutamic acid=Glu+Gln.

proportion of the reagents were correct and in sufficient quantity, as described previously.

The prepared ECF–HFB derivatives were stable compounds. Their stability was tested over a period of 2 weeks with the chloroformic solution kept below 4°C in contact with the hydroalcoholic phase (upper phase). No significant ($P < 0.05$) alterations were observed.

The enantiomer conversion during derivatisation treatment and during storage period was also tested. After derivatisation of a solution of L-AAs no D-forms were observed. The same was observed after storage, for 2 weeks, under 4°C.

From the chromatographic point of view improvement of separation of glutamic acid, threonine and methionine pairs is not possible simultaneously as a better separation of one of those pairs is accompanied by worsening in separation of others.

The results for the RMRs for both *p*-chlorophenylalanine and norleucine are represented in Table 4 and the corresponding relative standard deviations (RSDs) were, on average, 4.5% and 7.5%, respectively. The inter-day reproducibility of derivative formation was somehow higher with RSDs near 12%. The RSDs were also calculated by the enantiomer labelling method and proved to be much smaller.

The derivatisation was examined for the linearity of the calibration plots using *p*-chlorophenylalanine as internal standard. The peak areas of AAs were measured and the peak-area ratios of AA against I.S. were calculated. A linear response relationship was obtained with the correlation coefficients being above 0.99 in the range 0.4–6.0 nmol of injected solution (three injections of five standard solutions). The minimum detectable amounts of the AAs to give a signal-to-noise ratio of 3 under our GC conditions were 0.04–4 ng injected.

3.2. Food samples

Typical chromatograms obtained with a fermented milk sample and with balsamic vinegar are represented in Figs. 3 and 4, respectively. The results of the free amino acid composition of all the samples studied are represented in Table 5. These are, in general, in good agreement with those reported in literature, although some authors only quantified the

D/L ratio. The dairy products results were comparable to those reported by Tamine and Robinson [35], Palla et al. [31] and Brückner and Hausch [3], the beer results with Brückner and Hausch [32,36], the balsamic vinegar results with Erbe and Brückner [33] and Chiano et al. [37] and the green coffee results with Arnold et al. [34] and Clarke and Macrae [38].

The separation of proline enantiomers is not possible with this type of derivatives but it would be of great importance in the analysis of balsamic vinegars, since D-Pro is directly related with their ageing. As their major AA, proline is also important in beers. Therefore it is suggested that, when the determination of proline enantiomers is in order other type of derivatives should be employed; the same reasoning may be applied for serine and threonine analysis.

4. Conclusions

A convenient and reliable method for the determination of amino acid enantiomers has been extensively developed. A significant advantage of the method presented herein is that the amino acid *N*(*O,S*)-ethoxycarbonyl heptafluorobutyl ester derivatives are rapidly prepared without the use of high temperature and are eluted below 200°C, with good resolutions. The peak response for threonine and serine is somehow low, especially for the latter.

The rapid derivatisation in aqueous media justifies this method suitability for routine amino acid profiling analysis and quantification. This method was successfully applied to various food samples in order to determine their free amino acid profiles. It is important to highlight that although food sample preparation is still time-consuming, the derivatisation step is significantly shorter.

Acknowledgements

S.C. acknowledges the support of the Sub-programa Ciência e Tecnologia do 2º Quadro Comunitário de Apoio for a grant (9580/96) and the precious help in preparing the revised manuscript provided by Dra. Ana Maria Gomes.

References

- [1] A. Schieber, H. Brückner, M. Rupp-Classen, W. Specht, S. Nowitzki-Grimm, H.-G. Classen, *J. Chromatogr. B* 691 (1997) 1.
- [2] E. Okuma, H. Abe, *J. Chromatogr. B* 660 (1994) 243.
- [3] H. Brückner, M. Hausch, in: *Chirality and Biological Activity*, Alan R. Liss, New York, 1990, p. 129.
- [4] H. Brückner, D. Becker, M. Lüpke, *Chirality* 5 (1993) 385.
- [5] M. Lüpke, H. Brückner, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 206 (1998) 323.
- [6] H. Frank, G.J. Nicholson, E. Sayer, *J. Chromatogr. Sci.* 15 (1977) 197.
- [7] B. Koppenhoefer, E. Bayer, in: F. Bruner (Ed.), *The Science of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1985.
- [8] W.A. König, R. Krebber, P. Mischnick, *J. High Resolut. Chromatogr.* 12 (1989) 732.
- [9] G. Palla, A. Dossena, R. Marchelli, *J. Chromatogr.* 349 (1985) 9.
- [10] S. Ōi, Y. Ochiai, S. Miyano, *Chem. Lett.* (1991) 1575.
- [11] J. Pfeiffer, V. Schurig, *J. Chromatogr. A* 840 (1999) 145.
- [12] N. Iki, F. Narumi, T. Suzuki, A. Sugawara, S. Miyano, *Chem. Lett.* (1998) 1065.
- [13] S. Einarsson, B. Josefsson, P. Moller, D. Sanchez, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1191.
- [14] Y. Nagata, K. Yamamoto, T. Shimojo, *J. Chromatogr.* 575 (1992) 147.
- [15] A. Hashimoto, T. Nishikawa, T. Oka, K. Takahashi, *J. Chromatogr.* 582 (1992) 41.
- [16] E. Itoh, Y. Nishida, Y. Togashi, H. Ohru, H. Meguro, *Anal. Sci.* 12 (1996) 551.
- [17] T. Lida, H. Matsunaga, T. Fukushima, T. Santa, H. Homma, K. Imai, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4463, and references cited therein.
- [18] H. Brückner, T. Westhauser, H. Godel, *J. Chromatogr. A* 711 (1995) 201.
- [19] H. Frank, G.J. Nicholson, E. Bayer, *J. Chromatogr.* 167 (1978) 187.
- [20] I. Abe, K. Nakamura, T. Toyonaga, Y. Kobara, T. Wasa, *Anal. Sci.*, Dec. 9 (1993) 775.
- [21] C.W. Gehrke, K.C. Kuo, R.W. Zumwalt, *Amino Acid Analysis by Gas Chromatography*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1987.
- [22] J. Drozd, in: *Chemical Derivatisation in Gas Chromatography*, *Journal of Chromatography Library*, Vol. 19, Elsevier, Amsterdam, 1991, p. 126, Chapter 5.
- [23] F.G. Kitson, B.S. Larsen, C.N. McEwen, in: *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*, Academic Press, San Diego, CA, 1996, Chapter 9, p. 87.
- [24] P. Hušek, *FEBS Lett.* 280 (1991) 354.
- [25] P. Hušek, *J. Chromatogr.* 552 (1991) 289.
- [26] J. Wang, Z.-H. Huang, D. Gage, J.T. Watson, *J. Chromatogr. A* 663 (1994) 71.
- [27] P. Hušek, *J. Chromatogr. B* 717 (1998) 57.
- [28] I. Abe, T. Nishiyama, T. Nakahara, *Anal. Sci.* 10 (1994) 501.
- [29] I. Abe, N. Fujimoto, T. Nishiyama, K. Terada, T. Nakahara, *J. Chromatogr. A* 722 (1996) 221.
- [30] V. Fábíán, M. Morvai, M. Pintér-Szakács, I. Molnár-Perl, *J. Chromatogr.* 553 (1991) 87.
- [31] G. Palla, R. Marchelli, A. Dossena, G. Casnati, *J. Chromatogr.* 475 (1989) 45.
- [32] H. Brückner, M. Hausch, *J. High Resolut. Chromatogr.* 12 (1989) 680.
- [33] T. Erbe, H. Brückner, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 207 (1998) 400.
- [34] U. Arnold, E. Ludwig, R. Kühn, U. Möchwitzer, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 199 (1994) 22.
- [35] A.Y. Tamine, R.K. Robinson, in: *Yoghurt: Science and Technology*, Pergamon Press, 1985, p. 315.
- [36] H. Brückner, M. Hausch, *Chromatographia* 28 (1989) 487.
- [37] E. Chiano, A. Caligiani, G. Palla, *Ital. J. Food Sci.* 4 (1998) 329.
- [38] R.J. Clarke, R. Macrae (Eds.), *Coffee: Chemistry*, Vol. 1, Elsevier, London, 1989, p. 137, Chapter 4.

Discrimination between Arabica and Robusta Coffee Species on the Basis of Their Amino Acid Enantiomers

SUSANA CASAL,^{*,†} M. RUI ALVES,[§] EULÁLIA MENDES,[†]
M. BEATRIZ P. P. OLIVEIRA,[†] AND MARGARIDA A. FERREIRA[†]

REQUIMTE, Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto,
R. Aníbal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal, and ESTG, Instituto Politécnico de Viana do Castelo,
Av. do Atlântico, Aptd. 574, 4900 Viana do Castelo, Portugal

This work reports the results for the composition of robusta and arabica coffee species in terms of their amino acid enantiomers in the green and roasted states. The analyses were conducted for the free amino acids, as well as for the amino acids obtained after acid hydrolysis. The amino acids were extracted/hydrolyzed and isolated by SPE on strong cation exchange columns, derivatized to their *N*-ethoxycarbonylheptafluorobutyl esters, and analyzed by gas chromatography/FID on a Chirasil L-Val column. Multivariate analyses applied to the results showed that the free amino acids can be used as a tool for discrimination between coffee species, with a special reference to L-glutamic acid, L-tryptophan, and pipercolic acid. There is also some evidence that these compounds can be used for discrimination between green coffees subjected to different postharvest processes. It is also shown that the amino acid levels observed after acid hydrolysis can be used for the same purposes, although displaying less discriminatory power.

KEYWORDS: Coffee; L- and D-amino acids; amino acid enantiomers; discriminant analysis; processing method

INTRODUCTION

Coffee is one of the most important international trade products. Among all of the known species, the most important are *Coffea arabica* L. (arabica coffee) and *C. canephora* Pierre (robusta coffee), which account, respectively, for about 75 and 24% of the total world coffee production. Besides their different chemical and organoleptic characteristics, these two species have very different commercial values, with the former attaining the highest market prices. For quality and economical reasons it is therefore very important to guarantee their authenticity (1).

Several studies have been conducted during the past decades in order to find chemical components that can be used as discriminators between different coffee species and as indicators of adulteration of coffee lots with beans of less valued species. More recently, interest has also been shown in applying these same principles to the discrimination of the geographical origin of coffees. It is important to note that such studies are not easy tasks because all vegetable products are very influenced by climate and local weather conditions, agronomical practices, and transport, storage, and distribution conditions, as well as initial or intermediate processing phases. For the time being the diterpene 16-*O*-methylcafestol is probably the best marker for

the presence of small amounts of robusta beans in arabica coffee, either green or after roasting (2). The assessment of geographical origin has been based essentially on the mineral composition, trace element profile, and multivariate stable isotope analysis (1, 3, 4), but no method has yet been claimed to be capable of carrying out such an assessment with no ambiguity.

Following studies on the amino acid composition of green coffees using several methodologies, pipercolic acid and some free amino acids (e.g., β -alanine) have been proposed as a contribution for dealing with problems related to the identification of the botanical and geographical origin of coffee beans (5, 6). Recent studies have also reported that the total concentration of free amino acids does not change significantly with the chemical reactions occurring during the harvest season and the postharvest processing steps, such as drying, fermentation, and storage (7, 8). However, during the roasting process, the minor free amino acid fraction, usually not exceeding 0.5% dry weight, is extensively degraded, and only vestigial amounts are present in the roasted coffee and subsequent brews (8), a fact that is usually faced as a limitation to the utility of free amino acids as authenticity indicators. These problems are not found in relation to the protein fraction, which is known to be more stable upon roasting and represents a major coffee fraction, corresponding to ~10% of its dry weight. However, the utilization of protein amino acids in the field of authenticity is also very limited, because they have been reported to exist in quite similar amounts in both species (9, 10).

* Author to whom correspondence should be addressed [fax (351) 222003977; e-mail sucasal@ff.up.pt].

[†] Universidade do Porto.

[§] Instituto Politécnico de Viana do Castelo.

The postharvest treatments applied to coffee beans constitute an additional important source of variation for the chemical and organoleptic coffee characteristics. Studies dealing with the identification of green coffee postharvest processing types (i.e., dry or wet processes) are scarce (7), and more information on this subject is therefore required. When compared, these two processing types are quite different: In the dry method, adopted mostly in Brazil and western Africa, the cherries are sun-dried with the pulp intact, for up to 4 weeks, producing the so-called "natural" coffees. In the wet processing method, the outer skin and part of the mucilage is mechanically eliminated and the remaining mucilage is hydrolyzed for 18–48 h, depending on ambient temperature and altitudes, either immersed in water (wet fermentation) or without it (dry fermentation). After washing, the beans are dried in the sun or by means of mechanical dryers. This method is usually used with arabica beans (except in Brazil), producing the "washed" or "mild" beans (9, 11, 12).

The majority of the studies on the total and free amino acid composition of coffee have focused on the L-amino acid enantiomers, but a recent report indicates that free D-amino acids are ubiquitous constituents of plants, although in low percentage values (13). Accordingly, the free and total D-amino acid contents in coffee have been the subject of recent investigations (14–16) that confirmed their presence in green beans and also indicated the existence of some effects of the roasting process (16) on the D-amino acids' profile, raising the question of the possible uses of these constituents in authenticity studies.

The present study was carried out to determine the composition of green and roasted coffees of arabica and robusta species in terms D- and L-amino acid enantiomers and to evaluate the opportunity of using these components in authenticity studies. The samples included in this study had different geographical origins and were known to have been subjected to different postharvest processing methods in the place of origin, and all were subjected to a standard industrial roasting procedure. The analyses were conducted for the free amino acids and also for the amino acids obtained after acid hydrolysis. This work represents a contribution to the discrimination of the most representative coffee species and provides a preliminary study for the assessment of the type of postharvest processing method applied to coffee beans (either wet or dry process), based on the D- and L-amino acids.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. The D- and L-amino acids were all of analytical grade from Sigma (St. Louis, MO) and included alanine (Ala), glycine (Gly), valine (Val), proline (Pro), leucine (Leu), isoleucine (Ile), aspartic acid (Asp), glutamic acid (Glu), methionine (Met), phenylalanine (Phe), lysine (Lys), ornithine (Orn), tyrosine (Tyr), and tryptophan (Trp). L-Pipecolic acid (Pip), γ -amino-*n*-butyric acid (GABA), and the internal standard L-*p*-chlorophenylalanine (IS) were also from Sigma. Ethylchloroformate and pyridine were from Fluka (Neu-Ulm, Germany), and 2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-butanol (HFB), 5-sulfosalicylic acid dihydrate (SSA), and methanesulfonic acid (MSA) were from Aldrich (Steinheim, Germany). All other chemicals were of analytical grade from several other suppliers.

The strong cation exchange columns used in the cleanup procedure were Extra-Sep-SCXD, 500 mg, 3 cm³ (Lida Manufacturing Corp., Kenosha, WI).

Coffee Samples. Coffee samples from both arabica and robusta species were studied. A local broker and industrial coffee roaster supplied all coffee samples, both green and roasted, and was able to confirm their botanical and geographical origin, as well as the general type of postharvest processing (dry/wet process). No further details were known on the samples' historical background. A standard method was used in the roasting procedure (160–220 °C, 14 min), corresponding

to a dark roast, with average organic losses of ~11% for the arabica samples and ~13% for the robusta ones (on a dry weight basis).

The total number of samples included in the study was equal to 30 green coffee samples plus the corresponding 30 roasted beans. Samples were labeled with a first character indicating the coffee species (A = arabica, R = robusta) and a second character indicating the postharvest processing type (D = dry, W = wet). These two characters were followed by a hyphen and another character for geographical origin (using the characters italicized in the country names presented below), and finally one figure indicating the sample number within each country. The countries of origin and the numbers of samples per country, indicated in parentheses, were, for robusta species, Ivory Coast (6), Angola (5), Uganda (3), Cameroon (2), Vietnam (2), and India (1); and, for arabica species, Brazil (5), Colombia (1), Costa Rica (2), Guatemala (1), Honduras (1), and Mexico (1). This sampling is representative of the coffees generally consumed in Portugal, usually for espresso blends.

Sample Preparation. Amino Acid Extraction. The free amino acid extraction was performed with a 2% SSA solution (1 g/50 mL) on previously defatted powdered samples with petroleum ether (17) and after the addition of the internal standard, L-*p*-chlorophenylalanine. For the total amino acid analysis the samples were hydrolyzed with 4 M MSA (150 mg/3 mL), under N₂, at 110 °C for 16 h on a Reacti-therm heating module (Pierce, Rockford, IL), and then diluted to 25 mL after the internal standard addition. All analyses were carried out in duplicate.

Cleanup. Coffee extracts (2 mL) were loaded into the SPE columns, after being diluted with water, to reduce the ionic strength, and the pH was adjusted to 2.2. Interferences were washed with water and the amino acids eluted with 4 M aqueous ammonia. The extracts were dried under a N₂ stream and kept below 0 °C until derivatization.

Derivatization Procedure. The dry residues were dissolved with 0.1 M HCl, transferred into silanized screw-cap vials (Supelco, Bellefonte, PA), and then derivatized using a mixture of HFB/pyridine followed by ethylchloroformate (18). The derivatives were extracted with chloroform and transferred to inserts adjustable to the liquid sampler vials. About 1.0 μ L was injected into the gas chromatographic system.

GC Analysis. Chiral discrimination of D- and L-amino acids was achieved by gas chromatography, carried out with a Chrompack CP 9001 instrument (Chrompack, Middelburg, The Netherlands) equipped with a flame ionization detector and an automatic liquid sampler (CP-9050, Chrompack). Separation was achieved on a Chirasil L-Val (25 m \times 0.25 mm i.d.) fused-silica capillary column with a 0.12 μ m film coating (Chrompack) with programmed temperature: increase from 80 °C (1 min hold) to 150 °C, at 5 °C/min (7 min hold), followed by an increase to 195 °C at 7 °C/min (15 min hold). The temperatures of the injector and detector were 250 and 280 °C, respectively, and splitless injection was used with a purge time delay of 0.8 min. Helium was used as the carrier gas at an initial inlet flow of 0.7 mL/min programmed to increase to 1.7 mL/min after 36 min (18).

The compounds were identified by their retention times in comparison with authentic standards. Quantification was based on the internal standard method using L-*p*-chlorophenylalanine.

Statistical Data Treatment. The precision of the total procedure was evaluated by the coefficient of variation of each free amino acid calculated on the basis of five repeated analyses of the same robusta green coffee. The accuracy of the method (percent recovery) was evaluated in triplicate using the same robusta green coffee spiked with three known standard amounts.

The complete data sets with the amino acid contents were analyzed by cluster analysis (CA), discriminant analysis (DA), and canonical variate analysis (CVA). CA was carried out using Ward's method with Euclidean distances (19) after variable standardization to mean zero and unit variance. For DA, three groups were taken into consideration: robusta dry process, arabica wet process, and arabica dry process. DA was carried out following standard algorithms (20) as implemented in the Statistica for Windows package. In all DA, different "F to enter" values were tried in order to select the minimum number of amino acids necessary for total discrimination between groups, that is, with no misclassifications of sample units. The reduced data values (with only the amino acids selected by DA) were further analyzed by CVA, which was carried out as implemented in the same statistical software.

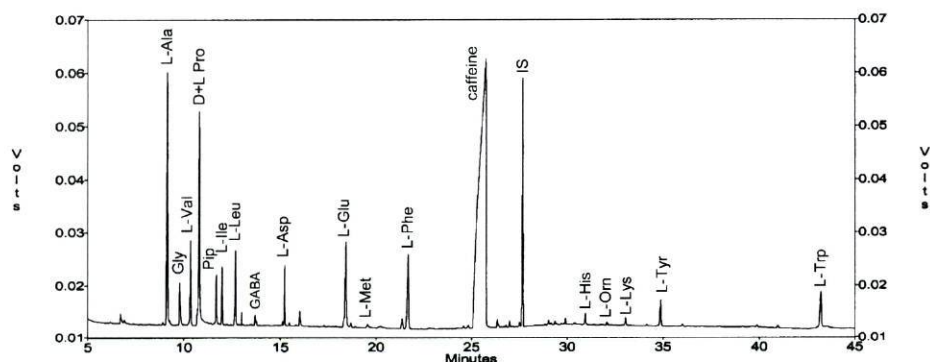


Figure 1. Free amino acids from an arabica green coffee from Brazil.

Table 1. Reproducibility of the Amino Acid Quantification Method

amino acid	precision CV% (<i>n</i> = 5)	recovery mean ^a (<i>n</i> = 3 × 3)	quantification limit (mg/kg)
Ala	0.7	98.9 (1.4)	0.4
Gly	1.1	97.9 (1.3)	0.4
Val	0.4	98.1 (0.6)	0.3
Pro	0.6	101.9 (1.7)	0.3
Pip	0.2	93.4 (1.4)	0.4
Ile	0.2	97.3 (1.6)	0.3
Leu	0.4	97.0 (1.2)	0.3
GABA	0.9	96.8 (1.1)	7.9
Asp	1.7	99.0 (1.6)	2.1
Glu	2.7	102.6 (3.1)	3.1
Met	0.7	98.7 (1.0)	0.8
Phe	0.4	97.4 (1.3)	0.3
His	0.3	94.6 (1.4)	2.3
Orn	0.2	91.6 (1.7)	12.0
Lys	0.8	90.5 (1.7)	1.3
Tyr	0.4	99.6 (1.0)	0.4
Trp	0.6	96.4 (0.7)	0.8

^a Standard deviation is shown in parentheses.

RESULTS AND DISCUSSION

Reproducibility of the Method. The method's precision gave results inferior to 3% for all of the compounds analyzed, as described in Table 1. Overall recoveries were >95% except for ornithine, lysine, and pipercolic acid, with recoveries of 91.6, 90.5, and 93.4%, respectively. These low recoveries are probably due to the very low amounts of these compounds present in the samples, which are close to the quantification limit of the technique used. Summary results are displayed in Table 1, where amino acids are listed following their chromatographic order of appearance.

Results for Free Amino Acids. A typical chromatogram of free amino acids obtained with an arabica green sample from Brazil (AD-B5) is shown in Figure 1. Whereas the green coffee samples presented values clearly falling within the method's detection range (see below), the roasted coffee samples showed only trace amounts of free amino acids, as expected (10), and their analysis was not performed.

The compositions of robusta and arabica green coffee samples, expressed in terms of their mean values and standard deviations over all samples of the same species, are presented in Table 2. Broadly speaking, the mean free amino acid compositions are very similar in both species, with L-Ala, Pro, L-Asp, L-Glu, L-Phe, and L-Trp as the most abundant amino acids. With the exception of L-Glu, which is higher in the arabica samples, robusta coffees presented higher contents of all amino acids. The mean concentrations of total free amino acids are not significantly different in both species: 3.65 ± 0.65 g/kg of

dry weight (dw) for robusta green samples (*n* = 19) and 3.83 ± 0.48 g/kg of dw for arabica (*n* = 11). In general, these results are in agreement with the values presented in the literature (8, 10, 21, 22), although most authors have reported slightly higher values for both arabica and robusta beans. The inability of this derivatization method to determine some amino acids, such as arginine, serine, and threonine, might contribute to these differences. Nevertheless, this method was chosen because the derivatization is performed at ambient temperature, avoiding racemization during the usual heating steps (18).

On the basis of the discussion presented in the Introduction about the consequences of the two most common types of postharvest processes on coffee composition, one would expect to find higher free amino acid levels in the wet-processed samples due to the naturally present coffee enzymes and the action of microorganisms. Nevertheless, a statistical difference in the sum of the individual free amino acid levels between the dry-processed arabicas (4.11 ± 0.36 g/kg of dw) and the wet-processed arabicas (3.51 ± 0.40 g/kg of dw) was not found in this work.

D-Amino acids were present in the green coffee samples in very low amounts (with values of <2 mg/kg of dw) except for Ala, Asp, Glu, Phe, and Lys that were slightly higher but <30 mg/kg. These values are in accordance with the 0.2–8% relative ratio to the L-amino acid as reported by Brückner (13) for plants in general. The total D-amino acid content was higher (*p* > 0.05) in the green robusta samples (46.6 ± 5.0 mg/kg of dw) than in the green arabica samples (30.7 ± 3.9 mg/kg of dw). One would also expect to find higher D-amino acid contents in the wet-processed samples, particularly D-Ala, D-Asp, and D-glu, naturally constituents of microbial cell walls (14, 23). Nevertheless, the wet-processed arabicas presented a lower D-amino acid content (24.4 ± 4.0 mg/kg of dw) than the dry-processed ones (36.0 ± 7.8 mg/kg), in accordance with the sum of the individual amino acids already discussed.

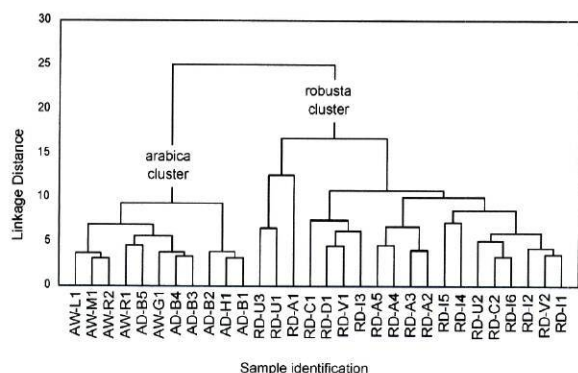
An explanation for these results might be the fact that during the long drying stage of the dry process some fermentation is inevitable (12). Furthermore, it is important to take into account that an additional washing step in the wet process is performed after fermentation, to remove the remaining mucilage, and any free D- or L-amino acids can be washed out at this stage. In accordance with this is the fact that the wet coffee samples are characterized by a smaller amount of total soluble solids (9).

Cluster analysis was carried out in order to search for natural groupings based on the D- and L-amino acid compositions. Because the variables in the initial data set were standardized to mean zero and unit variance, all amino acids, even those existing in very low amounts, have an equal opportunity to influence the results. Several linkage methods were tried, as is

Table 2. Mean Free Amino Acid Profiles of Robusta and Arabica Green Coffee Samples^a

amino acid	robusta (n = 19)			arabica (n = 11)		
	L (mg/kg of dw)	D (mg/kg of dw)	D (%)	L (mg/kg of dw)	D (mg/kg of dw)	D (%)
Ala	363.5 (56.8)	5.5 (4.6)	1.5	343.9 (74.2)	3.2 (1.2)	0.9
Gly ^b	69.5 (15.2)			53.7 (11.4)		
Val	120.6 (21.7)	0.6 (0.3)	0.5	100.1 (16.3)	0.6 (0.3)	0.6
Pro ^c	255.5 (71.0)			271.2 (60.1)		
Ile	71.7 (16.0)	1.1 (0.7)	1.6	65.6 (10.3)	0.6 (0.4)	0.9
Leu	98.7 (22.7)	0.8 (0.8)	0.8	80.0 (15.2)	0.4 (0.2)	0.5
Asp	539.0 (47.4)	14.0 (7.0)	3.1	515.3 (56.4)	11.0 (4.9)	2.1
Glu	924.2 (268.0)	12.7 (4.8)	1.3	1314.7 (118.2)	16.0 (6.2)	1.2
Met	15.7 (8.3)	nd		22.9 (7.5)	nd	
Phe	260.5 (75.2)	4.9 (3.8)	1.8	165.4 (32.0)	3.8 (3.1)	2.2
His	70.6 (20.0)	nd		64.7 (17.2)	nd	
Orn	34.4 (15.2)	nd		26.7 (9.8)	nd	
Lys	100.6 (43.0)	2.6 (1.6)	2.5	76.3 (14.6)	1.6 (0.8)	2.1
Tyr	124.4 (24.6)	1.9 (1.4)	1.5	69.2 (21.5)	1.5 (0.9)	2.1
Trp	337.7 (113.9)	nd		178.8 (61.0)	nd	
(Pip)	17.3 (9.8)			79.5 (17.5)		
(GABA)	844.9 (387.0)			620.9 (309.3)		
Σ	3288.7 (234.8)	49.7 (5.0)	1.4	3348.5 (331.4)	39.9 (3.9)	1.0

^a Standard deviation is shown in parentheses. %D = D/(D + L) × 100. nd = not detected; Σ = sum without Pip and GABA. ^b Nonchiral amino acid. ^c Proline enantiomers not separable; arginine, threonine, serine, and cysteine not determinable.

**Figure 2.** Dendrogram expressing the result of cluster analysis on the free amino acid content of green coffee samples.

usual with this type of analysis, and it was observed that Ward's linkage method provided results consistent with the experimental design. A dendrogram expressing the results of this cluster analysis is shown in **Figure 2**.

It is immediately obvious that there is a sharp distinction between robusta and arabica coffees, forming two distinct clusters, which means that the amino acids can provide a distinction between these two coffee species. In general terms, the distance linkages between members of each cluster (expressed as the length of the vertical lines joining isolated or clustered samples) fall within the same range, indicating an apparently similar dispersion for both clusters. However, because the robusta cluster has almost double the number of samples in comparison to the arabica cluster, it must be concluded that there is some evidence that dispersions may be higher for the arabica than for the robusta cluster, indicating higher homogeneity for the latter species in the amino acid composition.

On the basis of the same cluster analysis, a subdivision of the arabica cluster in a "wet process" cluster and a "dry process" cluster is not evident, although there is a clear distance between some of these samples, as is the case of samples AD-B1, AD-B2, and AD-H1, on the one hand, and AW-L1, AW-M1, and AW-R2, on the other. Further studies with an increased number of samples and with samples from the same origin and processed by different methods are necessary on this subject.

Cluster analysis shows how different samples or clusters of samples are from each other but does not inform on the reasons underlying such differences. To determine the most important free amino acids for discrimination between the three groups considered, a DA was carried out, using the forward method. Following this analysis, Pip, L-Ala, L-Asp, L-Trp, L-Glu, D-Glu, Pro, and L-His were selected as the most discriminatory compounds (listed by decreasing discriminatory power) among the three groups. These eight amino acids were then used for a canonical variate analysis, which enables a further study of amino acid discriminatory power, as well as an observation of the main structures in the data values. As there are three groups defined, CVA defines only two canonical variates, with a relative importance given by the corresponding eigen value. **Figure 3** shows the plot of the two canonical variates. It is seen that the first variate, with an eigenvalue equal to 31.02, represents the main structure (97% of the total variation in the data values) and explains the separation between robusta and arabica species. This separation is a consequence of the higher levels of L-Trp in robusta species and the higher levels of pipercolic acid and L-Glu in the arabica samples. Therefore, these three compounds can be used for species discrimination. The presence of some particular free amino acids has been proposed as a parameter for coffee type's differentiation (10). In fact, pipercolic acid was initially found only in arabica coffee (6), but as already reported by Arnold (21), it was also found in low amounts in robusta samples. On the basis of the definition rule imposed in this work (of zero misclassifications), pipercolic acid cannot be used alone for species discrimination.

The second variate, with an eigenvalue of 1.48 (roughly 3% of the total variation), shows that the second data structure is the discrimination between samples of the arabica species subjected to different postharvest treatments. Dry-processed arabicas are distinguished by higher levels of L-Ala, Pro, and L-His and lower levels of L-Tyr and D-Glu, emphasizing that these observations must be viewed with caution due to the reduced number of samples used, as already discussed.

Results of the Amino Acids after Hydrolysis. The mean amounts for each amino acid analyzed after hydrolysis of the green and roasted samples are presented in **Table 3**. A typical

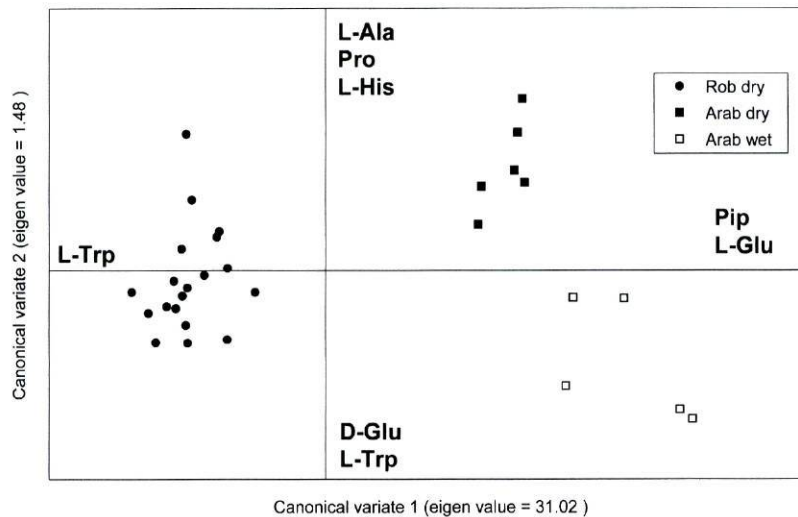


Figure 3. Canonical variate 1 versus 2 of free amino acid data.

Table 3. Mean Amino Acid Profiles of Robusta and Arabica Samples Obtained after Protein Hydrolysis^a

amino acid	robusta						arabica					
	green (n = 19)			roasted (n = 19)			green (n = 11)			roasted (n = 11)		
	L (g/100 g of dw)	D (g/100 g of dw)	D (%)	L (g/100 g of dw)	D (g/100 g of dw)	D (%)	L (g/100 g of dw)	D (g/100 g of dw)	D (%)	L (g/100 g of dw)	D (g/100 g of dw)	D (%)
Ala	0.425 (0.094)	0.007 (0.003)	1.7	0.313 (0.057)	0.040 (0.009)	11.3	0.325 (0.102)	0.004 (0.002)	1.2	0.317 (0.075)	0.029 (0.011)	8.3
Gly ^a	0.553 (0.179)			0.355 (0.056)			0.459 (0.198)			0.364 (0.066)		
Val	0.358 (0.110)	0.002 (0.002)	0.6	0.348 (0.050)	0.020 (0.005)	5.4	0.276 (0.047)	0.002 (0.001)	0.8	0.365 (0.094)	0.014 (0.007)	3.6
Pro ^b	0.709 (0.089)			0.682 (0.101)			0.650 (0.136)			0.708 (0.080)		
Ile	0.392 (0.089)	0.004 (0.005)	1.0	0.418 (0.061)	0.005 (0.002)	1.1	0.331 (0.045)	0.005 (0.005)	1.4	0.435 (0.078)	0.006 (0.004)	1.3
Leu	0.908 (0.121)	0.007 (0.003)	0.8	0.720 (0.089)	0.036 (0.007)	4.8	0.680 (0.121)	0.009 (0.004)	1.3	0.788 (0.118)	0.028 (0.010)	3.5
Asp	0.717 (0.223)	0.013 (0.011)	1.7	0.513 (0.100)	0.263 (0.098)	33.9	0.665 (0.179)	0.014 (0.009)	2.0	0.595 (0.202)	0.296 (0.098)	33.3
Glu	1.392 (0.293)	0.040 (0.029)	1.8	0.748 (0.126)	0.160 (0.023)	17.6	1.450 (0.215)	0.038 (0.008)	2.8	1.078 (0.250)	0.159 (0.078)	12.8
Met	0.038 (0.017)	0.002 (0.002)	4.9	0.048 (0.013)	0.007 (0.003)	12.3	0.037 (0.018)	0.002 (0.002)	5.7	0.053 (0.018)	0.06 (0.004)	10.4
Phe	0.480 (0.080)	0.004 (0.002)	0.8	0.315 (0.053)	0.022 (0.004)	6.4	0.416 (0.086)	0.004 (0.003)	0.9	0.335 (0.081)	0.015 (0.008)	4.4
His	0.074 (0.023)	nd		0.037 (0.013)	nd		0.052 (0.045)	nd		0.034 (0.021)	nd	
Orn	nd	nd		0.013 (0.012)	nd		nd	nd		0.011 (0.013)	nd	
Lys	0.605 (0.150)	0.008 (0.005)	1.3	0.081 (0.016)	0.010 (0.018)	11.3	0.550 (0.097)	0.006 (0.004)	1.0	0.111 (0.091)	0.004 (0.004)	3.2
Tyr	0.374 (0.170)	0.006 (0.006)	1.5	0.270 (0.094)	0.008 (0.006)	2.9	0.269 (0.055)	0.006 (0.007)	2.3	0.223 (0.062)	0.005 (0.005)	2.3
Σ	7.025 (0.632)	0.093 (0.030)	1.3	4.862 (0.414)	0.571 (0.108)	10.5	6.163 (0.486)	0.114 (0.040)	1.8	5.411 (0.617)	0.567 (0.143)	9.5

^a Standard deviation is shown in parentheses. %D = D/(D + L) × 100. nd = not detected. ^b Nonchiral amino acid. ^c Proline enantiomers not separable; arginine, threonine, serine, and cysteine not determinable.

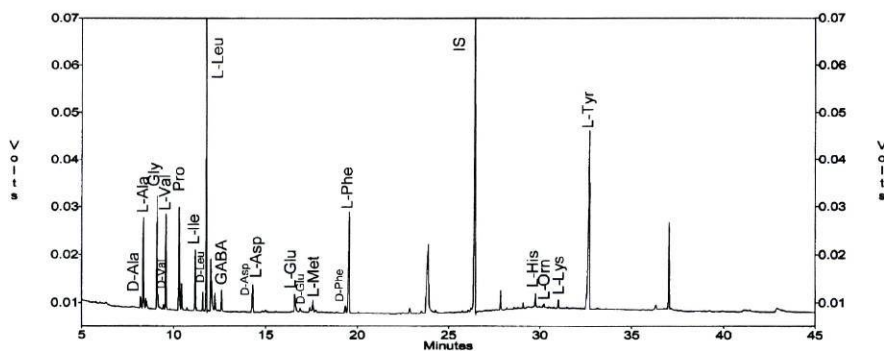


Figure 4. Amino acids from a roasted robusta coffee from Angola (RD-A1), obtained after protein hydrolysis.

chromatogram from a roasted coffee sample is presented in Figure 4.

As with the free amino acids, the robusta green coffees, in comparison with the arabica ones, presented higher levels of

all individual amino acids. Comparison of the sum of the individual amino acids showed significant differences ($p < 0.05$) between the two species: robusta samples showed a higher mean content (7.17 ± 0.65 g/100 g of dw) than arabica samples (5.91

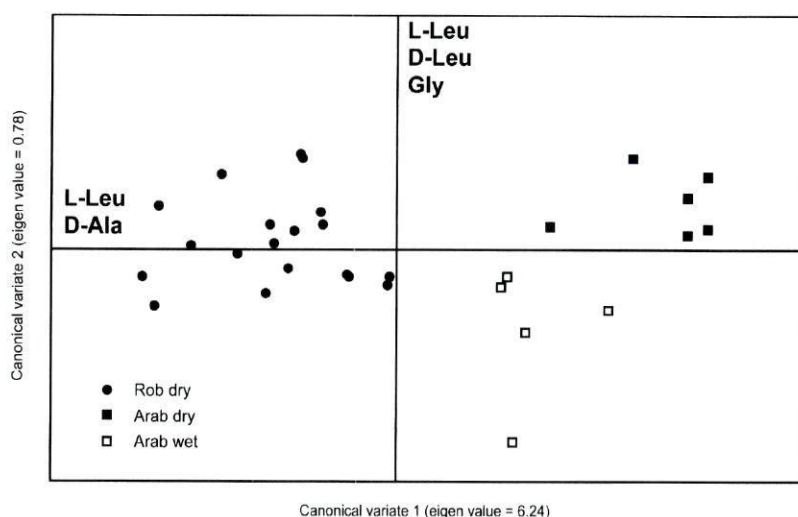


Figure 5. Canonical variate 1 versus 2, depicting the main relationships of amino acid data obtained after hydrolysis of green coffee.

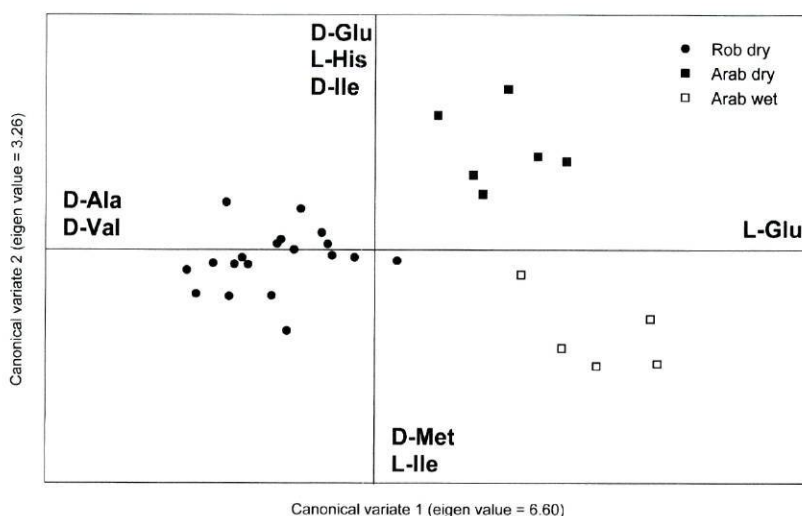


Figure 6. Canonical variate 1 versus 2, depicting the main relationships of amino acid data obtained after hydrolysis of roasted coffee.

± 0.68 g/100 g of dw), with no statistical differences between the dry-processed arabicas (6.03 ± 0.80 g/100 g of dw) and the wet (5.76 ± 0.56 g/100 g of dw).

The high temperatures achieved during the roasting process are expected to have a dramatic effect on the protein present in coffees (10), with reported protein losses in the range of 20–40% or more (9). In the robusta roasted coffee samples analyzed, the mean level of total amino acids was lower by ~20% when compared with the green samples, whereas in the arabica samples this effect could not be observed. Generally speaking, the levels of all individual amino acids decreased during the roasting process, with the exceptions of valine, proline, and isoleucine that remained constant or increased slightly due to the mass loss naturally occurring during roasting. Lysine, a particularly reactive amino acid, presented the highest degradation during roasting, with ~80% reduction in both coffee species. The D-amino acid content in roasted samples increased significantly ($p < 0.01$). The higher increase was observed for D-Asp, achieving a 50% D/L ratio after roast, followed by D-Glu, with 15%. All other D-forms presented ratios inferior to 10%.

As previously done for free amino acids, DA was first used for the selection of a reduced number of amino acids by their discriminatory power, followed by a CVA. For green samples, the selected amino acids listed by decreasing order of discriminatory power were L-Leu, D-Leu, D-Ala, D-Asp, D-Ile, D-Lys, Gly, L-Val, L-Ile, and D-Met. The results for the CVA are shown in **Figure 5**. Again, two main structures are visible. The first canonical variate shows that high levels of L-Leu and D-Ala characterize robusta green samples, a fact that represents 89% of the total variation in the results. The second canonical variate displays the remaining 11% of the information, with dry-processed arabica samples exhibiting higher levels of L-Leu and D-Leu, followed by Gly and D-Met. This last structure is less significant as shown by an eigenvalue of <1 , which reflects a lower discrimination between groups in comparison to the dispersion within both arabica groups. As a consequence, one must conclude that the total amino acids are still useful for discrimination between species in the green state, but the discrimination between wet and dry green arabica samples is doubtful.

For roasted coffee samples the amino acids selected by DA, by decreasing discriminatory power, were L-Glu, D-Ala, L-His,

Coffee Amino Acid Enantiomers

D-Ile, D-Glu, L-Ile, L-Asp, D-Val, D-Met, and Gly. **Figure 6** presents results from the CVA carried out with these amino acids. The first canonical variate, representing ~67% of the total information, is characterized by an opposition between D-Ala and D-Val (higher in robusta coffees) and L-Glu (higher in arabica coffees). The second canonical variate, resuming 33% of the total variation in the data values, can be explained by the existence of higher levels of D-Glu, L-His, and D-Ile in dry arabica samples, as opposed to the wet arabica samples, which show higher contents in D-Met and L-Ile. In this case, robusta and arabica coffee species are again well discriminated, whereas the distinction between dry- and wet-processed arabica samples is much more pronounced than with the green samples.

As a general conclusion one can say that D- and L-amino acids show high potential to be used as coffee species' discriminators. This includes discrimination with free and total amino acids, although the former seem to be more promising. Regarding the discrimination between coffees subjected to the two different postharvest treatments assayed, again the free amino acids proved to be superior.

LITERATURE CITED

- Prodollet, J. Authenticity of coffee. In *Food Authentication*; Ashurst, P. R., Dennis, M. J., Eds.; Blackie Academic and Professional/Chapman and Hall: London, U.K., 1996; Chapter 9, pp 304–338.
- Speer, K.; Kölling-Speer, I. Lipids. In *Coffee—Recent Developments*; Clarke, R. J., Vitzthum, O. G., Eds.; Blackwell Scientific: Oxford, U.K., 2001; Chapter 1c, pp 36–41.
- Weckerle, B.; Richling, E.; Heinrich, S.; Schreier, P. Origin assessment of green coffee (*Coffea arabica*) by multi-element stable isotope analysis of caffeine. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *374*, 886–890.
- Anderson, K. A.; Smith, B. W. Chemical profiling to differentiate geographic growing origins of coffee. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2068–2075.
- Pereira, A., Jr.; Pereira, M. M. Amino acids present in coffees. *Proceedings of the 5th Colloquium ASIC (Lisbon)*; ASIC: Paris, France, 1973; pp 85–90.
- Campos, L. S.; Rodrigues, J. M. L. Application of chromatographic methods of analysis to free amino acids in green coffees. *Proceedings of the 5th Colloquium ASIC (Lisbon)*; ASIC: Paris, France, 1973; pp 91–96.
- Arnold, U.; Ludwig, E. Analysis of free amino acids in green coffee beans. II. Changes of the amino acid content in arabica coffees in connection with post-harvest model treatment. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1996**, *203*, 379–384.
- Clifford, M. N. Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. In *Coffee: Botany, Biochemistry, and Production of Beans and Beverage*; Clifford, M. N., Wilson, K. C., Eds.; Croom Helm: Beckenham, U.K., 1985; Chapter 13, pp 305–374.
- Illy, A.; Viani, R. *Espresso Coffee—The Chemistry of Quality*; Academic Press: London, U.K., 1995.
- Macrae, R. Nitrogenous components. In *Coffee: Vol. 1 Chemistry*; Clarke, R. J., Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science Publishers: London, U.K., 1987; Chapter 5, pp 115–137.
- Clarke, R. J. Green coffee processing. In *Coffee: Botany, Biochemistry, and Production of Beans and Beverage*; Clifford, M. N., Wilson, K. C., Eds.; Croom Helm: Beckenham, U.K., 1985; Chapter 10, pp 230–250.
- Vincent, J.-C. Green coffee processing. In *Coffee: Vol. 2 Technology*; Clarke, R. J., Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science Publishers: London, U.K., 1987; Chapter 1, pp 1–33.
- Brückner, N.; Westhauser, T. Chromatographic determination of L- and D- amino acids in plants. *Amino Acids* **2003**, *24*, 43–55.
- Brückner, H.; Hausch, M. Gas chromatographic detection of D-amino acids as common constituents of fermented foods. *Chromatographia* **1989**, *28*, 487–492.
- Palla, G.; Marchelli, R.; Dossena, A.; Casnati, G. Occurrence of D-amino acids in food—Detection by capillary gas chromatography and by reversed-phase high-performance liquid chromatography with L-phenylalaninamides as chiral selectors. *J. Chromatogr. A* **1989**, *475*, 45–53.
- Nehring, U. P.; Maier, H. G. Indirect determination of the degree of roast in coffee. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *195*, 39–42.
- Casal, S.; Oliveira, M. B. P. P.; Alves, M. R.; Ferreira, M. A. Characterization of free amino acid enantiomers of Arabica and Robusta coffee species. *Proceedings of the 19th Colloquium ASIC (Trieste)*; ASIC: Paris, France, 2001.
- Casal, S.; Oliveira, M. B.; Ferreira, M. A. Gas chromatographic quantification of amino acid enantiomers in food matrices by their N(O,S)-ethoxycarbonyl heptafluorobutyl ester derivatives. *J. Chromatogr. A* **2000**, *866*, 221–230.
- Jacobson, T.; Gunderson, R. W. Applied cluster analysis. In *Statistical Procedures in Food Research*; Piggott, J. R., Ed.; Elsevier Applied Science: London, U.K., 1986.
- Mardia, K. V.; Kent, J. T.; Bibby, J. M. *Multivariate Analyses*; Academic Press: London, U.K., 1979.
- Arnold, U.; Ludwig, E.; Kühn, R.; Möschwitzer, U. Analysis of free amino acids in green coffee beans. I. Determination of amino acids after precolumn derivatization using 9-fluorenylmethylchloroformate. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1994**, *199*, 22–25.
- Oh, C.; Kim, J.; Kim, K.; Mabry, T. Rapid gas chromatographic screening of edible seeds, nuts and beans for non-protein and protein amino acids. *J. Chromatogr. A* **1995**, *708*, 131–141.
- Friedman, M. Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3457–3479.

Received for review April 7, 2003. Revised manuscript received August 9, 2003. Accepted August 14, 2003. S.C. is indebted to "Subprograma Ciência e Tecnologia do 2º Quadro Comunitário de Apoio" (BD/9580/96) for the financial support for this work. M.R.A. was involved in a Ph.D. program sponsored by Concurso 4/5.3/PRODEP 2000.

JF034354W



Roast effects on coffee amino acid enantiomers

S. Casal *, E. Mendes, M.B.P.P. Oliveira, M.A. Ferreira

REQUIMTE, Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4099-030 Porto, Portugal

Received 20 February 2004

Abstract

The effects of roast on the amino acid enantiomers (D- and L-) of two green coffee samples (*arabica* and *robusta*) were determined, by gas chromatography, on a Chirasil L-Val column. The free amino acids were present in low amounts in both green samples and destroyed to a very high degree with roast. After hydrolysis, the amino acids behaved according to their thermal stabilities: some amino acids remained unchanged whilst the more thermally sensitive were slightly reduced. Generally, the mean free amino acid racemisation value was higher than that calculated after hydrolysis, and was also higher for the *robusta* sample. In both cases, an increase in the racemisation value with temperature was observed, with aspartic acid being the most sensitive amino acid. The results suggested that the *robusta* coffee matrix is more affected by roast than the *arabica*. The amount of D-amino acids ingested per coffee cup does not seem to constitute a serious food safety problem.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Coffee; L- and D-Amino acids; Racemisation value; Roasting; Food safety

1. Introduction

The nutritional value and the possible toxic effects of D-amino acids have been raising several questions over the past decade. Although initially considered unnatural, the recent chromatographic work has proved that they are almost ubiquitous in nature. Some D-amino acids, namely aspartic acid, serine and alanine, are distributed in tissues and body fluids of vertebrates, suggesting that they may play important physiological roles.

Although some D-amino acids are detected in the human organism, their function, metabolism, nutritional importance or toxicological consequences are still unknown. The main sources of D-amino acids in humans include: (i) food and drink intake, (ii) degradation of cell walls of microorganisms in the gut or (iii) de novo synthesis (Zagon, Dehne, & Bögl, 1994). Only 10–20% of the ingested D-amino acids are excreted. The remaining 80–90% are absorbed in the intestine and metabolised into α -oxoacids by the D-amino acid oxidase, mainly present in the liver, kidney and brain (D'Aniello

et al., 1993). The accumulation of D-amino acids in the organism, resulting from low D-amino acid oxidase activity or reduced degradation rate of peptides containing D-amino acids, may elicit serious damage, namely enzyme synthesis inhibition and growth suppression (D'Aniello, Di Fiore, & Fisher, 1998).

Two main pathways for D-amino acid formation in foodstuffs and beverages are known: technological enrichment during food processing (heat, pH) and microbial activity during fermentation processes (cell wall lyses, racemases) (Friedman, 1999; Zagon et al., 1994). The amino acid enantiomeric ratio is becoming increasingly popular in food industry control. The possible fields of application include the control of technological processes (fermentations and heat treatments) and detection of adulteration or microbial contamination.

Green (unroasted) coffee has no desirable taste or aroma of its own. These characteristics are developed only after the roasting procedure. During this severe heat process, the coffee beans undergo several physical and chemical modifications, especially above 180–200 °C. In quantitative terms, major chemical alterations have been described for chlorogenic acid (Trugo & Macrae, 1984), sucrose (Trugo & Macrae, 1982),

* Corresponding author. Tel.: +351-22002564; fax: +351-222003977.
E-mail address: sucasal@ff.up.pt (S. Casal).

trigonelline (Casal, Oliveira, & Ferreira, 2000a; Stennert & Maier, 1994) and amino acids (Macrae, 1987; Nehring & Maier, 1992; Roffi, Santos, Mexia, Busson, & Maigrot, 1971).

Free and total amino acid profiles have been evaluated in coffee by several authors during the past decade, mostly without enantiomer separation (Clifford, 1985; Macrae, 1987). The published results vary widely, depending on several parameters such as species/varieties, degree of maturation, storage, roasting conditions and the analytical technique used (Smith, 1987). The amino acid contents are usually expressed on a dry mass basis, without corrections for the mass loss occurring during roasting. This leads to variations more related to the amino acids thermal stabilities than to the coffee matrix itself. The real amino acid behaviour with roast is therefore less intelligible.

Under roasting conditions the amino acids partially racemise. Therefore, D-amino acids were detected in roasted coffee, either free (Brückner & Hausch, 1989; Palla, Marchelli, Dossena, & Casnati, 1989) or bound (Nehring & Maier, 1992). In particular, the D-amino acid contents after hydrolysis have been proved to be useful for the purpose of indirect organic roasting loss control, although requiring a long analysis time (Nehring & Maier, 1992).

Our work was intended to study the effect of roast on the free and bound amino acids, both D- and L-enantiomers, to quantify them and to compare *arabica* and *robusta* coffee susceptibilities regarding amino acid racemisation.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

The D- and L-amino acid standards were all of analytical grade from Sigma (St. Louis, MO) and included: alanine (Ala), glycine (Gly), valine (Val), proline (Pro), leucine (Leu), isoleucine (Ile), aspartic acid (Asp), glutamic acid (Glu), methionine (Met), phenylalanine (Phe), lysine (Lys), ornithine (Orn), tyrosine (Tyr), tryptophan (Trp) and hydroxyproline (OH-Pro). L-pipecolic acid (Pip), γ -amino-*n*-butyric acid (GABA), β -alanine (β -Ala) and the internal standard L-*p*-chlorophenylalanine (IS) were also from Sigma. Ethylchloroformate (ECF) and pyridine (Py) were from Fluka (Neu-Ulm, Germany), 2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-butanol (HFB), 5-sulphosalicylic acid dihydrate (SSA) and methylsulphonic acid (MSA) were from Aldrich (Steinheim, Germany). All other chemicals were of analytical grade from several suppliers. The strong cation exchange columns used in the clean-up procedure were Extra-Sep-SCXD, 500 mg, 3 cm³ (Lida Manufacturing Corp., Kenosha, WI).

2.2. Coffee samples

Two green (unroasted) coffee samples were provided by a local industrial coffee roaster – one from Brazil (*Coffea arabica* L., var. *typica*, dry-processed) and another from the Ivory Coast (*Coffea canephora* Pierre, var. *robusta*, dry-processed). The samples were roasted in our laboratory, in a WTC blinder stove (Tuttlinger, Germany) for 15 min at different temperatures (140, 160, 180, 200, 220 and 240 °C).

2.3. Sample characterisation

In order to fully characterise the samples under study, several physical and chemical parameters were evaluated. Water content was determined by oven-drying the fresh ground roasted coffee at 102 ± 2 °C to constant weight; fat content was determined by Soxhlet extraction with petroleum ether according to the AOAC method 920.97 (2000); crude protein was determined according to the Kjeldahl method, using the conversion factor 6.25; caffeine and trigonelline were determined by HPLC (Casal, Oliveira, & Ferreira, 1998). All the chemical parameters were corrected for the roast weight loss.

2.4. Amino acids extraction

The free amino acid extraction was performed with a 2% SSA solution (1 g/50 ml) on previously defatted powdered samples with petroleum ether. Extraction was achieved by magnetic stirring at room temperature, for 2×15 min, after the addition of the internal standard, L-*p*-chlorophenylalanine (Casal, Oliveira, Alves, & Ferreira, 2001).

In order to determine the total amino acid profile, fresh ground coffee samples (150 mg) were hydrolysed with 4 M MSA (3 ml) in pyrolysed vials (490 °C, 4 h). Oxygen was previously removed by bubbling N₂ for about 15 min. The vials were closed and heated in a “Reacti-therm” heating block (Pierce, USA) at 110 °C for 16 h. After achieving room temperature, the internal standard was added and the volume adjusted to 25.0 ml.

2.5. Solid phase extraction

After dilution with water, in order to reduce the ionic strength, and adjustment to pH 2.2, coffee extracts, prepared for both free and total amino acid analysis, were loaded into the strong cation exchange SPE columns. Interferences were eliminated with water and the amino acids were collected with 4 M aqueous ammonia. The extracts were dried at 40 °C, under a N₂ stream, and kept below 0 °C until derivatisation.

2.6. Derivatisation procedure

In order to determine the amino acid enantiomers by gas chromatography, *N*-ethoxycarbonylheptafluorobutyl ester derivatives were prepared (Casal, Oliveira, & Ferreira, 2000b). Briefly, the dry amino acid residues were dissolved in 0.1 M HCl, transferred into silanised screw-cap vial (Supelco, Bellefonte, PA) and then derivatised using a mixture of HFB-Py (2:1 v/v), followed by ECF. The vial was tightly capped and vortexed. Subsequently, chloroform and sodium chloride were added and the vial shaken for extraction of the derivatives into the organic layer. About 1.0 μ l of the organic phase was injected into the gas chromatographic system.

2.7. GC analysis

Chiral discrimination of D- and L-amino acids was achieved by gas chromatography, carried out with a Chrompack CP 9001 instrument (Chrompack, Middelburg, The Netherlands) equipped with a flame ionisation detector and an automatic liquid sampler (CP-9050, Chrompack). Separation was achieved on a Chirasil L-Val (25 m \times 0.25 mm i.d.) fused silica capillary column with a 0.12- μ m film coating (Chrompack) with programmed temperature: 80 °C (1 min hold), 5 °C/min to 150 °C (7 min hold), 7 °C/min to 195 °C (15 min hold). Helium was used as carrier gas at an initial inlet flow of 0.7 ml/min and increase to 1.7 ml/min after 36 min. Splitless injection was used with a purge time delay of 0.8 min. The temperatures of the injector and detector were 250 and 280 °C, respectively.

2.8. Amino acids quantification

Response factors relating to the internal standard were determined for all the amino acids, after subjecting the standard solutions to the SPE extraction. Calibration curves were also determined. The relative amount of the D-enantiomer, or racemisation value, was determined according to the following equation: %D = $A_D / (A_D + A_L) \times 100$, where A_D and A_L are the peak areas of the D- and L-enantiomers, respectively.

3. Results and discussion

3.1. General

Complete isolation of free amino acids from the green coffee beans is difficult, particularly if quantitative data are required (Macrae, 1987). Based on literature reports, several extracting agents were tested (ethanol, methanol/picric acid, methanol/water and SSA), with or without preliminary lipids removal. The best results, corresponding to higher chromatographic peak areas and

cleaner chromatograms, were achieved with SSA after previous fat extraction (data not shown), as already reported by Arnold, Ludwig, Kühn, and Möschwitzer (1994).

Protein hydrolysis is required in order to determine the total individual amino acids. Conventional acidic hydrolysis uses 6 M HCl for 20–24 h at 110 °C (Weiss, Manneberg, Juranville, Lahm, & Foutoulakis, 1998). These conditions inevitably result in partial racemisation of the amino acids, proportional to the hydrolytic conditions applied (Fountoulakis & Lahm, 1998; Weiss et al., 1998). When the naturally occurring enantiomers are the main subject, the hydrolysis must be performed with caution: less drastic hydrolysis conditions than the classical ones should be used, without compromising the protein hydrolysis (Stenberg, Marko-Varga, & Oste, 2001).

In order to investigate the degree of racemisation introduced by the hydrolysis on coffee, a green coffee sample was hydrolysed at 110 °C, from 12 to 24 h, with both 6 M HCl and 4 M MSA, the latter being described as inducing less isomerisation (Fountoulakis & Lahm, 1998). The results showed that the individual amino acid chromatographic areas increased from 12 to 16 h, remaining almost constant or slightly reduced until the 24th h tested (data not shown). The relative amount of the D-enantiomer also increased with the hydrolysis time, achieving higher intensities after 18 h. Some amino acids, namely Asp, Glu, Lys and Ala, presented higher racemisation. After 16 h, Asp racemisation, using MSA, produced lower amounts of the D-form (2.4%) than using the HCl hydrolysis (5.7%). Phenol or tryptamine addition did not influence the racemate formation (Fountoulakis & Lahm, 1998).

The SPE performance was also adjusted for the extracts under analysis. In order to find the maximum loading capacity, increasing volumes of acidic coffee solution were loaded on to the SCX columns and the amino acid peak areas compared. A linear increase was observed until the equivalent of 45 mg green coffee was loaded. Additionally, and due to the high ionic strength of the acidic coffee extracts, several dilutions were performed in order to find the optimal value. The highest recoveries were achieved with 0.005 M extracts (data not shown).

The samples were fully characterised, both physically and chemically, using several standard determinations. These results are shown in Table 1. As discussed in Section 1, and in order to understand what really happens within the coffee beans, the results were all normalised for the mass weight loss.

The protein, calculated directly from total Kjeldhal nitrogen, is of limited value, as there are many other nitrogen components in coffee (Macrae, 1987). Therefore, the protein content reported in Table 1 was calculated as $6.25 \times (\text{Kjeldhal N} - \text{caffeine N} - \text{trigonelline N})$.

Table 1
Characterisation of the coffee samples (%)

Roasting temperature (°C)	Moisture content		Weight loss (dw)		Fat (dw ^a)		Caffeine (dw ^a)		Trigonelline (dw ^a)		Protein (dw ^{a,b})	
	Arabica	Robusta	Arabica	Robusta	Arabica	Robusta	Arabica	Robusta	Arabica	Robusta	Arabica	Robusta
Green	8.5	8.3	–	–	13.8	10.0	1.24	2.08	0.89	0.63	12.8	13.6
140	6.8	6.6	5.0	7.7	10.9	7.3	1.29	2.08	0.82	0.60	11.5	12.3
160	5.1	5.3	7.8	15.8	11.2	7.1	1.26	1.89	0.79	0.51	10.7	11.4
180	4.0	4.4	10.1	18.0	10.9	7.6	1.19	1.70	0.78	0.50	11.0	10.0
200	2.7	2.4	15.5	22.7	10.2	6.6	1.16	1.66	0.70	0.45	9.7	10.8
220	1.6	1.4	17.7	23.9	10.6	7.4	1.07	1.65	0.50	0.35	10.1	10.3
240	2.0	2.0	22.6	27.9	12.3	9.3	0.87	1.52	0.04	0.08	8.7	9.9

dw, dry weight.

^a Corrected for weight loss.

^b With previous subtraction of caffeine and trigonelline nitrogen.

3.2. Free amino acid composition

The individual free amino acid contents (D + L) are listed in Tables 2 and 3, for *arabica* and *robusta* coffee samples, respectively. Free amino acids, initially at low levels in both green samples, were highly destroyed during roasting, especially above 180 °C. At 240 °C, a temperature out of the usual roasting range, no free amino acids were detected in either species. In Portugal, roasting is performed with high temperature and long roasting times (HTLT roasting), such as 8–12 min from 180 to 220 °C (Clarke, 1987).

Generally, both unroasted samples presented the same major and minor amino acids. With the exception of glutamic acid, the amino acids determined were

higher in the *robusta* coffee sample, especially at the lower temperatures assayed, as is usually described (Clifford, 1985; Illy & Viani, 1995). The three main amino acids of both *arabica* and *robusta* green coffees were Glu, followed by Asp and GABA. Orn, Pip and β-Ala, first quantified by HPLC in green coffee (Arnold et al., 1994), were also determined. These compounds were found in very small amounts and were also slightly higher in the *robusta* sample, with the exception of Pip. All amino-compounds analysed decreased with roasting, although at different rates. This fact might be related, not only to their inherent thermal stabilities, but also to the coffee matrix itself, since the same amino acids behaved differently in the *arabica* and *robusta* samples.

Table 2
Free amino acids determined in the *arabica* coffee sample

Amino acid (mg/kg dw) ^a	Unroasted	Roasted					
		140 °C	160 °C	180 °C	200 °C	220 °C	240 °C
Ala	292 ± 2.1	250 ± 0.5	119 ± 0.8	21.1 ± 0.5	4.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	vest
Gly	49.4 ± 0.3	45.4 ± 0.3	19.0 ± 0.4	5.7 ± 0.3	5.4 ± 0.1	2.7 ± 0.1	nd
Val	128 ± 0.7	125 ± 1.2	126 ± 2.4	58.9 ± 0.9	14.7 ± 0.8	2.4 ± 0.2	vest
Pro	303 ± 1.6	256 ± 1.2	234 ± 0.7	56.8 ± 0.5	2.0 ± 0.2	1.4 ± 0.2	nd
Ile	75.7 ± 0.1	70.9 ± 0.2	56.2 ± 0.2	20.0 ± 0.2	8.7 ± 0.4	2.0 ± 0.1	nd
Leu	73.2 ± 0.4	70.4 ± 0.2	14.5 ± 0.2	6.7 ± 0.2	1.5 ± 0.0	1.2 ± 0.2	nd
Asp	523 ± 5.3	489 ± 2.1	434 ± 3.3	369 ± 10.2	71.5 ± 8.5	6.9 ± 2.0	nd
Glu	1414 ± 11.4	1411 ± 10.2	108 ± 7.7	129 ± 2.4	30.3 ± 1.4	35.9 ± 2.3	vest
Met	18.5 ± 1.2	6.7 ± 0.4	2.4 ± 0.4	nd	nd	nd	nd
Phe	170 ± 1.5	138 ± 0.8	25.3 ± 0.3	2.8 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.2	vest
His	50.2 ± 1.0	49.1 ± 0.1	13.2 ± 0.1	nd	nd	nd	nd
Lys	68.3 ± 0.2	22.7 ± 0.2	9.6 ± 0.2	nd	nd	nd	nd
Orn	16.0 ± 0.2	12.1 ± 0.2	vest	vest	nd	nd	nd
Tyr	64.8 ± 1.3	39.7 ± 0.6	22.6 ± 0.4	1.5 ± 0.1	1.1 ± 0.1	vest	vest
Trp	151 ± 1.5	142 ± 1.0	27.8 ± 0.8	2.5 ± 0.1	nd	nd	nd
Pip	68.2 ± 0.0	73.0 ± 0.2	73.3 ± 0.1	16.9 ± 0.2	nd	nd	nd
GABA	397.0 ± 10.2	237 ± 2.5	220 ± 1.8	73.0 ± 1.7	17.7 ± 4.3	nd	nd
β-Ala	3.9 ± 0.1	3.6 ± 0.1	2.7 ± 0.1	0.2 ± 0.0	vest	nd	nd
Sum	3867	3443	2480	764	158	54.7	vest
%D ^b	1.4	2.6	7.1	14.5	30.1	56.0	–

^a All values were corrected for the roast loss.

^b Racemisation value (see Section 2).

Table 3
Free amino acids determined in the *robusta* coffee sample

Amino acid (mg/kg dw) ^a	Unroasted	Roasted					
		140 °C	160 °C	180 °C	200 °C	220 °C	240 °C
Ala	363 ± 2.1	370 ± 0.0	275 ± 1.2	158 ± 0.2	13.5 ± 0.1	2.6 ± 0.1	vest
Gly	79.6 ± 1.2	77.3 ± 0.5	56.2 ± 0.3	29.7 ± 0.1	8.4 ± 0.3	3.7 ± 0.2	vest
Val	147 ± 1.3	99.9 ± 1.1	89.9 ± 0.4	44.9 ± 0.2	5.4 ± 0.3	0.9 ± 0.2	vest
Pro	315 ± 1.2	234 ± 0.8	194 ± 0.3	81.2 ± 0.1	7.9 ± 0.1	0.4 ± 0.2	vest
Ile	88.0 ± 0.6	77.1 ± 0.3	49.3 ± 0.2	23.8 ± 0.4	2.5 ± 0.0	0.9 ± 0.2	nd
Leu	92.9 ± 0.7	75.2 ± 0.5	58.6 ± 0.3	20.2 ± 0.1	1.9 ± 0.1	0.7 ± 0.2	vest
Asp	602 ± 1.5	501 ± 0.9	345 ± 0.1	106 ± 0.3	5.6 ± 0.2	3.8 ± 0.2	nd
Glu	1165 ± 12.3	1191 ± 7.9	1028 ± 1.7	229 ± 0.1	83.1 ± 0.0	30.3 ± 0.1	vest
Met	29.9 ± 1.3	27.2 ± 0.5	21.9 ± 0.0	7.7 ± 0.1	nd	nd	nd
Phe	251 ± 0.3	273 ± 1.0	174 ± 0.2	55.2 ± 0.3	4.4 ± 0.3	6.4 ± 0.3	vest
His	90.6 ± 2.2	92.7 ± 0.2	50.2 ± 2.7	24.8 ± 0.6	nd	nd	nd
Lys	87.9 ± 0.8	87.7 ± 0.8	67.4 ± 1.2	18.6 ± 0.6	nd	nd	nd
Orn	45.7 ± 1.7	22.4 ± 0.4	13.1 ± 0.3	nd	nd	nd	nd
Tyr	111 ± 0.6	98.4 ± 0.2	66.4 ± 0.4	27.2 ± 0.3	1.7 ± 0.0	vest	vest
Trp	431 ± 1.0	375 ± 1.4	256 ± 0.8	84.0 ± 2.3	3.4 ± 0.1	nd	nd
Pip	17.8 ± 0.4	19.0 ± 0.2	33.4 ± 0.7	15.9 ± 0.3	4.3 ± 0.2	0.6 ± 0.2	nd
GABA	668 ± 7.0	287 ± 3.2	199 ± 2.8	91.4 ± 0.5	37.6 ± 2.4	12.5 ± 0.8	nd
β-Ala	5.7 ± 0.3	5.1 ± 0.5	5.8 ± 0.9	3.0 ± 0.1	vest	nd	nd
Sum	4590	3913	2982	1020	179.7	62.8	vest
%D ^b	1.6	3.0	8.8	15.5	41.5	68.3	–

^a All values were corrected for the roast loss.

^b Racemisation value (see Section 2).

For D-amino acids, the mean racemisation values (included in Tables 2 and 3) describe a similar behaviour in both samples, consisting of a gradual increase with the roasting temperature, although with higher values for the *robusta* coffee sample. The racemisation observed in the green coffee samples is in accordance with the values described for plants in general (Brückner & Westhauser, 2003). For a more detailed illustration, Figs. 1 and 2 present the individual racemisation values

for the six main isomers, for *arabica* and *robusta* coffees, respectively.

In *arabica* coffee, the racemisation values remained below 15% until 160 °C, after which they began to increase at different rates. This temperature has been associated with the actual roasting start, when the beans reach about 5% moisture content and the process becomes exothermic (Clarke, 1987). Asp, Glu and Phe achieved racemisation values greater than 50% at 220

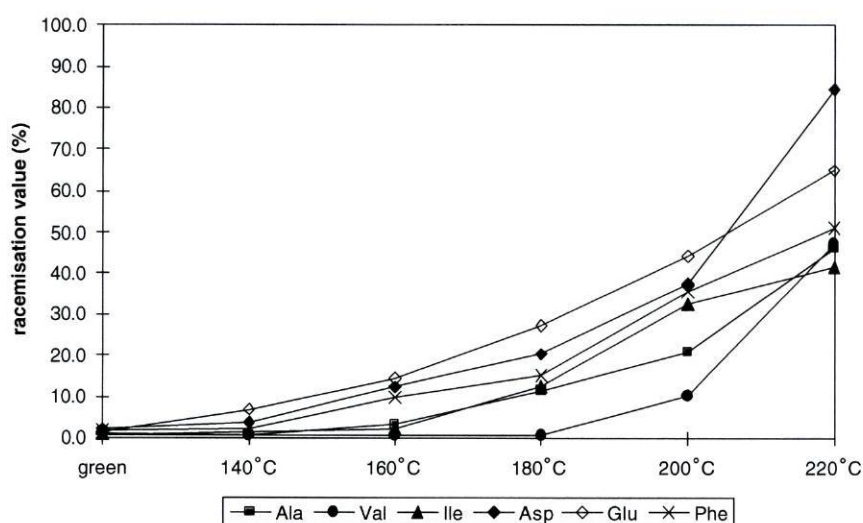


Fig. 1. Evolution of free amino acid racemisation values in the *arabica* coffee sample.

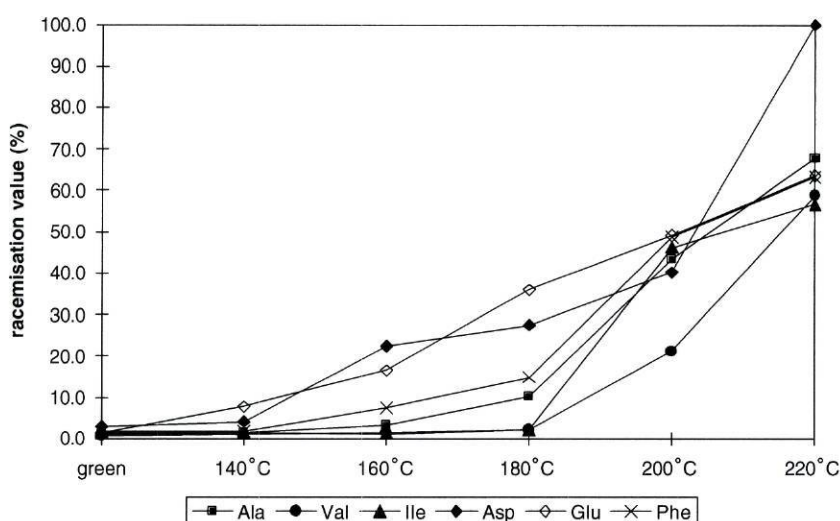


Fig. 2. Evolution of free amino acid racemisation values in the *robusta* coffee sample.

°C, before being completely lost at 240 °C, as presented in Table 2. On the other hand, Val was the more stable amino acid (racemisation began to increase only after 180 °C).

The racemisation order of amino acids in *robusta* showed almost the same trend as that of *arabica* but the process was more intense. At 160 °C, Asp and Glu already had values above 15%. At 220 °C, all amino acid racemisation values were above 55%, indicating a higher D-enantiomer amount than the L-counterpart. Asp registered the highest racemisation value, achieving 100% at 220 °C. Once again, Val was the most stable amino acid.

These observations might indicate that the *arabica* coffee matrix is more protected from the temperature effects, especially at the lower temperatures. The higher *arabica* lipid content (see Table 1) expelled to the surface during roasting could act as a physical barrier, protecting the inner coffee matrix (Clifford, 1985). It would be interesting to determine the D% at the surface of the beans and compare with the inside amounts.

3.3. Amino acid composition after hydrolysis

Tables 4 and 5 show the individual amino acid obtained after hydrolysis, including both D- and L-

Table 4
Arabica amino acids content after protein hydrolysis

Amino acid (g/100 g dw) ^a	Unroasted	Roasted					
		140 °C	160 °C	180 °C	200 °C	220 °C	240 °C
Ala	0.43 ± 0.02	0.43 ± 0.03	0.44 ± 0.03	0.43 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.44 ± 0.01	0.40 ± 0.03
Gly	0.46 ± 0.03	0.47 ± 0.04	0.48 ± 0.03	0.49 ± 0.03	0.49 ± 0.02	0.47 ± 0.01	0.21 ± 0.03
Val	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.04	0.29 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.26 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.28 ± 0.03
Pro	0.80 ± 0.03	0.82 ± 0.06	0.81 ± 0.03	0.80 ± 0.03	0.82 ± 0.03	0.83 ± 0.00	0.78 ± 0.03
Ile	0.41 ± 0.03	0.40 ± 0.03	0.40 ± 0.02	0.37 ± 0.01	0.38 ± 0.02	0.36 ± 0.00	0.35 ± 0.02
Leu	0.70 ± 0.02	0.71 ± 0.05	0.73 ± 0.03	0.73 ± 0.01	0.70 ± 0.03	0.73 ± 0.00	0.67 ± 0.03
Asp	0.84 ± 0.01	0.77 ± 0.01	0.69 ± 0.01	0.56 ± 0.00	0.46 ± 0.01	0.44 ± 0.01	0.39 ± 0.01
Glu	1.67 ± 0.05	1.55 ± 0.01	1.49 ± 0.02	1.47 ± 0.02	1.45 ± 0.11	1.36 ± 0.01	0.73 ± 0.03
Met	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.00
Phe	0.37 ± 0.00	0.38 ± 0.00	0.39 ± 0.00	0.40 ± 0.00	0.40 ± 0.00	0.38 ± 0.01	0.36 ± 0.00
His	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.04 ± 0.00
Lys	0.58 ± 0.01	0.56 ± 0.01	0.49 ± 0.00	0.43 ± 0.02	0.19 ± 0.00	0.17 ± 0.01	0.12 ± 0.01
Tyr	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.00	0.28 ± 0.00	0.30 ± 0.00	0.29 ± 0.01
OH-Pro	0.61 ± 0.04	0.56 ± 0.05	0.54 ± 0.03	0.57 ± 0.03	0.53 ± 0.03	0.50 ± 0.02	0.19 ± 0.02
Sum	7.6	7.3	7.1	7.0	6.5	6.3	4.8
%D ^b	1.1	1.1	1.3	2.1	3.2	5.3	11.9

^a All values were corrected for the roast loss.

^b Racemisation value (see Section 2).

Table 5
Robusta amino acids content after protein hydrolysis

Amino acid (g/100 g dw) ^a	Unroasted	Roasted					
		140 °C	160 °C	180 °C	200 °C	220 °C	240 °C
Ala	0.49 ± 0.01	0.50 ± 0.04	0.49 ± 0.03	0.51 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.45 ± 0.00	0.41 ± 0.04
Gly	0.63 ± 0.01	0.62 ± 0.04	0.61 ± 0.03	0.62 ± 0.06	0.64 ± 0.01	0.46 ± 0.00	0.32 ± 0.01
Val	0.39 ± 0.01	0.41 ± 0.04	0.43 ± 0.01	0.40 ± 0.04	0.39 ± 0.02	0.36 ± 0.03	0.35 ± 0.00
Pro	0.83 ± 0.01	0.73 ± 0.06	0.76 ± 0.07	0.72 ± 0.06	0.75 ± 0.02	0.76 ± 0.02	0.73 ± 0.05
Ile	0.44 ± 0.00	0.46 ± 0.04	0.45 ± 0.03	0.45 ± 0.03	0.38 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.35 ± 0.00
Leu	0.91 ± 0.02	0.90 ± 0.04	0.88 ± 0.06	0.87 ± 0.09	0.78 ± 0.01	0.66 ± 0.03	0.48 ± 0.00
Asp	0.85 ± 0.03	0.84 ± 0.02	0.57 ± 0.02	0.41 ± 0.01	0.34 ± 0.00	0.29 ± 0.00	0.30 ± 0.00
Glu	1.50 ± 0.03	1.36 ± 0.04	1.10 ± 0.09	1.04 ± 0.05	1.08 ± 0.04	0.86 ± 0.01	0.83 ± 0.00
Met	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.00	0.17 ± 0.01	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.03 ± 0.00
Phe	0.52 ± 0.00	0.53 ± 0.00	0.46 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.67 ± 0.00	0.33 ± 0.00	0.39 ± 0.00
His	0.14 ± 0.01	0.11 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.09 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00
Lys	0.66 ± 0.01	0.65 ± 0.01	0.55 ± 0.02	0.38 ± 0.01	0.16 ± 0.00	0.09 ± 0.00	0.08 ± 0.00
Tyr	0.40 ± 0.00	0.37 ± 0.00	0.36 ± 0.01	0.34 ± 0.00	0.29 ± 0.00	0.36 ± 0.00	0.30 ± 0.01
OH-Pro	0.39 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.41 ± 0.03	0.38 ± 0.03	0.38 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.23 ± 0.02
Sum	8.3	8.0	7.3	6.8	6.5	5.5	4.8
%D ^b	1.0	1.1	1.4	1.9	3.3	5.2	11.1

^a All values were corrected for the roast loss.

^b Racemisation value (see Section 2).

enantiomers, all corrected for the mass loss. The sum of the individual amino acids is lower than the corrected protein content described in Table 1. The fact that this methodology is unable to determine some amino acids (Casal et al., 2000a, 2000b) could be an explanation, but it also confirms that some of the nitrogen accounted as protein in the roasted coffee has other sources than amino acids, e.g., caffeine or trigonelline.

Generally, all the amino acid contents were similar in both species, although slightly higher in *robusta*, as already observed for the free amino acids. Their behaviour was quite similar in both samples and occurred according to the amino acid thermal stabilities (Baxter, 1996). The more stable amino acids, such as Tyr, Val, Leu, Phe, or Ala, remained almost constant for all the temperatures assayed. Lys, Met and His were the most degraded amino acids, again in both samples. Comparing the results at 240 °C, *robusta* coffee samples had a slightly higher total amino acid loss. Again, temperature seems to have a higher effect on this matrix. The results were similar to others described in the literature (Clarke, 1987; Clifford, 1985), except for OH-Pro for which no published data were found. This amino acid was described as in high content in the cell wall proteins (arabinogalactan), which seem to account for approximately one-third of the green bean protein (Clifford, 1985).

In order to better understand the temperature influence on the amino acids, racemisation values were also calculated. No differences were observed in the mean racemisation values presented in Tables 4 and 5, for *arabica* and *robusta* samples, respectively. Comparing with the free amino acids, the racemisation was less intense and no differences were found in the individual

racemisation values between the two samples (data not shown). As expected, the free amino acids racemise more easily than peptide-bound amino acids.

Taking into account that a typical “expresso” coffee contains about 7.5 mg/ml of protein-like matter (6.5 g ground coffee; 30 ml) (Illy & Viani, 1995), and considering the results obtained for the D-amino acid contents, it can be calculated that about 10 mg of D-amino acids are ingested per cup. These amounts, as in other foods, are considered low values, with probably no pejorative effects. Nevertheless, problems could arise when the D-amino acid oxidase is reduced or inactive. While waiting for further insights into the D-amino acid role and function in the vertebrates, their ingestion should probably be kept as low as possible.

One can speculate that the *robusta* coffee matrix seems more prone to racemisation than the *arabica* one, although further samples would have to be analysed to corroborate these results. Less dark roasts should be favoured and roasting processes inducing less racemisation should be achieved. It would be interesting to compare the results obtained here for traditional roasts with other roasting procedures, namely the recent “high-yield” or fast roasting process (Illy & Viani, 1995).

Given the steady increase of some D-amino acids with roast, this parameter might be important for roasting control, as already suggested by Nehring and Maier (1992). Nevertheless, in their study, the amino acids were analysed after hydrolysis, which requires a long analysis time. From the reported results, it is believed that the free amino acids may be used as well, reducing the total analysis time and thus meeting industry requirements.

Acknowledgements

S. Casal is indebted to “Subprograma Ciência e Tecnologia do 2º Quadro Comunitário de Apoio” (BD/9580/96) for the financial support for this work.

References

- Arnold, U., Ludwig, E., Kühn, R., & Möschwitzer, U. (1994). Analysis of free amino acids in green coffee beans. I. Determination of amino acids after precolumn derivatization using 9-fluorenylmethylchloroformate. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, *199*, 22–25.
- Baxter, B. H. (1996). Amino acids. In L. M. L. Nollet (Ed.), *Handbook of food analysis* (Vol. 1). New York: Marcel Dekker.
- Brückner, H., & Hausch, M. (1989). Gas chromatographic detection of D-amino acids as common constituents of fermented foods. *Chromatographia*, *28*, 487–492.
- Brückner, N., & Westhauser, T. (2003). Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. *Amino Acids*, *24*, 43–55.
- Casal, S., Oliveira, M. B., & Ferreira, M. A. (1998). Development of an HPLC/diode-array detector method for simultaneous determination of trigonelline, nicotinic acid, and caffeine in coffee. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, *21*, 3187–3195.
- Casal, S., Oliveira, M. B., & Ferreira, M. A. (2000a). HPLC/diode-array applied to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid, and caffeine in coffee. *Food Chemistry*, *68*, 481–485.
- Casal, S., Oliveira, M. B., & Ferreira, M. A. (2000b). Gas chromatographic quantification of amino acid enantiomers in food matrices by their *N(O,S)*-ethoxycarbonyl heptafluorobutyl ester derivatives. *Journal of Chromatography A*, *866*, 221–230.
- Casal, S., Oliveira, M. B. P. P., Alves, M. R., & Ferreira, M. A. (2001). Characterization of free amino acid enantiomers of *arabica* and *robusta* coffee species. In *Proceedings of the 19th Coll ASIC*. Paris: ASIC.
- Clarke, R. J. (1987). Roasting and grinding. In R. J. Clarke & R. Macrae (Eds.), *Coffee: Technology* (Vol. 2, pp.73–107). London: Elsevier Applied Science.
- Clifford, M. N. (1985). Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. In M. N. Clifford & K. C. Wilson (Eds.), *Coffee: Botany, biochemistry, and production of beans and beverage* (pp. 305–374). London: Croom Helm Publishers Ltd.
- D’Aniello, A., D’Onofrio, G., Pischetola, M., D’aniello, G., Vetere, A., Petrucelli, L., & Fisher, G. H. (1993). Biological role of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*(36), 16949–16941.
- D’Aniello, A., Di Fiore, M., & Fisher, G. (1998). Occurrence of D-aspartic acid in animal tissues and its role in the nervous and endocrine systems. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*, *4*, 1–21.
- Fountoulakis, M., & Lahm, H.-W. (1998). Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A*, *826*, 109–134.
- Friedman, M. (1999). Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 3457–3479.
- Illy, A., & Viani, R. (1995). *Espresso coffee – The chemistry of quality* (pp. 88–120 and 181–196). London: Academic Press.
- Macrae, R. (1987). Nitrogenous components. In R. J. Clarke & R. Macrae (Eds.), *Coffee: Chemistry* (Vol. 1, pp. 115–152). London: Elsevier Applied Science.
- Nehring, U. P., & Maier, H. G. (1992). Indirect determination of the degree of roast in coffee. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, *195*, 39–42. In W. Horwitz (Ed.), *Official method of analysis of AOAC International* (2000) (17th ed.). USA: AOAC.
- Palla, G., Marchelli, R., Dossena, A., & Casnati, G. (1989). Occurrence of D-amino acids in food – Detection by capillary gas chromatography and by reversed-phase high-performance liquid chromatography with L-phenylalaninamides as chiral selectors. *Journal of Chromatography A*, *475*, 45–53.
- Roffi, J., Santos, A. C., Mexia, J. T., Busson, F., & Maigrot, M. (1971). Green and roasted Angola coffees. Chemical studies. In *Proceedings of the 5th Coll ASIC* (pp. 179–200). Paris: ASIC.
- Smith, A. W. (1987). Introduction. In R. J. Clarke & R. Macrae (Eds.), *Coffee: Chemistry* (Vol. 1, pp. 1–41). London: Elsevier Applied Science.
- Stenberg, M., Marko-Varga, G., & Öste, R. (2001). Racemisation of amino acids during classical and microwave oven hydrolysis – Application to aspartame and Maillard reaction system. *Food Chemistry*, *74*, 217–224.
- Stennert, A., & Maier, H. G. (1994). Trigonelline in coffee: II. Content of green, roasted and instant coffee. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, *199*, 198–200.
- Trugo, L. C., & Macrae, R. (1982). The determination of carbohydrates in coffee products using HPLC. In *Proceedings of the 10th Coll ASIC* (pp. 187–192). Paris: ASIC.
- Trugo, L. C., & Macrae, R. (1984). A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid of coffee using HPLC. *Food Chemistry*, *15*, 219–227.
- Weiss, M., Manneberg, M., Juranville, J.-F., Lahm, H.-W., & Foutoulakis, M. (1998). Effect of the hydrolysis method on the determination of the amino acid composition of proteins. *Journal of Chromatography A*, *795*, 263–275.
- Zagon, J., Dehne, L.-I., & Bögl, K.-W. (1994). D-Amino acids in organisms and foods. *Nutrition Research*, *14*(3), 445–463.

Capítulo 6 – Aminas biogénicas

“Determination of biogenic amines in coffee by an optimized liquid chromatographic method”

in *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 25, 1535-1549, 2002

“Discrimination of green coffees (Arabica and Robusta) based on free and conjugated biogenic amines”

submetido

“Roast effects on free and conjugated polyamines”

submetido

JOURNAL OF LIQUID CHROMATOGRAPHY & RELATED TECHNOLOGIES
Vol. 25, No. 16, pp. 2535–2549, 2002

DETERMINATION OF BIOGENIC AMINES IN COFFEE BY AN OPTIMIZED LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD

S. Casal,* M. B. P. P. Oliveira, and M. A. Ferreira

CEQUP/Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia,
Universidade do Porto, R Aníbal Cunha 164, 4050-047
Porto, Portugal

ABSTRACT

An high-performance liquid chromatography (HPLC) method is described for specific and sensitive quantification of seven biogenic amines in coffee (putrescine, cadaverine, histamine, serotonin, tyramine, spermidine, and spermine). They are extracted from the coffee matrix with trichloroacetic acid, followed by an ion-pair clean-up procedure with *bis*-2-ethylhexylphosphate. Finally, they are converted to the corresponding dansyl derivatives for HPLC analysis. The factors that influence the determination were carefully adjusted according to coffee matrix characteristics (extraction, clean-up, and derivatization conditions).

Chromatographic separation is performed in a Kromasil C₁₈ column, using a 0.5 mM phosphoric acid/acetonitrile/methanol gradient, at a flow rate of 1 mL/min. The effluent is monitored by a series arrangement of a diode-array detector followed by a fluorimetric detector.

*Corresponding author. E-mail: sucasal@ff.up.pt

2535

The present analytical method proved to be accurate, linear, and with lower limits of quantification (less than 0.5 mg/kg). Data concerning recovery and repeatability of the method are also reported.

INTRODUCTION

Biogenic amines are naturally occurring compounds, ubiquitous in animals and plants. These low molecular weight bases can be either aliphatic (putrescine, cadaverine, spermidine, spermine), or aromatic (tyramine, histamine, serotonin). Although many of these active substances play normal roles in mammalian physiology, they can also cause unnatural or toxic effects when consumed in large amounts, especially if their metabolism is blocked or genetically altered.^[1,2]

Polyamines (putrescine, spermine and spermidine) fulfill an array of roles in cellular metabolism and are involved in protein, RNA, and DNA synthesis. Their most important function seems to be the mediating action of all known hormones and growth factors.^[2] All plant cells, tissues, and organs provide the biosynthetic machinery and capacity to produce aliphatic polyamines in some specific organs and tissues. Polyamines are described as being accumulated in high concentration in storage organs, such as seeds. Biogenic amines are also food aroma components and potential precursors of the carcinogenic *N*-nitroso compounds.^[3]

Biogenic amines have been extensively analyzed in food products, such as cheese, meat, fish, vegetables, and feedstuffs.^[4] Data about these compounds in coffee are, however, quite scarce in the literature.^[5-7]

Several chromatographic methods have been proposed for the quantitative determination of amines, including thin-layer chromatography, gas chromatography, capillary electrophoresis, micellar electrokinetic chromatography and, more frequently, high-performance liquid chromatography (HPLC).^[8]

Biogenic amines are a group of compounds of difficult simultaneous analysis because of their structural diversity and lack of pronounced UV-Vis absorption. The usual approach, therefore, has been the derivatization of free amines with an easily detectable group in order to increase the sensitivity of the method. This derivatization step usually reduces the basicity of the nitrogen atom and the use of reversed phases is usually considered the most suitable technique for this analytical purpose.

Several methods for separation, identification, and determination of amines by HPLC have been published throughout during the last two decades. All methods involve three main steps, i.e., amines extraction, purification of the extract, and derivatization. Among the more described reagents for the derivatization is dansyl chloride.^[8-12] It has the advantage, comparing with fluorescamine or ortho-phthalaldehyde, to originate derivatives with both primary and secondary amines

BIOGENIC AMINES IN COFFEE

2537

which are stable enough for subsequent spectroscopic analysis. Dansyl chloride is a particularly well established reagent and gives high fluorescent sulfonamide derivatives with improved chromatographic properties.

The objective of this work was to optimize a method to quantify biogenic amines in coffee by reversed-phase HPLC with dansyl chloride derivatization. As the complexity of the coffee matrix may influence the analytical determination, the behavior of biogenic amines in some steps of the procedure (extraction, clean-up, dansylation conditions, etc.) was extensively studied. Also, a standard addition method was used.

EXPERIMENTAL**Equipment**

The HPLC equipment consisted of an integrated system with two model PU-980 pumps, a AS-950 automated injector, a MD-910 multiwavelength diode array detector (DAD), and a FP-920 fluorimetric detector (Jasco, Japan). Data was analyzed using a Borwin-PDA Controller Software (JMBS, France).

The column used was a reversed-phase Kromasil 100 C₁₈ (5 μm), 250 × 4.6 mm (Teknokroma, Spain) operating at ambient temperature.

Standards and Reagents**Standard Solutions**

Putrescine dihydrochloride (put), cadaverine dihydrochloride (cad), histamine dihydrochloride (his), tyramine hydrochloride (tyr), spermidine trihydrochloride (spd), and spermine tetrahydrochloride (spm), serotonin (ser) (Sigma Chemical Co, USA) at 10 mg/mL free base in water, stored at 5°C, and diluted to working solutions as necessary.

Internal Standard

1,7-Diaminoheptane (IS) (Aldrich, USA) at 10 mg/mL, stored at 5°C.

Dansyl Chloride Solution

Acetone, 7.5 mg/mL, (Sigma), prepared daily and stored at -20°C protected from light.

L-Proline

L-proline (Sigma) was prepared at 100 mg/mL in water, kept refrigerated.

Amine Extraction

For amine extraction, trichloroacetic acid (TCA), perchloric acid (PCA), hydrochloric acid (HCl), sodium carbonate (Na₂CO₃), ammonia, chloroform, and toluene were from Merck (Darmstadt, Germany), *bis*-2-ethylhexylphosphate (BEHPA) was from Aldrich.

High Performance Liquid Chromatography Analyses

For HPLC analyses, phosphoric acid, acetonitrile, and methanol (LiChrosolv—gradient grade) (Merck, Germany), and water purified with a “Seral” system (SeralPur Pro 90 CN), were used throughout after being filtered and degassed.

Sample Preparation

Arabica and robusta coffee beans from several geographical origins were analyzed, both raw and after a standard roast procedure (160–220°C, 15 min). All coffee sample beans were ground and powdered to pass through a 0.75 mm sieve and sample moisture was immediately determined by drying at 103 ± 2°C until constant weight.

Extraction and Derivatization Procedure

The internal standard (1,7-diaminoheptane) was added to a 3 g portion of each powdered coffee bean sample. Two extractions were performed with 5% TCA in a screw cap plastic tube, with a total of 25 mL, stirring each fraction for 10 min. After separation by means of centrifugation at 4000 rpm, the extracts were combined and a 2 mL portion was subjected to an ion-pair clean-up procedure with BEHPA as follows: the pH was adjusted to 7.4 in a screw cap centrifuge tube and the volume adjusted to 3 mL with phosphate buffer pH 7.4 (0.2 M). The buffered sample was extracted with 2 mL 0.1 M BEHPA solution in chloroform, by vortex mixing, and centrifuged at 4000 rpm; the chloroformic

BIOGENIC AMINES IN COFFEE

2539

phase was taken to a second tube and back-extracted with 2 mL of HCl 0.1 M, upon vortex mixing and centrifugation as described above.

The derivatization was performed in a screw cup plastic tube as follows: 400 μ L extract, 1 mL saturated solution of Na_2CO_3 and pH adjustment to 11.0–11.2. The derivatizing agent was added as a 1 mL volume of 7.5 mg/mL solution in acetone. After rapid vortex-mixing, the samples were closed and placed for 12 min at 60°C in a thermostatically controlled water bath, in the absence of light. Then, proline solution (100 μ L) was added, homogenized with a vortex mixer, and rest for 15 min in darkness, at room temperature. Extraction of the derivatized biogenic amines was performed with 1500 μ L toluene. After 15 min at –18°C, 1 mL of the organic phase was recovered into a Eppendorf tube and evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen ($\pm 40^\circ\text{C}$). The pellet was then resuspended in 300 μ L acetonitrile (with vortex mixer), centrifuged at 13,000 rpm for 5 min and transferred to appropriate vials with 200 μ L inserts for use in the automatic sampler.

Chromatography

Elution was performed at 1 mL/min with a linear gradient of A—0.05 M phosphoric acid, and B—methanol/acetonitrile (1 : 1) flushed at 1 mL/min with a gradient elution program as developed by Hornero-Mendez and Garrido-Fernandez.^[12] The detection was performed by both the DAD detector, with chromatograms recorded at 254 nm, connected in series with a fluorimetric detector programmed for excitation at 252 nm and emission at 500 nm.

The compounds under study were identified by chromatographic comparisons with authentic standard derivatives, by co-elution and by the UV spectral characteristics of their dansyl derivatives. Peak purity tests were also performed with the DAD.

Identification

The biogenic amines' presence was confirmed by GC-MS after derivatization with heptafluorobutyric anhydride.^[13] Although suspecting the presence of tryptamine, this was not confirmed by GC-MS and its analysis was not carried out.

RESULTS AND DISCUSSION

There are many methods published in the literature for the selective extraction of biogenic amines from various matrices. As the matrix itself greatly

influences the results, a method was developed specifically for coffee in order to obtain the highest levels of recovery and also the absence of co-eluting interferences. For this purpose, a green arabica coffee sample from Brazil was used throughout this study.

Choice of Extracting Solvent

In plants, in addition to free polyamines, many polyamines are conjugated to hydroxycinnamic acids, the hydroxycinnamic amines, that only rarely are represented outside the plant kingdom.^[14] As water extracts only free amines, we have tested several acidic media in order to also extract amines linked to other matrix components. After literature review,^[8-12,15,16] three acids were tested: 0.1 M HCl, 0.4 M or 0.6 M PCA, and 5% or 10% TCA. Each extraction was performed in duplicate and the chromatograms compared in terms of peak areas.

Although cited with relative frequency, especially for cheese, HCl originated a turbid extract with badly resolved peaks and was, therefore, eliminated. Perchloric acid provided abnormal higher peak areas for His and Tyr when compared with TCA, under the fluorimetric detection. A peak purity test performed with the DAD revealed extremely impure peaks. Cad peak seemed, also, to be impure in all the extractions tested.

The other compounds' areas were quite similar, as were also similar the relative areas to the IS. The results achieved in terms of relative areas are presented in Table 1. The mean results were obtained after elimination of His and Tyr for the reasons described above. Facing these inconclusive results, the clean-up studies have proceeded with both 0.4 M PCA and 5% TCA.

Table 1. Relative Areas Achieved Under Several Extracting Conditions

	0.6 M PCA	0.4 M PCA	10% TCA	5% TCA
Putrescine	100	100	89	92
Cadaverine	56	93	94	100
Histamine	(35)	(100)	(4)	(8)
Serotonine	79	85	88	100
Tyramine	(75)	(100)	(47)	(36)
Spermidine	100	94	89	94
Spermidine	91	100	91	100
Mean ^a	85	94	90	97

^aWithout His and Tyr.

Clean-Up Procedures

The extract purification treatments can be divided into two main groups: liquid–liquid extraction with organic solvents,^[8–9,12,13,16,17] and solid-phase extraction.^[18] For this work, a liquid–liquid extraction was chosen and several methods were tested based on literature reports. Method A uses diethylether, method B requires butanol, method C uses butanol/chloroform, and method D uses a ion-pairing reagent (BEHPA). The results were compared with the unclean extracts (E) in terms of areas (DAD and fluorimetric), relative areas, and peak purity.

Method A did not eliminate the co-eluting interference with His. After the clean-up procedure, an extra peak was observed co-eluting with Cad. This compound was also present in the blank, being, therefore, attributed to reagent contamination.

Methods B and C presented also interfering peaks coincident with His and Cad, confirmed by both purity peak analysis with the DAD and absence of characteristic dansyl derivatives' fluorescence. Gradient adjustment proved unsuccessful to separate these impurities. Also, these two methods require saturated salt solutions in order to improve extraction coefficients and to prevent mixing of the aqueous and organic phases during the liquid–liquid extraction. The use of Na_2CO_3 for this purpose, although frequently referred, makes it difficult to standardize, as its solubility is greatly influenced by temperature and by other compounds present in the extract, causing pH variations.

Method D-ion-pair extraction with BEHPA-has proved to be a powerful and very efficient agent for the extraction of various organic bases, leading to increased recovery and enhanced purification for the extracts obtained from complex matrices. Although more time consuming, the chromatograms obtained were clearer, with basically no differences between PCA and TCA extracts.

Based on these observations, we have chosen method D. Concerning the extract, 5% TCA represented, always, a slightly better choice. A blank analysis was performed with the chosen method and no peaks coincident with the studied biogenic amines were observed.

Optimization of Derivatization Conditions

There is no agreement in the literature on the derivatization conditions that should be used for biogenic amines; instead, a wide variety of conditions is proposed. It was necessary to adjust the derivatization conditions in order to find the optimal dansyl chloride concentration, incubation pH, temperature, and reaction time.

Influence of pH

During the derivatization step, the pH is usually controlled, as it greatly influences the partition equilibrium of amines between the two phases. Sodium carbonate is frequently used for this purpose. Several pH's were tested from 10.0 to 12.0, as represented in Fig. 1. The optimum pH is related to the amines being determined, as their behaviors vary. pH 11 represented a compromise situation and was, therefore, chosen for this step.

Dansyl Chloride Concentration

Tests were performed in order to find the optimal dansyl concentration on the derivatization medium. The effect of dansyl chloride concentration on the derivatization is presented in Fig. 2. Concentrations higher than 3 mg/mL did not increase the detector response and introduced impurities coeluting with the smaller peaks. Therefore, this was the chosen concentration corresponding to the addition of 1 mL dansyl chloride at 7.5 mg/mL.

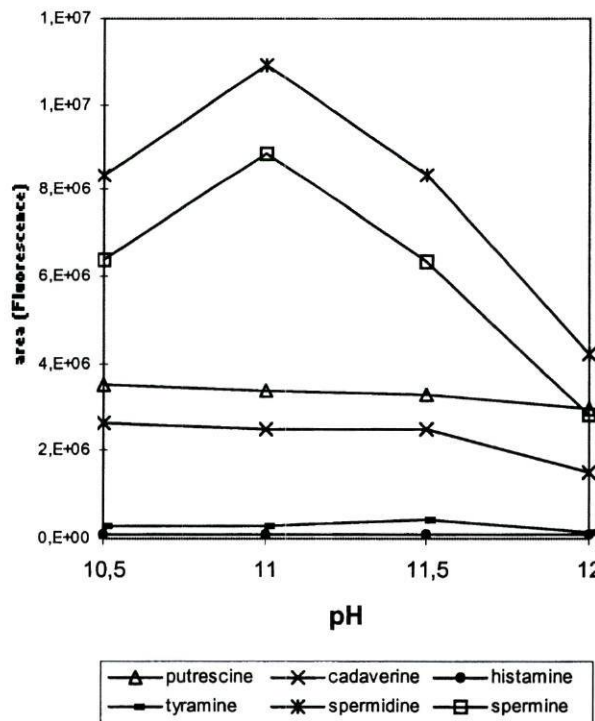


Figure 1. pH influence during the derivatization step.

BIOGENIC AMINES IN COFFEE

2543

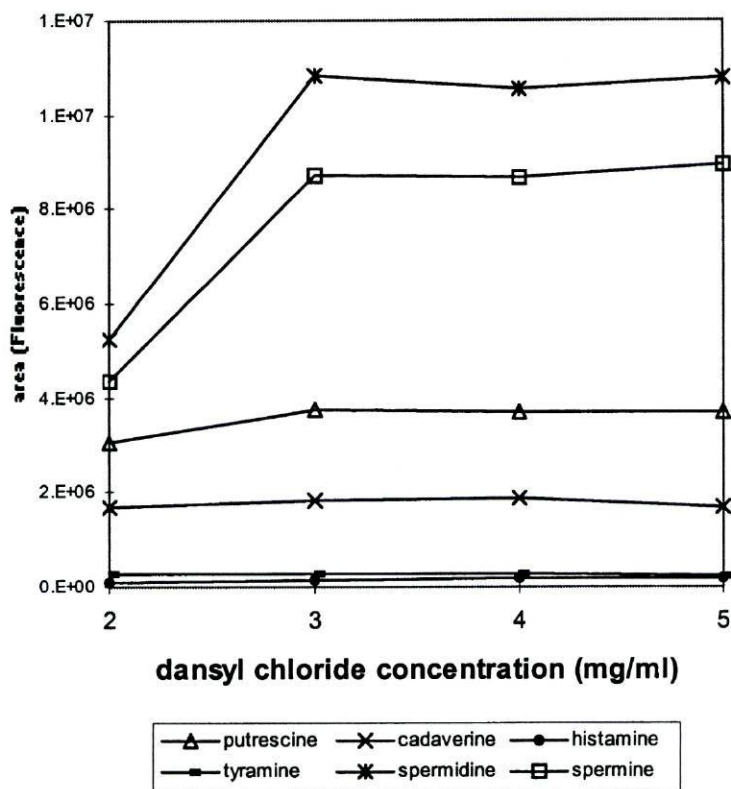


Figure 2. Effect of dansyl chloride concentration on the derivatization conditions.

Incubation Conditions

Several temperature/time combinations were tested in order to find the fastest and still accurate combination. Derivatization temperature was studied at 40°C (15, 30, 45 min), and 60°C for (3, 5, 8, 12, 15 min) in a water bath. The data obtained are represented in Table 2; they show that the best derivatization conditions were between 12 and 15 min at 60°C. Higher incubation times gave inconstant compound losses (not represented). Incubation for 12 min at 60°C produced better results for the three principal amines (put, spd, and spm) and was, therefore, chosen.

Neutralization of the Dansyl Chloride

Some recent works describe the neutralization of the excessive dansyl chloride in order to obtain stable derivative solutions and more reproducible

Table 2. Incubation Condition Tested (Relative Yields in Percentage)

Temperature:	40°C			60°C				
Time:	15	30	45	3	5	8	12	15
Putrescine	66	94	93	100	89	99	97	92
Cadaverine	40	100	73	46	62	85	86	89
Histamine	36	42	38	39	31	28	94	100
Tyramine	52	55	47	66	86	40	100	99
Spermidine	74	86	86	72	80	86	100	94
Spermine	66	81	75	76	67	74	100	95
Mean	56	77	69	66	69	69	96	95

results, with fewer secondary peaks. For this purpose, ammonia and *L*-proline were tested. A 100 μ L portion was sufficient to neutralize the excess dansyl chloride, as described by Duflos et al.^[11] and no differences were observed between the two compounds tested.

Validation: Linearity, Precision, Recovery, Quantification Limit

The first calibration curves were constructed with standard solutions submitted to the entire protocol as described in the Experimental section. The correlation coefficients (r^2) were always higher than 0.999 with both detectors.

As our objective was to quantify coffee biogenic amines by the standard addition method, the same arabica coffee sample used throughout this study was extracted, in duplicate, after spiking with four different concentrations of each of the biogenic amines. Correlation coefficients (r^2) of standard addition calibration curves were higher than 0.99, except for serotonin. The tested range for each biogenic amine, selected according to the expected values for coffee, is summarized in Table 3.

The results from the validation of the method are listed in Table 3. The method proved to be precise (within-day precision ranging from 1.2 to 12.5% and inter-day precision ranging from 2.3 to 13.2%).

Detection limits (three times signal-to-noise ratio under the DAD detector) were lower than 0.06 μ g/g. The lower limit of quantification was investigated in coffee samples. Recovery was tested by the standard addition procedure; three addition levels were used for each amine. Mean extraction recoveries are also represented in Table 3.

Figure 3 represents chromatograms obtained with standards, with the DAD detector (A) and the fluorimetric detector (B).

BIOGENIC AMINES IN COFFEE

2545

Table 3. Method Validation Parameters

	Rt		Linearity		Limits		Precision		Recovery
	min	cv% (n = 10)	Range (mg/ml)	Detection µg/g	Quantification µg/g	Within-Day CV% (n = 3)	Inter-Day CV% (n = 3)	Mean% (n = 3)	
Putrescine	16.2	0.4	1.50–30.00	0.009	0.036	1.6	2.3	98.5	
Cadaverine	17.2	0.4	0.05–1.00	0.001	0.002	6.2	11.4	100.2	
Histamine	18.6	0.3	0.05–1.00	0.007	0.030	8.3	12.6	98.2	
Serotonine	21.3	0.4	0.05–1.00	0.062	0.377	12.5	13.2	95.5	
Tyramine	23.8	0.4	0.05–1.00	0.025	0.145	11.0	10.2	100.2	
Spermidine	25.4	0.3	1.50–30.00	0.010	0.040	1.2	5.7	90.4	
Spermine	28.6	0.6	1.50–30.00	0.011	0.043	4.3	3.5	90.8	

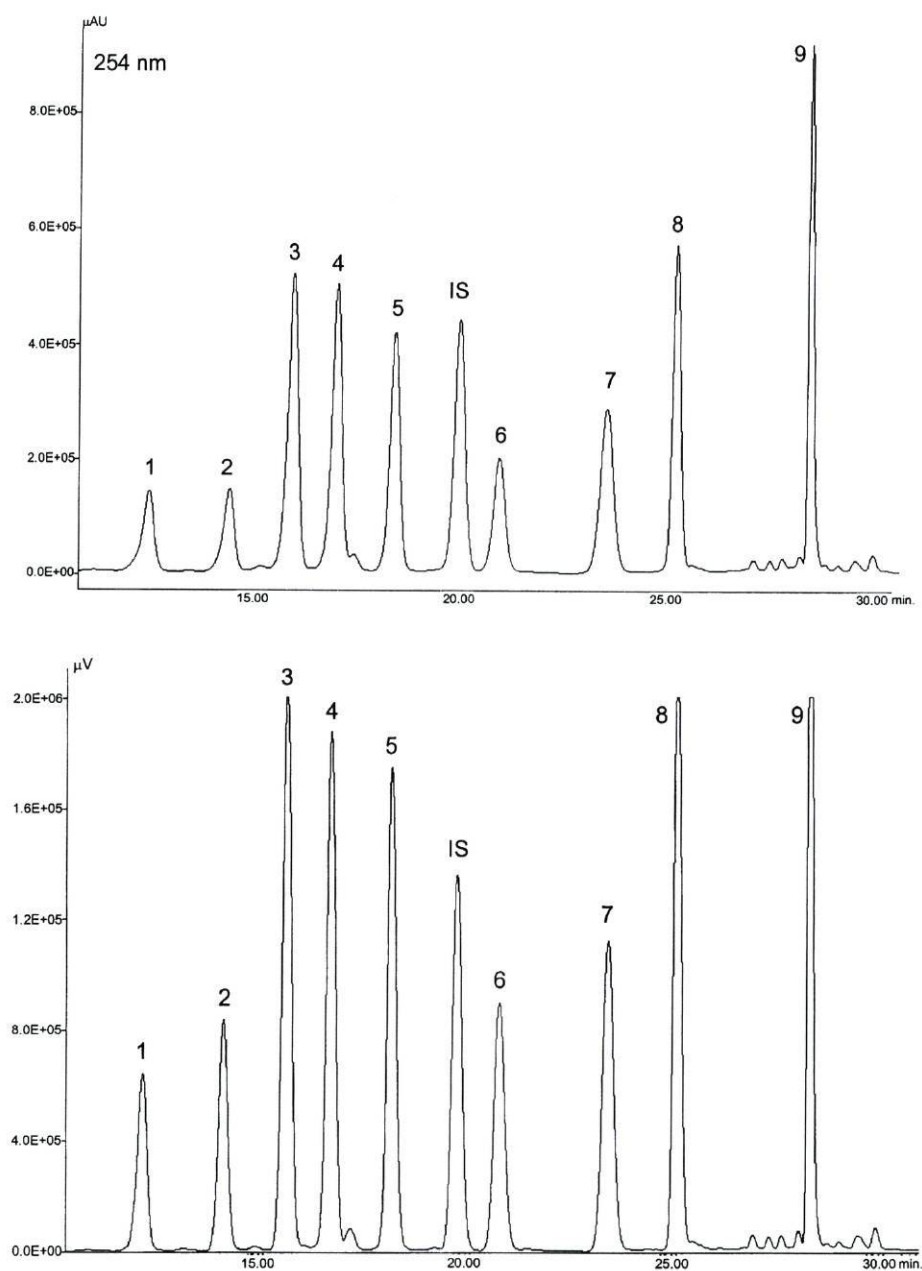


Figure 3. (A) Typical standards chromatogram obtained with the DAD at 254 nm: 1—tryptamine, 2—phenylethylamine, 3—putrescine, 4—cadaverine, 5—histamine, 6—serotonine, 7—spermidine, 8—spermine. For chromatographic conditions see Experimental section. (B) Typical standard chromatogram obtained with the fluorescence detector. Identification as in Fig. 3A.

BIOGENIC AMINES IN COFFEE

2547

Table 4. Biogenic Amine Content in Raw Coffee (Dry Base)

mg/g	Robusta			Arabica		
	Ivory Coast	Angola	Uganda	Colombia	Brasil	Mexico
Putrescine	16.845	6.436	12.377	49.258	45.750	52.424
Cadaverine	0.339	0.165	0.197	0.070	0.124	0.239
Histamine	0.793	0.212	0.602	0.510	0.577	0.629
Serotonine	3.122	3.207	2.311	1.815	3.076	3.189
Tyramine	0.840	4.166	0.975	0.554	0.696	0.579
Spermidine	6.867	3.333	5.107	5.798	7.490	6.233
Spermine	8.416	3.683	7.693	7.203	7.588	6.246

Determination of Biogenic Amines in Coffee Samples

Table 4 shows the biogenic amine contents in the green coffee samples analyzed. The biogenic amine contents are in accordance with the few bibliographic references found.^[5,7] All biogenic amines were lost during roasting,

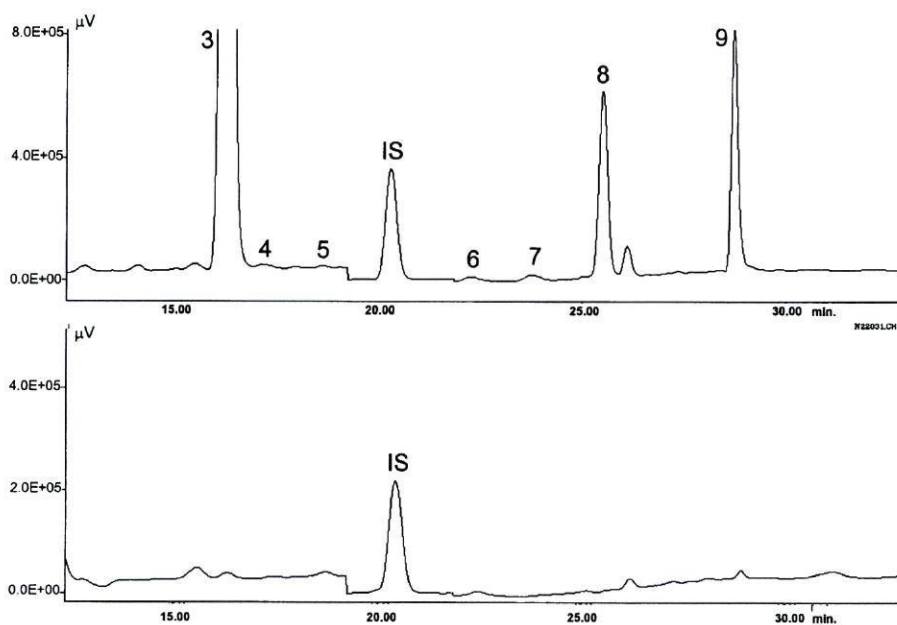


Figure 4. Typical chromatograms of a raw (A), roasted (B) arabica coffee sample. Peak identification as in Fig. 3.

with only vestigial amounts being present, as previously reported by Amorim et al.^[5]

Figure 4 represents typical chromatograms of green arabica coffee sample (A) and after roasting (B) with the fluorimetric detector. Both detectors proved equally efficient for the analysis in question.

Based on the results achieved, with apparent differences between arabica and robusta coffee beans, especially for putrescine, it will be interesting to know if green coffee polyamines content can discriminate coffee varieties. Also, the knowledge of their behavior during roasting can probably be important for industrial roasting control. Studies are being conducted with these purposes as a goal.

REFERENCES

1. Bardocz, S.; Duguid, T.J.; Brown, D.S.; Grant, G.; Pusztai, A.; White, A.; Ralph, A. The Importance of Dietary Polyamines in Cell Regeneration and Growth. *Brit. J. Nutr.* **1995**, *73*, 819–828.
2. Igarashi, K.; Kashiwagi, K. Polyamines: Mysterious Modulators of Cellular Functions. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2000**, *271*, 559–564.
3. Sen, N.; Seaman, S.; Weber, D. Mass Spectrometric Confirmation of the Presence of N-Nitrosopyrrolidine in Instant Coffee. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1990**, *73* (2), 325–327.
4. Brink, B.; Damink, C.; Joosten, H.; Veld, J. Occurrence and Formation of Biologically Active Amines in Foods. *Intl. J. Food Microb.* **1990**, *11*, 73–84.
5. Amorim, H.V.; Basso, L.C.; Crocomo, O.J.; Teixeira, A.A. Polyamines in Green and Roasted Coffee. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, *25* (4), 957–958.
6. Kele, M.; Ohmacht, R. Determination of Serotonin Released from Coffee Wax by Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A.* **1996**, *730*, 59–62.
7. Macrae, R. Nitrogenous Components. In *Coffee Vol. I: Chemistry*; Clarke, R.; Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science: London, 1987; 115–152.
8. Gennaro, M.; Giacosa, D.; Abrigo, C.; Biglini, P.; Campi, E. Organic Bases. In *Handbook of Food Analysis*; Nollet, L., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1996; Vol. 1, 745–820.
9. Moret, S.; Conte, L. High Performance Liquid Chromatographic Evaluation of Biogenic Amines in Foods. An Analysis of Different Methods of Sample Preparation in Relation to Food Characteristics. *J. Chromatogr. A* **1996**, *729*, 363–369.
10. Valle, M.; Malle, P. Optimization of a Liquid Chromatographic Method for Determination of Amines in Fish. *J. AOAC Intl.* **1997**, *80* (1), 49–56.

BIOGENIC AMINES IN COFFEE

2549

11. Duflos, G.; Dervin, C.; Malle, P.; Bouquelet, S. Relevance of Matrix Effect in Determination of Biogenic Amines in Plaice (*Pleuronectes Platessa*) and Whiting (*Merlangus merlangus*). *J. AOAC Intl.* **1999**, *82* (5), 1096–1101.
12. Hornero-Mendez, D.; Garrido-Fernandez, A. Biogenic Amines in Table Olives. Analysis by High-Performance Liquid Chromatography. *Analyst* **1994**, *119*, 2037–2041.
13. Fernandez, J.O.; Ferreira, M.A. Combined Ion-Pair Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry for the Simultaneous Determination of Diamines, Polyamines and Aromatic Amines in Port Wine and Grape Juice. *J. Chromatogr. A* **2000**, *886*, 183–195.
14. Bagni, N. Metabolism and Accumulation of Biogenic Amines in Plant Food. *Amino Acids* **1999**, *17*, 57.
15. Veciana-Nogues, M.T.; Hernandez-Jover, T.; Marine-Font, A.; Vidal-Carou, M.C. Liquid Chromatographic Method for Determination of Biogenic Amines in Fish and Fish Products. *J. AOAC Intl.* **1995**, *78* (4), 1045–1050.
16. Antolini, F.; Franciosini, S.; Floridi, A.L.; Floridi, A. An Ion-Pair HPLC Method for the Determination of Histamine, Tyramine, Tryptamine, β -Phenylethylamine and Their Amino Acid Precursors in Cheeses for Industrial Purposes. *Ital. J. Food Sci.* **1999**, *11* (4), 335–345.
17. Salazar, M.T.; Smith, T.K.; Harris, A. High-Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Biogenic Amines in Feedstuffs, Complete Feeds, and Animal Tissues. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1708–1712.
18. Mollins-Legua, C.; Campíns-Falco, P.; Sevillano-Cabeza, A.; Pedron-Pons, M. Urine Polyamines Determination Using Dansyl Chloride Derivatization in Solid-Phase Extraction Cartridges and HPLC. *Analyst* **1999**, *124*, 477–482.

Received March 13, 2002

Accepted May 1, 2002

Manuscript 5842

Discrimination of Green Coffees (Arabica and Robusta) Based on Free and Conjugated Biogenic Amines

Susana Casal, Eulália Mendes, M. Rui Alves,^a Rita C. Alves,
M. Beatriz P.P. Oliveira, and Margarida A. Ferreira.

REQUIMTE, Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto,
R. Anibal Cunha, 164, 4099-030 Porto, Portugal, and ^aESTG, Instituto Politécnico de Viana do Castelo,
Av. do Atlântico, aptd. 574, 4900 Viana do Castelo, Portugal

This work reports the composition of robusta and arabica coffees in terms of biogenic amines. The analyses were conducted before and after acid hydrolysis aiming the determination of both free and conjugated forms. The amines (putrescine, cadaverine, serotonin, tyramine, spermidine, and spermine) were determined by RP-HPLC, after derivatization with dansyl chloride. Multivariate analyses were applied in order to use these amines as chemical descriptors of arabica and/or robusta coffees. It was found that putrescine, the main biogenic amine present, can be used in the discrimination of the referred species. There is also some evidence that these compounds could be used for discrimination between green coffees subjected to different post-harvest processes and that tyramine could be considered a chemical marker for Angolan robustas. Free biogenic amine levels in roasted coffees are also discussed.

KEYWORDS: Coffee; biogenic amines; free; conjugated; discriminant analysis; geographical origin; processing method.

INTRODUCTION

The *Coffea* family includes many species and varieties. The two species more commercially available are *C. arabica* L., the oldest-known species with numerous varieties, and *C. canephora*, usually called robusta, its most productive variety. One of robusta main advantage is its resistance to disease, but its flavor is not as desirable as that of arabica. Consequently, robusta accounts only for around 25% of world coffee production, in spite of its cheaper price. Robusta is primarily used in blends, where its full body is appreciated, and also in soluble or instant coffee production (1).

The green coffees produced are usually traded

as “milds” (wet-processed arabica), Brazilian and other arabicas (dry-processed arabicas) and robusta (dry-processed) (2). For quality and economical reasons, it is very important to guarantee coffee authenticity, not only discriminating species, but also their geographical origin and processing method (3).

Different approaches and techniques have been used to access coffee authenticity. Several groups of compounds have been used to differentiate coffee species and varieties, but despite the huge amount of work in the area, no specific marker as yet been found (4). The diterpene 16-O-methylcafestol, only found in robusta green and roasted beans, is probably, and up to date, the best marker for the presence of small amounts of

robusta beans in arabica coffee (5). Also, with regard to the geographical origin, no method has yet been claimed to be able of carrying out such an assessment with no ambiguity.

Following our previous studies on chemical descriptors for arabica and robusta coffees (6-8), here the biogenic amines are also analyzed with the same objective. These amines are important nitrogen compounds of low molecular weight, with an aliphatic (putrescine, cadaverine, spermidine and spermine), aromatic (tyramine) or heterocyclic structure (histamine, serotonin) (9). They are endogenous constituents of vegetable, microbial, and animal cells, presenting biological activity. Thus, they can be found in the raw materials, and their levels can vary widely depending on variety, ripening stage and storage conditions (10). These amines are usually formed by endogenous decarboxylation of amino acids or by decarboxylase-positive microorganisms under favorable conditions to enzyme activity (11).

Several biogenic amines play important roles in human and animal physiological functions. In plants, the so-called polyamines (putrescine, spermidine and spermine) are also implicated in numerous processes (12). Although their exact mechanisms of action are yet to be elucidated, accumulated evidence in plant and animal cells supports the idea that, besides biophysiological effects on membranes and nucleic acids, polyamines interact with protein kinases and transcription factors, and are thus involved in signal transduction pathways (13).

Biogenic amines are known to be present in a wide range of food products including fish, meat, dairy products, vegetables, fruit, nuts, chocolate, wine, and beer (9-11, 14), but references on coffee are very scarce. Amorim *et al.* (1977) reported free polyamines contents of arabica coffee for the first time (15), aiming to find correlations between their levels and beverage quality. More recently, were carried out preliminary studies on free biogenic amines levels in some arabica and robusta coffee samples, gathering some evidence that these compounds

could be used as chemical markers for the two coffee species (16). The recent work of Cirilo *et al.* (17) complemented these observations, although only on arabica samples again.

In higher plants, the biogenic amines can occur in free form, bounded electrostatically to negatively charged molecules, or conjugated with small molecules (i.e. phenolic acids) or larger ones (i.e. proteins) (18). These conjugates occur as both water soluble and insoluble forms (19). The conjugation to cinnamic acids originates the hydroxy-cinnamic acid amides (HCAAs), the main phenolic constituents of reproductive organs and seeds in some plant species (20). Recent works also suggest correlations between the accumulation of HCAAs and plant defense to pathogens (19). The deposition of HCAAs in the cell wall is believed to create a barrier against pathogens by reducing cell wall digestibility and/or inhibiting indirectly the pathogen growth (21). Since robusta coffees show higher resistance to several diseases in comparison to arabica ones (22), its contents in HCAAs, as well as its substantial higher levels of cinnamic acids (23), are probably implicated in the phenomenon. Nowadays, important efforts of coffee researchers are directed towards the minimization of insects and diseases impacts in coffee plants, and the knowledge of the role of HCAAs in the mechanisms of resistance may lead to a breakthrough in hybridization processes.

Following our works on coffee biogenic amines (16) the aims of the present work were (i) to determine the composition of green coffees of arabica and robusta species in terms of free and conjugated biogenic amines, and (ii) to study the usefulness of these compounds as discriminators of this most representative coffee species. The possibility of the utilization of these compounds as markers in the field of authenticity studies for the assessment of coffee geographical origin, or even on the discrimination of the post-harvest processing method applied to coffee beans (either wet or dry process), were secondary aims pursued in this work.

MATERIAL AND METHODS

Reagents. The amines hydrochlorides (putrescine, cadaverine, serotonin, tyramine, spermidine, and spermine), the internal standard (1,7-diaminoheptane), and the dansyl chloride were all Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). All other reagents were analytical or HPLC grade, mostly from Merck (Darmstadt, Germany).

Coffee samples. A local broker and industrial coffee roaster supplied all coffee samples, and was able to confirm their botanical and geographical origin, as well as the general type of post-harvest processing method (dry/wet process). No further details were known on the sample's historical background. Sample's moisture contents were determined in order to express the results on a dry weight (dw) basis. Samples were labeled with a first character indicating the coffee species (A = arabica, R = robusta) and a second character indicating the post-harvest processing treatment (D = dry, W = wet). These two characters were followed by a hyphen and another character for geographical origin (using the characters underlined in the country names shown below), and finally one figure indicating the sample number within each country.

A total of 30 coffee samples (19 robustas and 11 arabicas) from distinct geographical origins were analyzed, being representative of the coffees generally consumed in Portugal, usually for espresso blends. Regarding robusta coffee, 16 samples came from Africa (Ivory Coast (6), Angola (5), Uganda (3), and Cameroon (2)), and 3 from Asia (Vietnam (2), and India (1)). Among the arabicas, 5 samples came from Central America (Costa Rica (2), Guatemala (1), Mexico (1), and Honduras (1)), and 6 from South America (Brazil (5), and Colombia (1)).

Sample preparation.

Biogenic Amines extraction. The biogenic amines extraction was based on published

literature (24,25), with small modifications. Briefly, 500 mg of ground coffee were macerated with 8.0 ml of 5% (w/v) trichloroacetic acid (TCA), and left overnight at 4°C. After centrifugation, the supernatant and residue were kept for further treatments. Free biogenic amines were determined directly from the supernatant. Conjugated amines were extracted by hydrolyzing an aliquot of the supernatant with 12 M HCl (1:1, v/v) for 18h at 110°C, on a Reacti-therm heating module (Pierce, USA). This last fraction contained the free polyamines as well as the acid-soluble ones liberated by hydrolysis. The residue, containing the acid-insoluble conjugates, was washed two times with 5% TCA, neutralized with 1.0 M NaOH to the original volume, and stored overnight at 4°C. An aliquot of the re-suspended residue was then hydrolyzed as described above. Both hydrolyzed suspensions, containing the liberated acid-soluble and the acid insoluble conjugates, were filtered (0.45 µm), taken to dryness under a nitrogen stream (50°C), and re-suspended in 1.0 ml of 5% TCA.

Clean-up. A 1.0 ml portion of sample extracts was subjected to an ion-pair clean-up with *bis*-2-ethylhexylphosphate (BEHPA) as described in Casal *et al.* (16). The polyamines were initially extracted with 0.1M BEHPA in chloroform (2 ml), after adjustment to pH 7.4 with 0.2 M phosphate buffer, and back-extracted with 0.1M HCl (2 ml).

Derivatization procedure. The amine aqueous extracts were dansylated at controlled pH (11.2) with 1.0 ml of 7.5 mg/ml dansyl chloride in acetone, in the presence of 1.0 ml saturated sodium carbonate, for 12 min at 60°C, according with the method previously developed (16). The excess of dansyl chloride was converted to dansylproline and the derivatives extracted with toluene. The toluene phase was collected, dried under nitrogen, and the residues solubilized in acetonitrile.

HPLC Analysis. The liquid chromatograph consisted of a Jasco integrated system (Japan) equipped with two model PU-980 pumps, a AS-950 automated injector, a MD-910

multiwavelength diode array detector (DAD), and a FP-920 fluorimetric detector (exc: 252nm, em: 500nm). A reversed-phase Tracer-Excel 120 ODS-A (250 x 4 mm i.d., 5µm) column (Teknokroma, Spain) was used, operating at 40°C, with a gradient of 0.05 M phosphoric acid and methanol/acetonitrile, as reported in Hornero *et al.* (26).

Quantification was based on the internal standard method, using 1,7-diaminoheptane. The DAD response at 254 nm was used for serotonin quantification, while all other amines were quantified by their fluorescence signal response.

Statistical Data Treatment. Univariate statistics (means, standard deviations and extreme and quartile values) were calculated for general data inspection and description. Cluster analysis, following the Ward's method with Euclidean distances, was carried out based on all individual coffees analyzed. After dividing samples into three groups (robusta dry processed, arabica wet processed and arabica dry processed), the following analyses were also carried out: (i) MANOVA applied to the three coffee groups for determination of differences between them with all groups and amines taken simultaneously; (ii) Hotelling's T^2 tests following significant MANOVAs for determination of significantly different groups, applied to all different pairs of groups; (iii) *t* tests for univariate analysis of amines for which between-group differences were significant; (iv) canonical variate analysis (standard discriminant

analysis) to determine the main amines responsible for the observed between-groups differences, and also to enable the construction of graphs for visualization of the magnitude of differences.

All statistical methods were standard (27) and applied as implemented in the Statistica for Windows statistical package (StatSoft, Tulsa, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

The classical extraction procedure used allows the classification of the biogenic amines into three groups: free, soluble conjugated, and insoluble bounded (13). The composition of robusta and arabica green coffee samples, in terms of these three fractions, is presented in **Table 1**. The results are expressed as their mean values and standard deviations over all samples of the same coffee species, each one analyzed at least in duplicate, and with the significant differences assigned.

Generally, putrescine was the most abundant amine in both species, followed by spermidine, spermine, and serotonin. Cadaverine and tyramine were present in very low levels. Except for spermine, all biogenic amines were higher in the free form. The differences between the two species were highly significant in what concerns putrescine, both free and as acid-insoluble conjugates, with higher values for the arabica samples in both cases. Differences were also significant for free cadaverine and tyramine. The levels of tyramine and putrescine also changed

Table 1. Free and conjugated biogenic amines in Arabica and Robusta green coffee (mg/kg dw)

Biogenic amine	Free					Acid-soluble conjugates					Acid-insoluble conjugates				
	Arabica		Robusta			Arabica		Robusta			Arabica		Robusta		
	mean	Sd	Mean	SD	<i>t</i> -test ^a	mean	SD	Mean	SD	<i>t</i> -test	mean	SD	Mean	SD	<i>t</i> -test
Putrescine	47.9	11.4	11.1	3.6	***	3.7	2.8	3.2	2.4	ns	2.9	0.8	0.6	0.3	***
Cadaverine	0.2	0.2	0.4	0.2	*	0.3	0.2	0.4	0.3	ns	0.1	0.1	0.1	0.1	ns
Serotonine	2.5	0.7	2.1	0.8	ns	0.8	0.6	1.2	0.9	ns	nd		nd		ns
Tyramine	0.2	0.1	3.1	4.6	*	0.2	0.2	2.4	3.2	*	0.4	0.3	0.9	0.8	ns
Spermidine	9.0	3.0	8.3	2.8	ns	3.5	2.7	2.6	3.0	ns	0.5	0.2	0.4	0.2	ns
Spermine	5.5	3.3	6.0	3.8	ns	2.0	2.6	3.6	3.4	ns	5.8	1.7	5.2	1.7	ns

nd - not detectable; SD - Standard deviation;

a * significant differences (P < 0.05), ** significant differences (P < 0.01), *** significant differences (P < 0.001), ns - not significant differences.

significantly in the conjugated soluble and insoluble fractions, respectively.

Since the free fraction seems to be the most promising for the discrimination purposes between the two species, a more detailed presentation is given in **Figure 1**, in the form of conventional box and whiskers plots, displaying, for each variable and each coffee species, the extreme values and quartiles. All values are expressed in mg/kg on a dry weight basis (dw).

It can be seen in Figure 1 that there is a clear distinction between arabica and robusta samples in what concerns to the free putrescine levels. In the same figure it can be observed that cadaverine, serotonin, spermidine and spermine values vary widely, but assume similar levels in both species. The graphs show that although some amines change significantly between species, the change is not as clear as it would be desired regarding the need for chemical markers. The values presented by tyramine will be discussed later on.

The biosynthetic pathway of putrescine, spermidine and spermine, currently designed as polyamines, is relatively well established. In plants, the first step in polyamine biosynthesis is the formation of putrescine, directly from ornithine, via ornithine decarboxylase (ODC), and also indirectly from arginine by arginine decarboxylase (ADC) and

two aminopropyltransferases. Although virtually absent in animals, ADC is widespread in higher plants. Spermidine and spermine are formed by the subsequent addition of an aminopropyl moiety to putrescine and spermidine, respectively, as a consequence of reactions catalyzed by aminopropyltransferases (spermidine synthase and spermine synthase). Cadaverine formation seems to occur mainly from lysine, tyramine from tyrosine, and serotonin (5-hydroxytryptamine) from tryptophan, by specific enzymes (10,12,21,28).

The higher putrescine contents in the arabica variety could be explained by the fact that this variety might display higher contents of the precursor's ornithine and arginine. However, based on published literature and also on a recent work carried out in our laboratory using the same coffee samples (7), it was verified that the ornithine contents are very small and similar in both species, while arginine, although existing in much higher amounts than ornithine, shows wide variations either between- and within-species, sometimes higher in arabicas (29) sometimes lower (30). Other possible relationship with amino acid levels may exist regarding glutamic acid, an ornithine precursor (10), and the only free amino acid reported in higher quantities in arabicas than in robustas. A better knowledge of the activities of enzymes involved in putrescine biosynthesis, namely ODC and ADC,

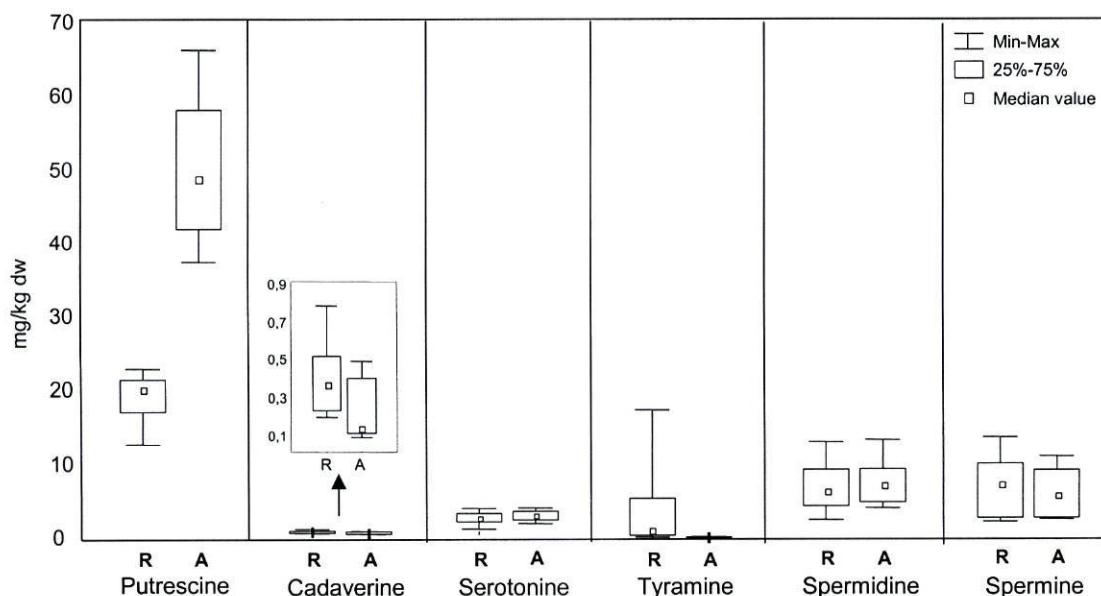


Figure 1. Detailed presentation of the free biogenic amines in the green coffee samples analyzed.

would be helpful in the explanation of the high levels detected in arabica coffees.

It has also been shown that some biogenic amines, namely putrescine, can act as radical scavengers, inhibiting the oxidation of polyunsaturated fatty acids (31). Since arabica coffees contains significantly higher amounts of total lipids, most of which unsaturated, its higher putrescine levels could be implicated in protection against oxidation.

It is important to mention that, despite the higher amounts of putrescine in arabica samples, the spermidine and spermine levels were quite similar in the two species, indicating that their levels are probably under tight homeostatic regulation (19). Cadaverine was slightly higher in the robusta samples, although its precursor lysine, is described in equivalent amounts between the two species (7,30).

The levels of tyramine in robusta coffees varied substantially, although the median value was very close to the arabica's one (Fig. 1). A closer inspection of results showed that the large difference between the median and the maximum values were mainly due to the five robusta coffees from Angola, coming from two distinct geographical locations (Amboim and Ambriz). These coffees, with 9.7 ± 4.7 mg/kg dw and 0.8 ± 0.4 mg/kg dw respectively, were found to be statistically different ($p < 0.0001$) from the other robustas. Also, the remaining robustas (i.e., from other countries) were still found to be statistically different from the arabicas ($p < 0.001$). As tyrosine is the precursor for tyramine, the levels of tyrosine in the samples were checked (7); they followed the same pattern as those of tyramine, i.e., tyrosine levels were also statistically different between robustas from Angola and from other countries ($p < 0.001$), a fact not noticed previously (7).

These results are on line with published observations on coffee samples from Angola, a country that has already been an important world coffee producer. According to these studies, caffeoyltyrosine could be classified as an important marker for Angolan robustas (32,33). Our own observations showed that robusta coffees also

contained high levels of acid-soluble conjugated forms (Table 1), a part of which may be attributed to hydroxycinnamoyltyramines. Since the compound was not detected in Angolan arabicas, the differences are more likely to be due to genetic factors rather than agricultural practices, as reported by Correia *et al.* (33).

In the so-called "wet process", the most common post-harvest treatment used in arabica coffees, fermentation is performed in order to remove the remaining adherent mucilage (34). One could expect to find higher free biogenic amines levels in the wet processed samples due to the naturally present coffee enzymes and to the action of microorganisms. Putrescine values were indeed significantly higher ($p < 0.001$) in the wet-processed ones (58.6 ± 5.9 mg/kg dw) when compared to the dry-processed ones (38.9 ± 4.7 mg/kg dw). Recent studies on the microbiology and biochemistry of coffee fermentation indicate that the mucilage decomposition seems to be more correlated with acidification rather than with enzymatic pectolysis (35,36). Therefore, microbial growth of lactic acid population is necessary in order to decrease pH. It is also described that several microorganisms produce polyamines as part of a homeostatic mechanism to keep intracellular pH at a constant value (37), an additional contribution to the formation of putrescine. The higher levels in the wet-processed samples are in accordance with our initial expectations, reconfirming putrescine as an important compound in further studies.

In order to use the free biogenic amines, namely putrescine, as chemical descriptors for the two coffee species, we have further analyzed our results by employing multiple statistical techniques. The free fraction was chosen because it was simultaneously the major one, the easiest to analyze chemically, and the one showing higher statistical differences between species, as previously observed in Table 1.

Cluster analysis was carried out in order to search for natural groupings based on the studied biogenic amines, with the corresponding dendrogram being shown in **Figure 2**.

It is immediately obvious that there is a sharp distinction between robusta and arabica coffees, forming two distinct clusters, which means that the biogenic amines provide a distinction between these two coffee species. Based on the same cluster analysis, a sub-division of the arabica cluster in a “wet process” cluster and a “dry process” cluster is also evident. Also, inside the robusta cluster, the samples from Angola are included in a distinct cluster, probably due to their tyramine content, as discussed before. In order to determine the most important biogenic amines for discrimination between the three groups considered, a discriminant analysis, using the standard method, was carried out.

Since there are three groups defined, canonical variate analysis defines only two canonical variates, with a relative importance given by the corresponding eigen value. **Figure 3** shows the plot of the two canonical variates. The first variate, with an eigen value equal to 24.9, represents the main structure (97% of the total variation in the data values), and explains the separation between robusta and arabica species. This separation is a direct consequence of the higher levels of putrescine in the arabica samples: this amine can, thus, be used for species discrimination.

The second variate, with an eigen value of 0.7 (3% of the total variation) shows that the second data structure is the discrimination between samples of the arabica species subjected to different post-harvest treatments. Wet processed arabicas are distinguished by higher levels of putrescine and spermine, and lower levels of spermidine. The differences due to processing method are significant only at the level $p \cong 0.09$ as shown by an Hotelling's T^2 test, due to a wet processed sample similar to the dry processed ones, reminding that these observations must be seen with caution due to the reduced number of samples used.

Following the results presented herein, it remained to check if the free biogenic amines can be used as chemical descriptors between arabica and robusta samples after roast, even knowing that these compounds are almost totally lost during the roasting stage (15-17). A standard method was used in the roasting procedure (160-220°C, 14 min) corresponding to a dark roast, as generally used in Portugal. All the major amines were still detectable after roast, but in very low amounts, and without significant statistical differences. These preliminary results are reported on **Table 2**.

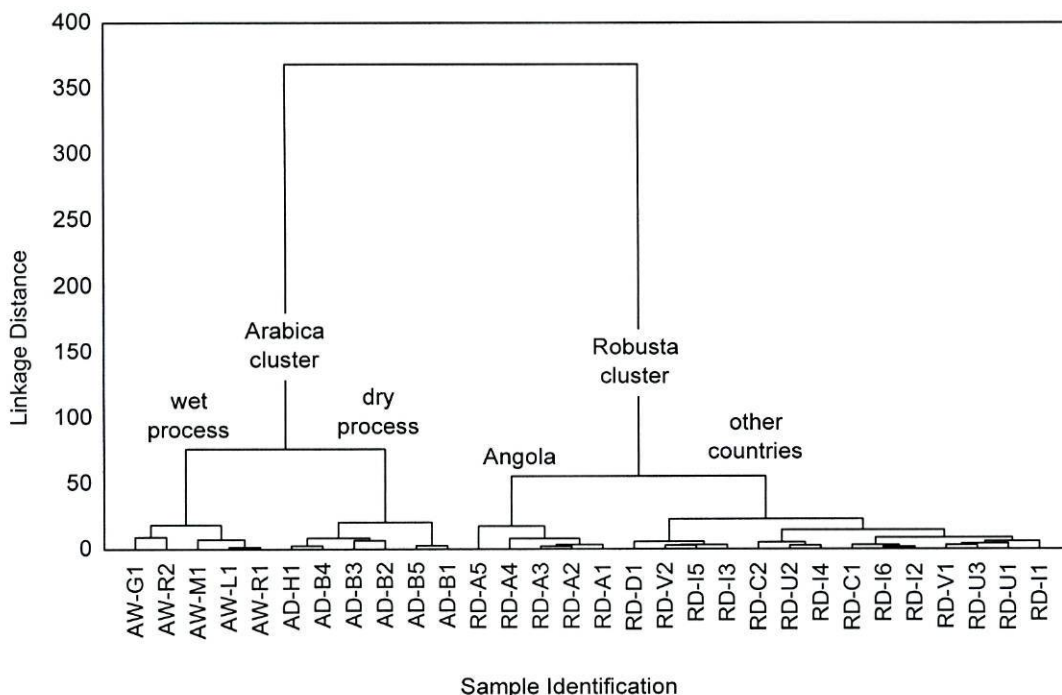


Figure 2. Dendrogram expressing the results of cluster analysis on the free biogenic amines content of green coffee samples.

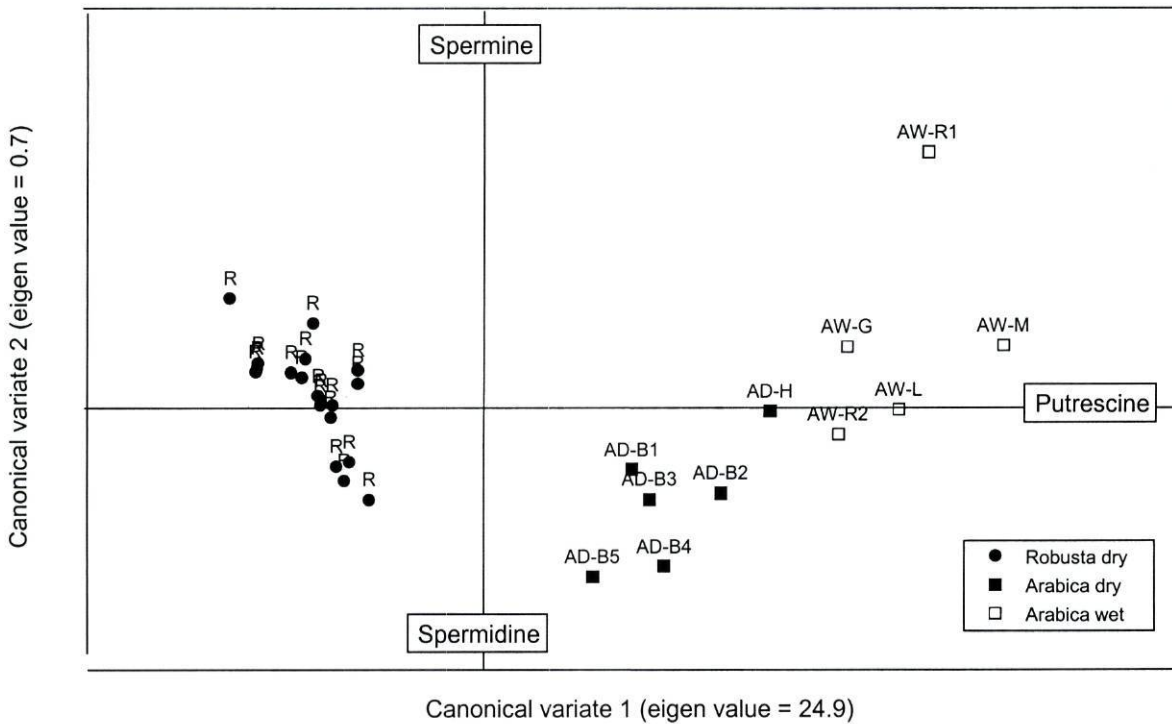


Figure 3. Canonical variate 1 vs 2 of free biogenic amines data.

Serotonin was the most resistant amine to roast and was also the one exhibiting some differences between species, with higher amounts for the robusta samples. As discussed before, serotonin content in the green samples was very similar in both species and was undetectable as an acid insoluble conjugated form. The presence of high amounts of serotonin in the roasted coffee, when compared with the other amines, can be interesting from the point of view of its physiological action once in the beverage.

Table 2. Free biogenic amines in Arabica and Robusta roasted coffee (mg/kg dw)

Biogenic amine	Free				t-test ^a
	Arabica		Robusta		
	mean	SD	mean	SD	
Putrescine	1.0	0.9	1.3	1.2	ns
Cadaverine	nd		nd		
Serotonin	2.3	1.2	3.3	0.8	*
Tyramine	nd		nd		
Spermidine	0.1	0.1	0.1	0.1	ns
Spermine	1.2	0.6	1.8	0.8	ns

nd - not detectable;SD - Standard deviation;

^ans - not significant differences,* significant differences (P < 0.05).

Serotonin is described as being a neurotransmitter and biochemical regulator, formed by hydroxylation and decarboxylation of tryptophan. In humans it acts as a mediator in numerous physiological functions, including neurological transition, gastrointestinal motility, homeostasis and vascular integrity, and might play a key role in the etiology of depression, suicide, and hunger (38). A decrease in serotonergic neurotransmission has been proposed to The presence of free serotonin and conjugated with fatty acids (39,40) has already been described in coffee. Its presence in the coffee beverage would help to understand why moderate coffee drinkers are less likely to commit suicide (41), or why a couple of coups of coffee reduce appetite. More recently, several serotonin conjugates have been associated with some important biological activities as lipid regulators (42).

Studies on the roasted coffees conjugated fractions are being conducted in our laboratory in order to find if they can be used for discriminative purposes, although evaluating from the green

samples results observed, this seems rather unpromising.

It would be necessary to analyze the biogenic amines that are extractable into the final coffee beverage, in order to reach any conclusion on the implication of these compounds in coffee physiological effects. In this aspect it is important to keep in mind that some biogenic amines conjugates are water soluble, namely the basic HCAAs containing the aliphatic polyamines, being probably extracted into the brew.

It should be mentioned that the biogenic amines are also important food aroma components and potential precursors for the formation of carcinogenic *N*-nitroso compounds. Although coffee itself is devoid of nitrite (15), interaction might exist during the simultaneous ingestion of other nitrite-containing foods and precursor amines.

As a general conclusion one can say that putrescine shows high potential as coffee species' discriminator. The analysis of putrescine, by means of a rapid enzymatic test, could constitute a rapid method for discrimination between arabica and robusta samples and, probably, also on the processing method assessment. It must be realized, however, that the present investigation is mainly a way of obtaining tentative information about differences between processing methods. The material used is too small in range for any definitive conclusions on significant differences between the two post-harvest processes. These studies should now be complemented with the nature of the conjugation involved, namely with hydroxycinnamic acids, since these compounds seem promising in other plants as defense mechanisms against pathogens.

ACKNOWLEDGMENT

S.C. is indebted to "Subprograma Ciência e Tecnologia do 2º Quadro Comunitário de Apoio" (BD/9580/96) for financial assistance. M.R.A. was involved in a Ph.D. program sponsored by Concurso 4/5.3/PRODEP 2000.

LITERATURE CITED

1. Smith, A.W. Introduction. In *Coffee: Vol.1 Chemistry*, Clarke, R.J., Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science Publishers: London, **1987**, chp.1, 1-44.
2. Marshall, C.F. World Coffee trade. In *Coffee: botany, biochemistry, and production of beans and beverage*; Clifford, M.N., Wilson, K.C., Eds.; Croom Helm: Beckenham, U.K., **1985**, chp. 11, 251-283.
3. Prodolliet, J., Authenticity of coffee, in *Food Authentication*; Ashurst, P.R., Dennis, M.J., Eds.; Blackie Academic & Professional - Chapman & Hall: London, **1996**, chp. 9, 304-338.
4. Trugo, L.C. Analysis of coffee products, in *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, Caballero, B. Trugo, L., Finglas, P. Eds.; Academic Press: London, **2003**, 1498-1506.
5. Speer, K.; Kölling-Speer, I., Lipids. In *Coffee – Recent developments*, Clarke, R.J., Vitzthum, O.G., Eds.; Blackwell Science Ltd.: U.K., **2001**, chp. 1c, 36-41.
6. Casal, S., Oliveira, M.B.P.P., Alves, M.R., Ferreira, M.A. Discriminate analysis of roasted coffee varieties for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine content, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 3420-3424.
7. Casal, S.; Alves, M.R.; Mendes, E.; Oliveira, M.B.P.P.; Ferreira, M.A. Discrimination between Arabica and Robusta Coffee Species on the Basis of their Amino Acid Enantiomers, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 6495-6501.
8. Alves, M.R., Casal, S. Oliveira, M. B.P.P., and Ferreira, M.A., Contribution of fatty acid profile obtained by HRGC / chemometric-techniques to the authenticity of green and roasted varieties, *JAOCS*, **2003**, 80, 511-517.
9. Santos, M.H.S. Biogenic amines: their importance in foods, *Int. J. Food Microb.* **1996**, 29, 213-231.
10. Halász, A., Caráth, Á., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W., Biogenic amines and their production by microorganisms in food, *Trends in Food Science & Technology*, **1994**, 5, 42-49.
11. Brink, B, Damink, C., Joosten, H.M.L.J., Huis in't Veld, J.H.J. Occurrence and formation of biologically active amines in food, *Int. J. Food Microb.* **1990**, 11, 73-84.
12. Bais, H.P., Ravishankar, G.A., Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **2002**, 69, 1-34.
13. Coué, I., Hummel, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., Amrani, A. Involvement of polyamines in root development, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **2004**, 76, 1-10.
14. Bardócz, S., Duguid, T.J., Brown, D.S., Grant, G.,

- Pusztai, A., White, A., Ralph, A., The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth, *British Journal of Nutrition*, **1995**, 73, 819-828.
15. Amorim, H.V., Basso, L.C., Crocorno, O.J., Teixeira, A.A. Polyamines in green and roasted coffee, *J. Agric. Food Chem.*, **1977**, 25, 957-958.
 16. Casal, S., Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, M.A., Determination of biogenic amines in coffee by an optimized liquid chromatographic method, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **2002**, 25, 2535-2549.
 17. Cirilo, M..PG., Coelho, A.F.S., Araújo, C.M., Gonçalves, F.R.B., Nogueira, F.D., Glória, M.B.A., Profiles and levels of bioactive amines in green and roasted coffee, *Food Chemistry*, **2003**, 82, 397-402.
 18. Martin-Tanguy, J., Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical molecular and physiological approaches, *Physiologia Plantarum*, **1997**, 100, 675-688.
 19. Walters, D.R., Polyamines and plant disease, *Phytochemistry*, **2003**, 64, 97-107.
 20. Martin-Tanguy, J. The occurrence and possible function of hydroxycinnamoyl acid amines in plants, *Plant Growth Regul.*, **1985**, 3, 381-399.
 22. Waller, J.M., Control of coffee diseases. In *Coffee: botany, biochemistry, and production of beans and beverage*; Clifford, M.N., Wilson, K.C., Eds.; Croom Helm: Beckenham, U.K., **1985**, chp. 9, 219-229.
 21. Facchini, P.J., Hagel, J., Zulak, K.G., Hydroxycinnamic acid amide metabolism: physiology and biochemistry, *Can. J. Bot./Rev. Can. Bot.*, **2002**, 80, 577-589.
 22. Clifford, M.N., Chlorogenic acids. In *Coffee: Vol.1 Chemistry*, Clarke, R.J., Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science Publishers: London, **1985**, chp.5, 153-202.
 24. Armas, R., Martinez, M., Vicente, C., Legaz, M.-E., Free and conjugated polyamines and phenols in raw and alkaline-clarified sugarcane juices *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 2086-3092.
 25. Tiburcio, A.F., Kaur-Sawiiney, R., Ingersoli, R.B., Galston, A.W., Correlation between polyamines and pyrrolidine alkaloids in developing tobacco callus, *Plant Physiol.*, **1985**, 78, 323-326.
 26. Hornero-Mendez, D., Garrido-Fernandes, A., Biogenic amines in table olives. Analysis by high-performance liquid chromatography, *Analyst*, **1994**, 119, 2037-2041.
 27. Mardia, K.V.; Kent, J.T.; Bibby, J.M. *Multivariate Analyses*, Academic Press, London, **1979**, chp. 12 and 13, 333-393.
 28. Smith, T.A., Polyamines, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **1985**, 36, 117-143.
 29. Illy, A.; Viani, R., *Espresso Coffee – The Chemistry of Quality*, Academic Press, London, **1995**.
 30. Clifford, M.N., Chemical and Physical aspects of green coffee and coffee products. In *Coffee: botany, biochemistry, and production of beans and beverage*; Clifford, M.N., Wilson, K.C., Eds.; Croom Helm: Beckenham, U.K., **1985**, chp. 13, 305-374.
 31. Løvaas, E., Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines. In *Advances in Pharmacology*, Sies, H. Ed.; Academic Press: London, **1997**, vol. 38, 119-149.
 32. Clifford, M.N., Kellard, B., Ah-Sing, E., Caffeoyltyrosine from green robusta coffee beans, *Phytochemistry*, **1989**, 28, 1989-1990.
 33. Correia, A.M.N.G., Leitão, M.C.A., Clifford, M.N., Caffeoyl-tyrosine and Angol II as characteristic markers for Angolan robusta coffees, *Food Chemistry*, **1995**, 53, 309-313.
 34. Vincent, J.-C. Green coffee processing. In *Coffee: Vol. 2 Technology*, Clarke, R.J., Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science Publishers: London, **1987**, chp. 1, 1-33.
 35. Avallone, S., Guyot, B., Brillouet, J.M., Olguin, E., Guiraud, J.P., Microbiological and biochemical study of coffee fermentation, *Current Microbiology*, **2001**, 42, 252-256.
 36. Avallone, S., Brillouet, J.M., Guyot, B., Olguin, E., Guiraud, J.P., Involvement of pectolytic microorganisms in coffee fermentation, *Int. J. Food Science and Technol.* **2002**, 37, 191-198.
 37. Flores, H.E., Young, N.D., Galston, A.W., Polyamine metabolism and plant stress. In *Cellular and Molecular Biology of Plant Stress*, Key, J.L., Kosuge, T., Eds.; Alan R. Liss, Inc.: New York, **1985**, pp. 93-114.
 38. Jacobs, B.L., Serotonin, Motor Activity and Depression-Related Disorders. *American Scientist*, **1994**, 82, 456-463.
 39. Folstar, P., van der Plas, H.C., Pilnik, W., Schols, H.A., Merger, P., Liquid chromatographic analysis of N-alkanoyl-5-hydroxytryptamine (C-5-HT) in green coffee beans, *J. Agric. Food Chem.* **1979**, 27, 12-15.
 40. Folstar, P., Schols, H.A., van der Plas, H.C., Pilnik, W., Landheer, C.A., Veldhuizen, A., New tryptamine derivatives isolated from wax of green coffee beans, *J. Agric. Food Chem.* **1980**, 28, 872-874.
 41. Kawachi, I., Willett, W.C., Colditz, G.A., Stampfer, M.J., Speizer, F.E., A prospective study of coffee drinking and suicide in women, *Arch. Intern. Med.*, **1996**, 156, 521-525.
 42. Bezuglov, V.V., Bobrov, M.Y., Archakov, A.V., Bioactive amides of fatty acids, *Biochemistry (Moscow)*, **1998**, 63, 27-37.

Roast Effects on Coffee Free and Conjugated Polyamines

SUSANA CASAL, EULÁLIA MENDES, M. BEATRIZ P.P. OLIVEIRA, MARGARIDA A. FERREIRA

REQUIMTE, Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto,
Rua Aníbal Cunha, 164, 4099-030, Porto, Portugal

Abstract

The effect of roast on the free and conjugated polyamines (putrescine, spermidine and spermine) was determined in two green coffee samples (Arabica and Robusta). The polyamines were analyzed by HPLC, as dansyl derivatives, after an extraction/hydrolysis procedure able to extract the conjugated polyamines. During roasting a significant change in the polyamines profile and levels, both free and conjugated, was observed. Putrescine was the major polyamine present, followed by spermidine and spermine. The conjugated polyamines were more resistant to the roasting process than the free ones. For the darker roasts only vestigial amounts of PAs were found, mainly in the conjugated form. The total putrescine content was substantially higher in the Arabica sample than in the Robusta, but the degradation pattern during the roasting procedure was quite similar. Except for the acid-insoluble polyamine conjugates, which were higher in the Robusta sample, all other conjugates were similar. The results were compared with model heating experiments in order to provide better understanding of the polyamines behavior and matrix effect.

Key words: Coffee, polyamines, conjugated, free, roast, HPLC

1. Introduction

The diamine putrescine (Put) and the polyamines (PAs) spermidine (Spd), and spermine (Spm), constitute a class of aliphatic ubiquitous bases reported to have important functions in all living organisms, being required for their normal development [Walters, 2003]. In plants, the PAs seem to be involved in several processes mainly related to plant growth and development [Smith, 1985, Bardócz *et al.*, 1995], by activating the synthesis of nucleic acids [Walters, 2003]. Nevertheless, PAs functions remain a controversial subject among plant biologists [Walden *et al.*, 1997].

In higher plants PAs can occur in both free and conjugated forms, namely with small molecules like phenolic, fatty or amino acids, or linked to macromolecules and to the cell wall [Smith, 1975, Martin-Tanguy, 1997]. It has been shown that the amides of PAs with phenolic acids, the hydroxycinnamic acid amides, occur at high levels in some plants families [Martin-Tanguy, 1978, Tiburcio *et al.*, 1993, Kakkar and Rai, 1993] but are rarely represented outside the plant kingdom [Bagni, 1999]. Although the roles of these PAs conjugates in normal plant physiology are far from clear, they have began to attract attention due to their possible role in plant defense responses to pathogens [Walters, 2003, Fixon-Owoo *et al.*, 2003]. The conjugated

PAs are also described as being accumulated in reproductive organs and also in the seeds [Bagni, 1999], where their might may play an important role in the physiology of resting and germinating processes [Martin-Tanguy, 1978], and in the protection of the cellular components from oxidative damage [Tiburcio *et al.*, 1993, Løvaas, 1997]. These conjugates forms might also act as a polyamine reserve, which would be liberated for physiological purposes during growth and development of the plant.

PAs have been extensively analyzed in food products but data on coffee are quite scarce. The coffee beans, the seeds of the coffee plant, also contain PAs. After the first report on the PAs content in 1977 [Amorim *et al.*, 1977], only recently [Casal *et al.*, 2002, Cirilo *et al.*, 2003] attention has been again devoted to this subject. Nevertheless, on all these reports only the free PAs from Arabica samples were determined.

This work's objective was to analyze both free and conjugated PAs, in Arabica and Robusta coffee, and to study the influence of the roasting process on these compounds.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals.

The amines hydrochlorides (putrescine, spermidine, and spermine), the internal standard (1,7-diaminoheptane), and the dansyl chloride were all Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). All other reagents were analytical or HPLC grade, mostly from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Coffee thermal treatments.

Two green (unroasted) coffee samples were provided by a local industry – one from Brazil (*C. arabica* L., var. *typica*, dry processed), and other from Ivory Coast (*C. canephora* Pierre, var. *robusta*, dry-processed). The samples were roasted in a WTC blinder stove (Tuttlinger, Germany) for 15 minutes at

different temperatures (140°C, 160°C, 180°C, 200°C, 220°C, and 240°C). Sample moisture was determined by drying the ground samples at 103±2°C until constant weight, in order to express the results on a dry basis. The organic roast losses (ORL) were also calculated, in order to correct all PAs determinations for the weight loss occurring during the roasting procedure.

2.3. Model heating experiments.

A standard mixture was prepared, containing the three PAs in equivalent proportions to that presented in Robusta green coffee. Equal amounts were measured into silanized vials and taken to dryness under a gentle stream of nitrogen. The vials were heated at the same time-temperature combinations used with the coffee samples, in open and closed vials. The cold residues were dissolved in 1.0 ml of HCl 0.1M, and subjected to the derivatization procedure described below.

2.4. Extraction and hydrolysis.

The extraction procedure, based on published literature [Tiburcio *et al.*, 1985, Armas *et al.*, 1999] was as follows: ground coffee samples (500 mg, n=3) were extracted with 8.0 ml of 5% (w/v) trichloroacetic acid (TCA), overnight at 4°C (Fig. 1). After centrifugation, the supernatant contained the free polyamines and the acid-soluble polyamine conjugates. The residual deposit, containing the acid-insoluble polyamines conjugates, was washed twice with 5% TCA, resuspended with 8 ml NaOH 1M, and left overnight at 4°C. Aliquots (2.0 ml) of each original supernatant and residue suspension were hydrolyzed with 2 ml HCl 12M, for 18 h at 110°C. The hydrolyzed extracts were filtered, dried at 50°C under an air stream, and resuspended in 5% TCA.

The nonhydrolyzed TCA extract was analyzed directly for the free PAs (S fraction) whereas the hydrolyzed supernatant and residue were analyzed for the PAs liberated

from conjugates (SH and RH fractions).

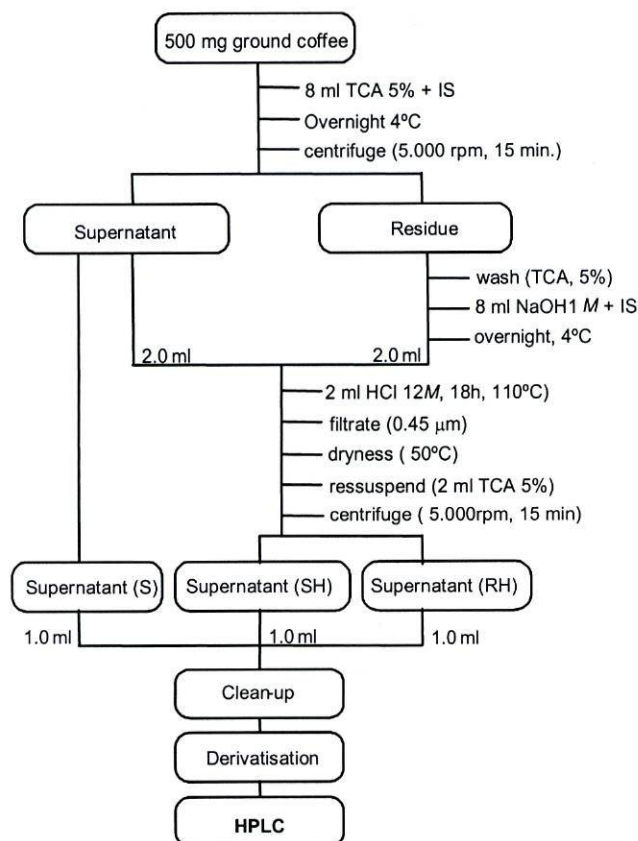


Fig. 1. Scheme for extraction and hydrolysis of coffee polyamines.

2.5. Clean-up.

A 1.0 ml portion, of sample extracts and model system standards, was subjected to an ion-pair clean-up with *bis*-2-ethylhexyl-phosphate (BEHPA) [Casal *et al.*, 2002]. Briefly, the polyamines were initially extracted with 0.1M BEHPA in chloroform, at pH 7.4, and back-extracted with 0.1M HCl.

2.6. Derivatisation and HPLC.

The amine aqueous extracts were dansylated at controlled pH (11.2) with 1.0 ml of 7.5 mg/ml dansyl chloride in acetone, in the presence of 1.0 ml saturated sodium carbonate, for 12 min at 60°C, according with the method previously developed [Casal *et al.*, 2002]. After reaction with proline, in order to consume the dansyl chloride excess, the derivatives were

extracted with toluene. The organic phase was dried, and the residues redissolved in 200 µl acetonitrile.

The HPLC equipment (Jasco, Japan) consisted of an integrated system with two model PU-980 pumps, a AS-950 automated injector, and a FP-920 fluorimetric detector (exc: 252nm, em: 500nm). The column used was a reversed-phase Tracer-Excel 120 ODSA (5µm), 25 x 0.4 cm (Teknokroma, Spain) operating at ambient temperature. Elution was performed with a linear gradient of 0.05M phosphoric acid and methanol/ acetonitrile, as reported [Hornero *et al.*, 1994].

2.7. Quantification.

Quantification was based on the external standard method. Response factors to the internal standard (1,7-diaminoheptane) were determined and calibration curves calculated for all the compounds.

3. Results and discussion

3.1. Method optimization

When compared to our previously developed extraction method for free PAs [Casal *et al.*, 2002], the overnight extraction used by Armas *et al.*, proved to be more efficient. Several experiments were also conducted in order to find the best hydrolytic conditions for the conjugated PAs in the coffee matrix. Cold hydrolysis [Armas *et al.*, 1999], was insufficient to release all PAs conjugates, especially those with putrescine, the main polyamine in the coffee samples. The Tiburcio method, a classic hot acid-hydrolysis (16h at 110°C), provided better results and was therefore chosen in this work. The PAs stability during the process was confirmed by heating PAs standard solutions under the hydrolytic conditions fixed.

3.2. Effect of roast in coffee and model dry systems

Fig. 2 represents overlaid chromatograms from the Robusta hydrolyzed SH fractions, being easily observed the reduction on the three PAs with the increasing roasting temperature. Quantitative results for the three PAs under study are showed on Table 1 and 2 for Arabica and Robusta coffee, respectively. All values are express on a dry basis, and corrected for the ORL occurred during roast.

Put was the major free polyamine in both green samples, followed by Spd and Spm.

Free Put was higher in the Arabica sample, but Spd and Spm were quite similar. Free Put and Spm represented around 80% of the total PAs, in both green samples, while free Spm represented only around 40%, again in both samples. All free PAs were extensively reduced with roasting, being absent in the darker roast

performed (ORL ≈ 25%), already outside of the usual roasting procedures. In our country, roasting is usually performed with high temperature and long roasting times (HTLT roasting), such as 8 to 12 minutes from 180-220°C, achieving máx. ORL around 15% [Illy and Viani, 1995].

The results for Arabica free PAs are in accordance with those of Amorim *et al.*, but not with Cirilo *et al.*, where Put was substantially lower. On the other hand, our Spm results were superiors to those described by the two authors. As already mentioned by Cirilo *et al.*, the differences observed could be related to Arabica coffee variety, and also to other factors such as cultivar conditions and physiological stage.

The fact that different analytical methods were used can also contribute to the differences. It will be important to analyze a

Table 1 Free and conjugated polyamines in the Arabica coffee sample (mg/kg db*)

	putrescine			spermidine			spermine		
	S	SH	RH	S	SH	RH	S	SH	RH
green	43.8	3.9	1.7	7.9	1.0	0.4	4.3	3.4	1.4
140 °C	41.9	4.0	1.6	4.1	1.1	0.2	3.4	1.0	1.1
160 °C	26.3	2.2	1.5	1.0	0.9	0.2	0.7	0.8	0.7
180 °C	4.7	1.7	1.0	0.2	0.4	0.2	0.2	0.5	0.5
200 °C	0.3	1.5	0.9	nd	0.1	0.1	0.1	0.5	0.4
220 °C	0.1	0.9	0.6	nd	0.1	0.1	0.1	0.4	0.2
240 °C	nd	0.3	0.7	nd	nd	0.1	nd	0.3	nd

* corrected for the ORL

Table 2 Free and conjugated polyamines in the Robusta coffee sample (mg/kg db*)

	putrescine			spermidine			spermine		
	S	SH	RH	S	SH	RH	S	SH	RH
green	14.3	2.6	1.3	7.4	1.2	0.4	4.3	3.0	3.1
140 °C	11.1	3.8	1.2	4.2	0.9	0.3	4.5	0.7	2.0
160 °C	5.3	2.4	1.0	1.4	0.4	0.1	1.3	0.4	1.0
180 °C	2.0	2.8	0.9	0.2	0.2	0.1	0.1	0.4	0.4
200 °C	0.2	1.0	0.2	nd	0.1	0.1	0.2	0.1	0.3
220 °C	0.1	0.7	0.2	nd	0.2	nd	0.2	0.1	0.3
240 °C	nd	0.3	0.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd

* corrected for the ORL

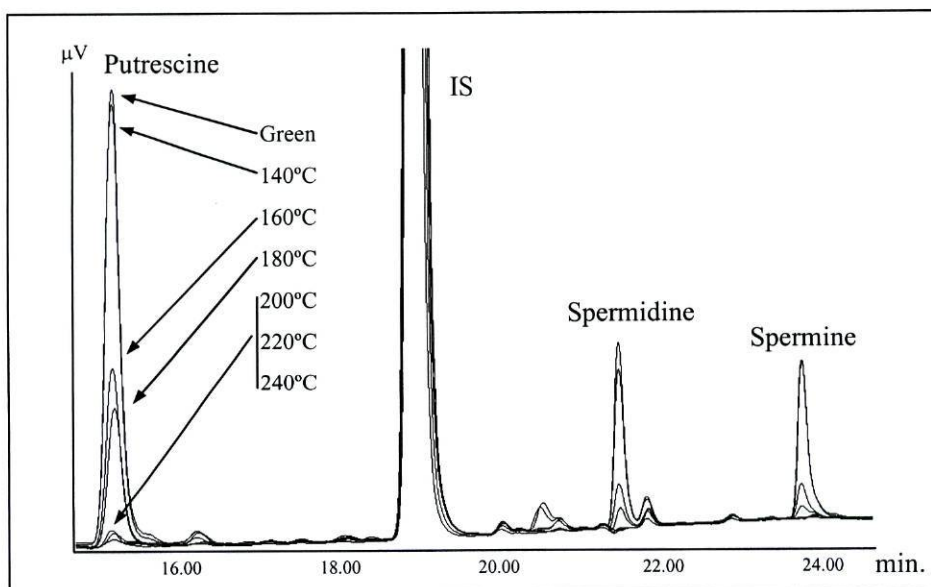


Fig. 2. Polyamine contents on the Robusta sample – overlaid chromatograms from the SH fractions at the different roasts performed.

larger number of samples in order to have conclusive results. We were unable to confirm PA Robusta contents since the PAs described in the literature are only for Arabica coffees.

All PAs increased after hydrolysis indicating that they are also presented in conjugated forms. Some PAs were liberated from acid-soluble conjugates (SH) and others were obtained from the acid-insoluble residue, probably interacting with proteins or cell-wall components (RH). The Put and Spd conjugates (SH + RH) represented around 20% of the total PAs in both green coffee samples, while Spm conjugates represented around 60% of the total PAs, indicating that Spm is present mainly in the conjugated form.

As observed for the free PAs, Put conjugates were higher in the Arabica sample. Spm conjugates, and specially those from the RH fraction, were higher in the Robusta sample. The conjugated forms kept almost constant in the lower temperature range, demonstrating higher resistance to heat effects. For the higher temperatures the conjugated forms were also reduced, although remaining amounts were still detectable in the darker roast.

The PAs degradations were proportional to their inherent thermal stabilities, with Spd levels decreasing first, followed by Spm, and finally Put. The hypothesis of Spm being hydrolyzed into Spd in the lower roast temperatures could not be confirmed, since both polyamines presented a similar behavior. The increased amounts observed for Robusta free Spm at 140°C, when compared to the green sample, can probably be due to its release from conjugated forms.

When comparing the total PAs amount (S + SH + RH), as represented in Fig. 3, it can be observed that both samples presented a similar behavior, with almost linear reductions on all PAs until 180-200°C. Nevertheless, Robusta Put began to decrease at the lower temperature tested (140°C), while in Arabica that observation was more significant only after 160°C.

In order to find a possible matrix influence on the PAs behavior we have also analyzed the PAs on two model dry systems - open and closed vials - as described in experimental.

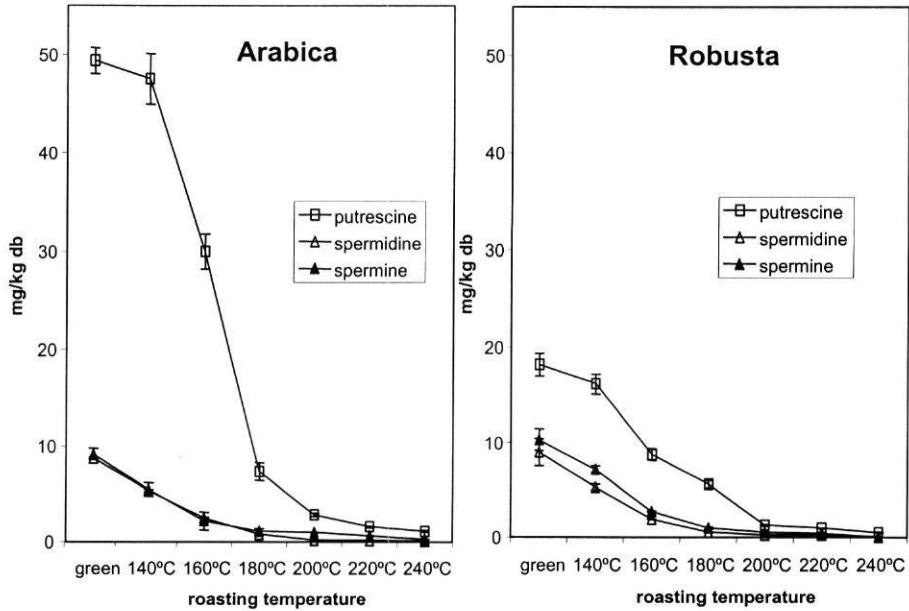


Fig. 3. Total polyamines contents on the Arabica and Robusta samples.

Fig. 4 represents the results of those experiments. Generally, a small decrease in all PAs was observed in the closed vials, while in the open ones they were extensively reduced. Those reductions were higher after their boiling points being achieved, that is: around 130 °C for Spm, 140 °C for Spm and 160 °C for Put [Merck, 2001]. Spm degradation rate was higher than that of Spd, suggesting that probably some Spm is hydrolyzed. These observations can explain that the losses on the open vials are due simply to evaporation, since the compounds are only slightly degraded in the closed vials. When comparing to the behavior in the coffee samples, the coffee matrix can be compared to a closed system during the initial temperatures, or the so called “drying phase” [Illy and Viani, 1995]. For the higher temperatures, the actual roasting phase, an open system is more likely, being the PAs intensively reduced.

The fact that many components that might interact with the PAs are present in coffee, justifies that the PAs might be transformed into other components and not simply evaporated. The fate of all the PAs lost during coffee roasting has yet to be elucidated, but they can

be volatile precursors of important aroma compounds or potential precursors of the carcinogenic *N*-nitroso compounds [Sen *et al.*, 1990].

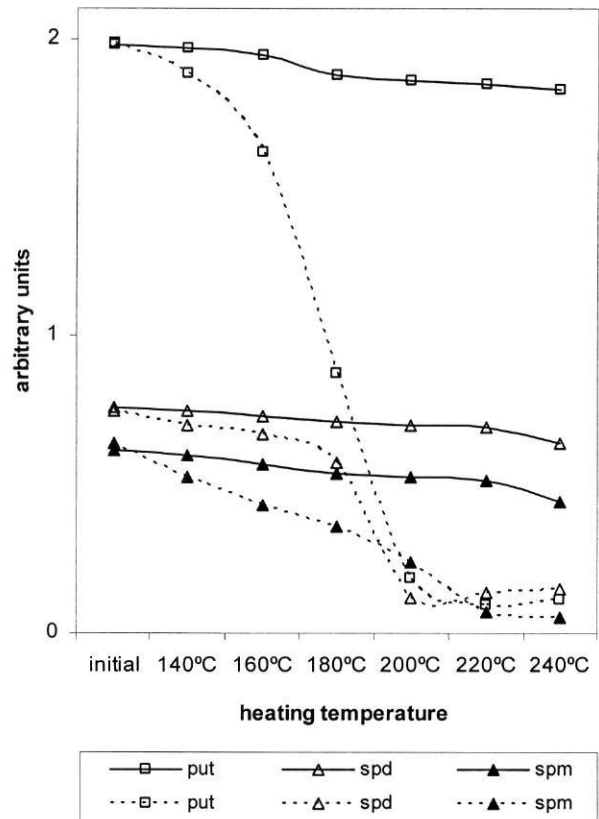


Fig. 4. Polyamines behavior under the model dry systems.

Although no apparent differences were found in the PAs conjugated amounts between the Arabica and Robusta samples, it would be interesting to analyze other minor biogenic amines, like tyramine, and the conjugated phenolics involved, also described as being important in the plant defense mechanisms. The isolated fractions (S, SH and RH) can be directly analyzed for chlorogenic acid subgroups, namely the more abundant feruloylquinic, caffeoylquinic and dicaffeoylquinic [Clifford *et al.*, 2003]. Alkaline hydrolysis is also possible with the extracts being analyzed for total phenolic acids [Andrade *et al.*, 1997, Nardini and Ghiselli, 2004].

If the PAs conjugates have some involvement in Robusta resistance towards diseases and pest, namely resistance to rust (*Hemilea vastatrix*), the issue will probably be more related with the conjugation type than with the total amounts. It would be interesting to focus on the RH fraction, the only one higher in Robusta sample. The type of conjugation involved, namely with phenolic acids, might ascertain the influence of this class of components on coffee susceptibility to diseases and pests and the development of new cultivars with optimal PA-conjugates composition and content.

Based on the preliminary results reported here, it would be important to correlate the amount and type of PAs, either free or conjugated, with the coffee variety, processing type, or even geographical origin.

Abbreviations

HPLC, high-performance liquid chromatography; S, free acid-soluble polyamines; SH, acid-soluble fraction of conjugated polyamines; RH, acid-insoluble fraction of conjugated polyamines; PAs, polyamines; Put, putrescine; Spd, spermidine, Spm, spermine.

Acknowledgments

S. Casal is indebted to "Subprograma Ciência e Tecnologia do 2º Quadro Comunitário de Apoio" (BD/9580/96) for the financial support in the beginning of this work.

References

- Amorim HV, Basso LC, Crocomo OJ, Teixeira AA (1977) *J. Agric. Food Chem.* 25: 957-958.
- Andrade PB, Leitão R, Seabra RM, Oliveira MB, Ferreira MA (1997) *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 20, 2023-2030.
- Armas R, Martinez M, Vicente C, Legaz, M-E (1999) *J Agric Food Chem* 47: 2086-3092.
- Bagni N (1999) *Amino Acids*, 17: 57.
- Bardócz S, Duguid TJ, Brown DS, Grant G, Pusztai A, White A, Ralph A (1995) *British Journal of Nutrition* 73: 819-828.
- Casal S, Oliveira MBPP, Ferreira MA (2002) *J Liq Chrom & Rel Technol* 25: 2535-2549. DOI 10.1081/JLC-120014273.
- Cirilo MPG, Coelho AFS, Araújo CM, Gonçalves FRB, Nogueira FD, Glória MBA (2003) *Food Chemistry* 82: 397-402.
- Clifford MN, Johnston KL, Knight S, Kuhnert N (2003) *J Agric Food Chem* 51:2900-2011.
- Fixon-Owoo, Levasseur F, William K, Sabado TN, Lowe M, Klose M, Mercier AJ, Fields P, Atkinson J (2003) 63: 315-334.
- Hornero-Mendez D, Garrido-Fernandes A (1994) *Analyst* 119: 2037-2041.
- Illy A, Viani R (1995) *Espresso coffee*. Academic Press, London.
- Kakkar RJ, Rai VK (1993) *Phytochemistry* 33: 1281-1288.
- Løvaas E (1997) Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines. In Sies H (ed) *Advances in Pharmacology* 38: 119-149.
- Martin-Tanguy (1978) *Phytochemistry* 17: 1927-1928.
- Martin-Tanguy J (1997) *Phisiologic Plantarum* 100:675-688.
- Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals (2001). O'Neil M J, Smith A, Heckelman P E, Obenchain Jr J R (eds), 13th edn. Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA.

- Nardini R, Ghiselli A (2004) *Food Chemistry* 84: 137-143.
- Sen, N, Seaman S, Weber D (1990) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73: 325-327.
- Smith TA (1975) *Phytochemistry* 14: 865-890.
- Smith TA (1985) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36: 117-143.
- Tiburcio AF, Campos JL, Figueras X, Besford RT (1993) *Plant Growth Regulation* 12: 331-340.
- Tiburcio AF, Kaur-Sawiiney R, Ingersoli RB, Galston AW (1985) *Plant Physiol* 78: 323-326.
- Walden R, Cordeiro A, Tiburcio AF (1997) *Plant Physiol.* 113: 1009-1013.
- Walters DR (2003) *Phytochemistry* 64: 97-107.

Capítulo 7 – Aminas heterocíclicas aromáticas

“Analysis of heterocyclic aromatic amines in foods by gas chromatography-mass spectrometry as their *tert.*-butyldimethylsilyl derivatives”

in *J. Chromatogr. A.*, 1040, 105-114, 2004

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Journal of Chromatography A, 1040 (2004) 105–114

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY Awww.elsevier.com/locate/chroma

Analysis of heterocyclic aromatic amines in foods by gas chromatography–mass spectrometry as their *tert.*-butyldimethylsilyl derivatives

S. Casal*, E. Mendes, J.O. Fernandes, M.B.P.P. Oliveira, M.A. Ferreira

REQUIMTE, Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4099-030 Porto, Portugal

Received 5 February 2004; received in revised form 26 March 2004; accepted 26 March 2004

Abstract

A derivatization method for the analysis of 12 heterocyclic aromatic amines (HAs) in food, by gas chromatography–electron impact mass spectrometry, was developed. The amines are derivatized in a one-step reaction with *N*-methyl-*N*-(*tert.*-butyldimethylsilyl)trifluoroacetamide. The derivatives are characterized by easy-to-interpret mass spectra due to the prominent ion $[M-57]^+$ by loss of a *tert.*-butyldimethylsilyl group, allowing quantification in the selected-ion monitoring mode at the picogram level. The effect of temperature, time, and reagents on the formation of the derivatives was monitored in detail. Quality parameters were evaluated in the optimum working conditions. This derivatization method is not applicable to the pyridoimidazoles Glu-P-1 and Glu-P-2 and to the β -carboline harman due to incompletely derivatization. The instability of the imidazolquinoline and imidazoquinoline derivatives, requiring their injection on the same working day, is a further drawback. This simple, rapid and accurate derivatization procedure is suitable for routine analysis, as illustrated by the analysis of some common foods. © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Food analysis; Derivatization, GC; Coffee; Amines, heterocyclic aromatic; Methyl-*tert.*-butyldimethylsilyltrifluoroacetamide

1. Introduction

Several heterocyclic aromatic amines (HAs) are potent mutagenic compounds to which humans are regularly exposed through diet and ambient environments. Some HAs present higher mutagenic activity in the Ames/*Salmonella* B₁ and benzo[*a*]pyrene [1,2]. These compounds are formed in thermally treated protein-rich foods, at the ng/g level, but are also detected in several other environments, including cooking fumes, cigarette smoke, air, rain, and river water [3]. More than twenty HAs have been isolated from several food samples and model systems, and some of their structures determined. Although suspected [4], the presence of HAs on roasted coffee was not yet confirmed [5,6].

The major pathway for the metabolic activation of HAs starts with the hydroxylation of the exocyclic amino group, catalyzed mainly by cytochrome P4501A2, followed by acetylation or sulphation to form direct-acting reactive

mutagens that alter DNA and genome. Their carcinogenic potential in humans has not been established, but the polymorphic variations in these metabolizing enzymes could modulate individual susceptibility to the intake of HAs [2,7–10].

Due to the high complexity of most food matrices and the low level of concentration of the HAs, sensitive and selective analytical methodologies are required. For the analysis of these compounds, solid-phase purification techniques are usually used [11–15], followed mainly by chromatographic techniques such as high-performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography (GC), or capillary electrophoresis [3,16,17]. Actually the leading technique for HAs analysis is liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS), but is expensive and may not be available in most laboratories. GC–MS, on the other hand, is becoming more popular in quality control laboratories mainly due to its wide range of applications and relative cost when compared with the above-mentioned LC–MS systems.

However, GC methods are only possible with less polar derivatives of these mutagenic amines, otherwise they adsorb in the GC column and elute as broad, tailing peaks. Several

* Corresponding author. Tel.: +351-222078902; fax: +351-222003977.
E-mail address: sucasal@ff.up.pt (S. Casal).

derivatization reactions are described, but only for some HAs [16].

The non-polar HAs (Trp-P-1, Trp-P-2, A α C, MeA α C, harman and norharman) (see Table 1 for nomenclature) were determined in meat products by GC–MS without derivatization [18], but contamination of the ion source through the deposition of non-volatile material was observed. Generally, the commonly used derivatization reactions for GC fit into one of three categories: alkylation, acylation, and silylation. Since 1988 Murray's team has been working with the alkylated di(3,5-bis(trifluoromethyl)benzyl) derivatives (3,5-bisTFMBB) for the quantification of three HAs: MeIQx, 4,8-DiMeIQx and PhIP, by employing negative chemical ionization GC–MS [19–21]. Following these works, Tikkanen et al. [22] also used the 3,5-bisTFMBB derivatives to analyze the same three HAs in several foods and Vainiotalo et al. [23] analyzed cooking fumes by electron impact ionization (EI) and selected ion monitoring (SIM). More recently, Richling et al. [24] extended this methodology to 10HAs, also as their 3,5-bisTFMBB derivatives, and analyzed them by GC–EI–MS. Among the several derivatization reagents tested for HAs by Kataoka et al. [25], the *N,N*-dimethylaminomethylene derivatives formed by alkylation with *N,N*-dimethylformamide dimethyl acetal (DMF–DMA) gave good results for 10HAs with nitrogen–phosphorus detection (GC–NPD) [25,26]. Traditional acylation with acid anhydrides usually yields derivatives with very poor GC properties [22,25] but Reistad et al. [27] tested the acylation with heptafluorobutyric acid anhydride followed by methylation of the acidic amide proton with diazomethane with good results for three HAs. No further progress in the GC–MS analysis of HAs has been reported to date.

Silylation is probably the most versatile GC derivatization technique. It involves the displacement of an acidic hydrogen on the compound with an silyl group, by nucleophilic attack [28]. Among these, the sterically crowded *tert*-butyldimethylsilyl (TBDMS) group is presently the most versatile for GC analysis. When compared with other silylating reagents, such as the popular trimethylsilyl group, the TBDMS group is up to 10,000 times more stable to hydrolysis, presents enhanced reactivity towards amines, and origins by-products that provide direct injection of the reaction mixture for GC analysis [28,29]. Besides improving volatility and stability, the introduction of the silyl group can also serve to enhance mass spectrometric properties. The mass spectra are easy-to-interpret, and the characteristic high-mass ions, derived from the molecular ions, can be used in trace analysis in the SIM mode [28].

The objective of this work was to study the derivatization of several HAs to their TBDMS derivatives, in a one-step derivatization procedure, with *N*-methyl-*N*-*tert*-butyldimethylsilyltrifluoroacetamide (MTBSTFA) and their GC–EI–MS analysis with SIM quantification.

2. Experimental

2.1. Chemicals

The HAs used in this study (Table 1) were purchased from Toronto Research Chemicals (Downsview, Canada). Harman (1-methyl-9*H*-pyrido[3,4-*b*]indole) was from Aldrich (Milwaukee, WI, USA) and norharman (9*H*-pyrido[4,3-*b*]indole) was from Sigma (Steinheim, Germany). Stock standard solutions of 100 $\mu\text{g/ml}$ in methanol were prepared and used for further dilution. 2-amino-3,4,7,8-tetramethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (TriMeIQx) (Toronto Research Chemicals) was used as internal standard (IS) (1.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ methanolic solution). MTBSTFA, with 1% *tert*-butyldimethylchlorosilane (TBDMCS) as a catalyst was obtained from Aldrich.

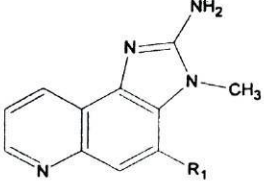
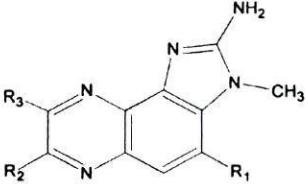
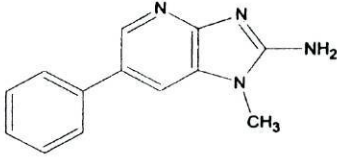
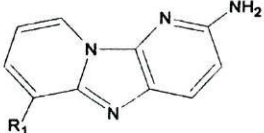
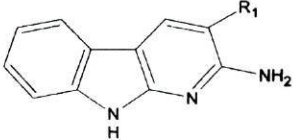
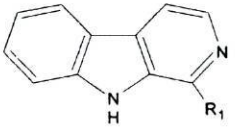
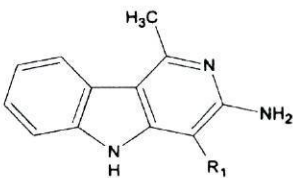
Diatomaceous earth extraction cartridges (Extrelut NT, 20 ml) were provided by Merck (Darmstadt, Germany). Bond Elut propylsulfonil silica gel (PRS; 500 mg) and octadecylsilane (C_{18} ; 100 mg) cartridges were from Varian (Harbor City, USA). The PRS cartridges were preconditioned with dichloromethane (7 ml) and the C_{18} cartridges with methanol and water (5 ml each). Amberlite XAD-2, 20–60 mesh (Supelco, Bellefonte, PA, USA) was conditioned with methanol, followed by acetone and finally water.

2.2. Sample analysis

Food samples, namely fried bacon and meat bouillon concentrates, as well as a sample of commercial roasted ground coffee, were extracted in triplicate according with Gross and Grüter [11], with some modifications implemented by Toribio et al. [32]. Briefly, a 3 g food sample was homogenized in 1 M NaOH (12 ml) and the suspension left for 3 h with occasionally shaking. For coffee, an aqueous extract was prepared (50 g of coffee/500 ml water boiled for 1 min), filtered, and 10.0 ml aliquots were analyzed, after being adjusted to the same 1 M NaOH concentration. The alkaline solutions (food samples and coffee) were mixed with Extrelut NT refill material (15 g) and transferred to an empty Extrelut column coupled to a preconditioned PRS cartridge. To extract the analytes from diatomaceous earth, 75 ml of dichloromethane were passed through the tandem. The PRS cartridge was then dried and successively rinsed with 15 ml of methanol–water (4:6, v/v) and 2 ml water. After being coupled to a preconditioned C_{18} cartridge, the compounds were eluted with 0.5 M ammonia acetate (pH 8.5, 20 ml). The later cartridge was rinsed with water (5 ml) and the HAs desorbed with 2 ml \times 0.8 ml methanol–ammonia (9:1, v/v) into PTFE/neoprene-lined silanized screw-capped vials (Supelco). The solvent was gently evaporated under nitrogen and the residue redissolved with 100 μl of the internal standard solution in methanol.

A Supelco Visiprep (Supelco) was used to manipulate the solid-phase extraction cartridges. Evaporations were per-

Table 1
Compounds used in this study

Chemical name	Abbreviation	General structure	R1	R2	R3
Imidazoquinolines					
2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline	IQ		H		
2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline	MeIQ		Me		
Imidazoquinoxalines					
2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoxaline	IQx		H	H	H
2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline	MeIQx		H	H	Me
2-Amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline	4,8-DiMeIQx		Me	H	Me
2-Amino-3,7,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline	7,8-DiMeIQx		H	Me	Me
2-Amino-3,4,7,8-tetramethylimidazo[4,5-f]quinoxaline	TriMeIQx (IS)		Me	Me	Me
Imidazopyridine					
2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine	PhIP				
Pyridoimidazole					
2-Amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole	Glu-P-1		Me		
2-Amino-dipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole	Glu-P-2		H		
Pyridoindole					
α-Carbolines					
2-Amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole	MeAαC		Me		
2-Amino-9H-pyrido[2,3-b]indole	AαC		H		
β-Carbolines					
1-Methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole	Harman		Me		
9H-Pyrido[3,4-b]indole	Norharman		H		
γ-Carbolines					
3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole	Trp-P-1		Me		
3-Amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole	Trp-P-2		H		

formed using an evaporating unit coupled to an “Reacti-therm” heating block (Pierce, Rochford, IL, USA).

2.3. Derivatization procedure for gas chromatography

The solvent from the standard solutions (corresponding to 0.1–50 ng of each HAs) was evaporated under a gentle stream of nitrogen. The residues, from both standards and samples, were dried overnight over phosphorous pentoxide in vacuo. Then, 25 μ l of MTBSTFA (with 1% TBDMCS) and 25 μ l of anhydrous acetonitrile were added to the dry residue, the mixture sonicated for about 1 min and heated at 90 °C for 90 min on “Reacti-therm” heating block (Pierce). After cooling, 1 μ l aliquots were directly injected into the gas chromatograph.

2.4. Gas chromatography–mass spectrometry

GC–MS analyses were performed on a Hewlett-Packard gas chromatograph 6890 equipped with an electronically controlled split/splitless injection port and interfaced to a MSD-5973N mass selective detector (Little Falls, DE, USA). The gas chromatograph was equipped with a DB-5MS fused-silica capillary column (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m film thickness; J&W Scientific, Folsom, CA, USA), coupled directly to the mass detector.

The injection was performed at 270 °C in the pulsed splitless mode. Purge-off time was set at 0.7 min. Helium was used as carrier gas, with a constant flow of 1 ml/min. An 18 min two-step temperature gradient was used: 150 °C–10 °C/min–270 °C (1 min)–20 °C/min–290 °C (4 min). The transfer line temperature was 280 °C. Calibration of the GC–MS was performed weekly using the autotune function of the mass selective detector. Electron impact mass spectra were measured at acceleration energy of 70 eV. The detector was switched off in the initial 8 min. Data acquisition was performed in the full-scan mode during the optimisation of the method (mass range initially at 40–480 u, later only 150–400 u). SIM mode based on the ions $[M-57]^+$ (quantification) and $[M-15]^+$ (confirmation) was used, monitoring different ions during the chromatographic run, with a dwell time of 30 ms.

The overall system was controlled by Agilent MS Chemstation G2578A software.

2.5. HPLC

The HPLC analyses were performed by means of a Jasco HPLC system (Japan) equipped with an AS-950 auto-sampler, a PU-1580 quaternary pump, a DG-1580-54-4-line degasser, a MD-950 diode array detector (DAD) and a FP-920 programmable fluorescence detector, connected in series. The amines were separated at ambient temperature using an TSK-gel ODS 80T column (5 μ m, 25.0 mm \times 4.6 mm i.d.) (TosoHaas, Germany) and a Supelguard LC-8-DB precolumn (Supelco). The mobile phase was a gradient

of: 0.01 M triethylamine (pH 3.2) (A); 0.01 M triethylamine (pH 3.6) (B); acetonitrile (C), programmed according with Gross and Grüter [11] with minor modifications.

3. Results and discussion

3.1. Optimisation of the derivatization conditions

The amino group is not particularly reactive to silylating reagents, and its conversion into a silyl derivative through nucleophilic attack is difficult. Therefore, 1% TBDMCS is usually used as catalyst [28]. The standard or sample residues were always dried under a gentle stream of dry nitrogen and kept overnight over phosphorous pentoxide in vacuum [30] in order to prevent the presence of water. Anhydrous acetonitrile was also used as solvent in the derivatization procedure [29]. Since the amines are particularly prone to adsorption on the glassware surface, silanised vials were used.

Several experiments were conducted in order to find the best conditions for the complete and accurate derivatization of the HAs. For this purpose time and temperature combinations as well as the MTBSTFA amount were monitored. After a derivatization protocol of 60 min, ranging from room temperature to 150 °C, it was verified that the reaction yield was proportional to the temperature used. For temperatures higher than 100 °C the results were inconclusive due to the screw-cup liner degradation and/or losses by evaporation. Also, for temperatures as low as 70 °C, about 150 min were necessary to achieve complete derivatization of most HAs. Therefore, we have studied in detail the reaction at 90 °C finding that 90 min were sufficient for most HAs complete derivatization. Nevertheless, and for all the temperatures tested, the derivatization of Glu-P-1 and Glu-P-2 was incomplete (1–10% effective derivatization) and a tailed peak, corresponding to the underivatized compound was observed. Harman was not derivatized under these conditions, though no structural justification was found, when compared to the complete derivatization of norharman at low temperature. Also, A α C and MeA α C complete derivatization was difficult, requiring about 6 h, at 90 °C. Nevertheless, their derivatization was reproducible presenting good quality parameters as will be discussed later on. The amount of MTSTFA (with 1% TBDMCS as catalyst), necessary for the derivatization in the tested range (about 750 ng total compounds), was set to 25 μ l.

The derivatives were kept at –18 °C and periodically injected over a 3-day period (data not shown) in order to monitor their stabilities. The carbolines norharman, A α C and MeA α C were relatively stable (93–99% after 24 h), as was PhIP. The imidazoquinolines and imidazoquinoxalines, were greatly reduced (62–90% after 24 h), including the IS. These derivatives should, therefore, be injected on the same working day.

Table 2
Main ions in the EI mass spectra^a of the heterocyclic amine derivatives

Heterocyclic amine	Mr	<i>m/z</i> (Rel. Ab.%)			
		[<i>M</i>] ⁺ confirmation ion	[<i>M</i> -15] ⁺	[<i>M</i> -57] ⁺ quantitative ion	[<i>M</i> -71] ⁺
Norharman	168	282 (31)	267 (2)	225 (100)	211 (7)
AαC	183	297 (31)	282 (2)	240 (100)	226 (7)
MeAαC	197	311 (37)	296 (2)	254 (100)	240 (7)
IQ	198	312 (28)	297 (3)	255 (100)	241 (8)
IQx	199	313 (13)	298 (4)	256 (100)	242 (13)
Trp-P-1	211	325 (8)	310 (2)	268 (100)	254 (7)
Trp-P-2	197	311 (8)	296 (2)	254 (100)	240 (8)
MeIQx	213	327 (14)	312 (4)	270 (100)	256 (14)
7,8-DiMeIQx	227	341 (16)	326 (4)	284 (100)	270 (16)
MeIQ	212	326 (31)	311 (4)	269 (100)	255 (9)
4,8-DiMeIQx	227	341 (16)	326 (4)	284 (100)	270 (16)
PhIP	224	338 (13)	323 (3)	281 (100)	267 (9)
4,7,8-TriMeIQx (IS)	241	355 (16)	340 (4)	298 (100)	284 (21)

^a Mass range 150–400 u.

Table 3
Ions monitored in the SIM mode

Time (min)	<i>m/z</i>
8.0–11.6	225, 240, 254, 282, 297, 311 (for norharman, AαC, and MeAαC)
11.6–13.9	254, 255, 256, 268, 270, 311, 312, 313, 325, 327 (for IQ, IQx, Trp-P-1, Trp-P-2, and MeIQx)
13.9–18.0	269, 281, 284, 298, 326, 338, 341, (355) (for 7,8-DiMeIQx, MeIQ, 4,8-DiMeIQx, PhIP, and TriMeIQx)

3.2. Spectra analysis

The identities of the derivatives were established by EI-MS. The mass spectra were always characterized by an intense [*M*-57]⁺ ions, originated directly from the molecular ion by loss of a *tert*-butyl group [C(CH₃)₃]⁺, and used for quantification purposes [28,30]. The [*M*-57]⁺ ion is also indicative of the molecular mass. A relatively intense molecular ion [*M*]⁺ is always present and can be used for confirmation purposes. Other ions with low relative intensities, such as [*M*-15]⁺ or [*M*-71]⁺, are also characteristic. See Table 2 for detail. The characteristic ion of the trimethylsilyl group, *m/z* 73 [(CH₃)₃Si]⁺, and the ion of the *tert*-butyl group, *m/z* 57 [C(CH₃)₃]⁺, were always observed, as ex-

pected [31]. The mass spectrum of IQ is presented in Fig. 1, as an example.

The internal standard molecular ion (*m/z* 355), used for confirmation purposes in the SIM mode as described in Table 3, can be avoided in the cases where this *m/z* is a high background noise. This is usually originated from desorption of both silicone polymers (decamethylcyclopentasiloxane) from the GC septa, or siloxane coatings of the GC capillary columns.

The size of the TBDMS group usually prevents multiple silylation of the nitrogen atom [31] and only a single peak is observed for each compound. The regularity of the mass spectra patterns of the TBDMS derivatives allows direct identification by the appropriate ions [*M*]⁺ and

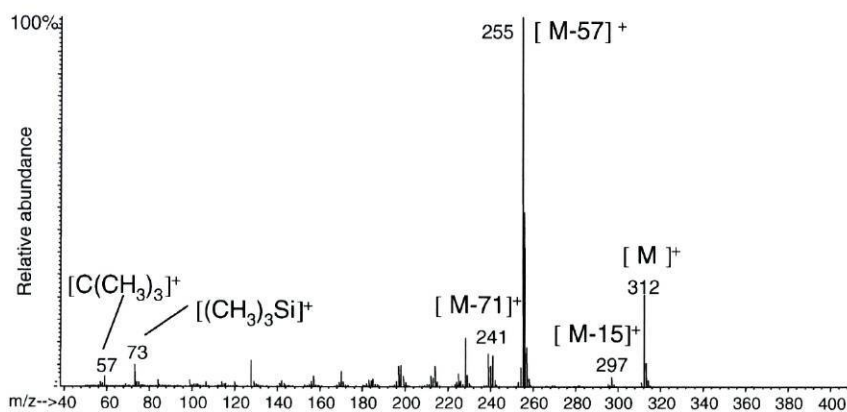


Fig. 1. Mass spectrum of IQ (2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline), as its *tert*-butyldimethylsilyl derivative.

Table 4
Quality parameters of the HAs derivatives

Heterocyclic amine	t_r (min)	Day-to-day precision (R.S.D.%)		Linearity range (ng)	Correlation coefficient (r^2)	Detection limits	
		t_r	Concentration			Standard solution (pg injected)	Food samples (ng g ⁻¹)
Norharman	9.9	0.2	5.0	0.1–50.0	0.9996	0.5	0.02
A α C	10.7	0.4	6.9	0.1–10.0	0.9964	1.2	0.05
MeA α C	11.4	0.6	9.2	0.5–10.0	0.9994	2.7	0.07
IQ	12.9	1.6	8.8	0.5–50.0	0.9993	3.3	0.09
IQx	13.3	1.4	12.7	0.5–50.0	0.9985	1.5	0.05
Trp-P-1	13.3	1.2	9.7	1.5–50.0	0.9969	13.4	0.35
Trp-P-2	13.4	1.4	15.0	1.0–50.0	0.9993	11.3	0.29
MeIQx	13.5	1.2	10.2	0.5–50.0	0.9994	1.9	0.05
7,8-DiMeIQx	14.1	0.9	11.8	0.5–50.0	0.9996	2.2	0.06
MeIQ	14.2	0.9	7.1	0.5–50.0	0.9991	3.4	0.09
4,8-DiMeIQx	14.5	1.6	12.6	0.5–50.0	0.9994	3.0	0.08
PhIP	16.1	0.8	20.7	0.5–50.0	0.9989	4.8	0.12

[*M*-57]⁺. Those were the ions monitored in the SIM mode, as represented in Table 3. A detailed chromatogram from the GC–MS analysis of a standard solution with 12HAs analyzed under those conditions is shown in Fig. 2, obtained in the SIM mode. The individual mass spectra of the TB-DMS derivatives, obtained in the full scan mode, are also represented.

3.3. Quality parameters

Precision, linearity and limits of detection were determined and are represented in Table 4. The derivatization reproducibility was evaluated over a 3-day period with standard solutions. Calibrations for the derivatized HAs were performed with amounts ranging from 0.1 to 50 ng, and were calculated from the ratio of the [*M*-57]⁺ HA area to the [*M*-57]⁺ area of the internal standard (*m/z* 198). The relative standard deviations of each HA's peak area ratios for all the calibration points, were 0.2–13.8% ($n = 3$).

In the SIM mode, the detection limits based on a signal-to-noise ratio of 3:1, ranged from 0.5 to 13.4 pg injected. For food samples, the detection limits were established by low-level spiking of reference standards (0.05–0.3 ng/g) and submitting to the entire protocol. For the HAs present in the sample the values were estimated from the calibration curve based on a signal-to-noise ratio of 10. The values varied from 0.02 to 0.4 ng/g, with Trp-P-1 and Trp-P-2 presenting the higher values. These values are comparable or improved when compared to those described in the literature, achieved either by GC–MS or HPLC-MS [17].

3.4. Application

After optimisation of the derivatization and chromatographic conditions, the method was tested with food samples, such as fried bacon and bouillon cubes.

A chromatogram corresponding to a fried bacon extract is given in Fig. 3. Norharman, IQ, Trp-P-1, MeIQ, 4,8-MeIQx and PhIP were positively identified, and its contents (Table 5) were in accordance with those described in the literature [18,20,33–37].

For the coffee extracts, norharman was the only compound whose presence was confirmed but accurate quantification was not possible due to the complexity of the coffee extract. Two complementary cleaning methods were tested. On the first, and according with Gross and Grüter [5], the initial aqueous coffee extract was adjusted to pH 7.5 and mixed with preconditioned XAD-2 (10 g). After being washed with water (100 ml), elution was performed with methanol (30 ml) and methanol–acetone (1:1, v/v; 20 ml). The extract was reduced to about 5 ml on a rotary evaporator; 5 ml of 3 M NaOH were added and the volume adjusted to 15 ml. The process followed the same procedure in experimental, being mixed with the Extrelut material. The second tentative cleaning step was

Table 5
Food samples analyzed by GC–MS

	Chicken bouillon cube (ng/g)	Fried bacon (27.4% fat) (ng/g)
Norharman	43.2 ± 5.1 ^a	6.7 ± 2.7
A α C	nd ^b	nd
MeA α C	nd	nd
IQ	nd	1.6 ± 0.1
IQx	nd	nd
Trp-P-1	nd	0.6 ± 0.3
Trp-P-2	nd	nd
MeIQx	nd	nd
7,8-DiMeIQx	nd	nd
MeIQ	0.5 ± 0.2	2.8 ± 0.8
4,8-DiMeIQx	3.7 ± 0.7	1.1 ± 0.4
PhIP	nd	36.4 ± 11.3

^a Mean ± standard deviation ($n = 3$).

^b Not detected.

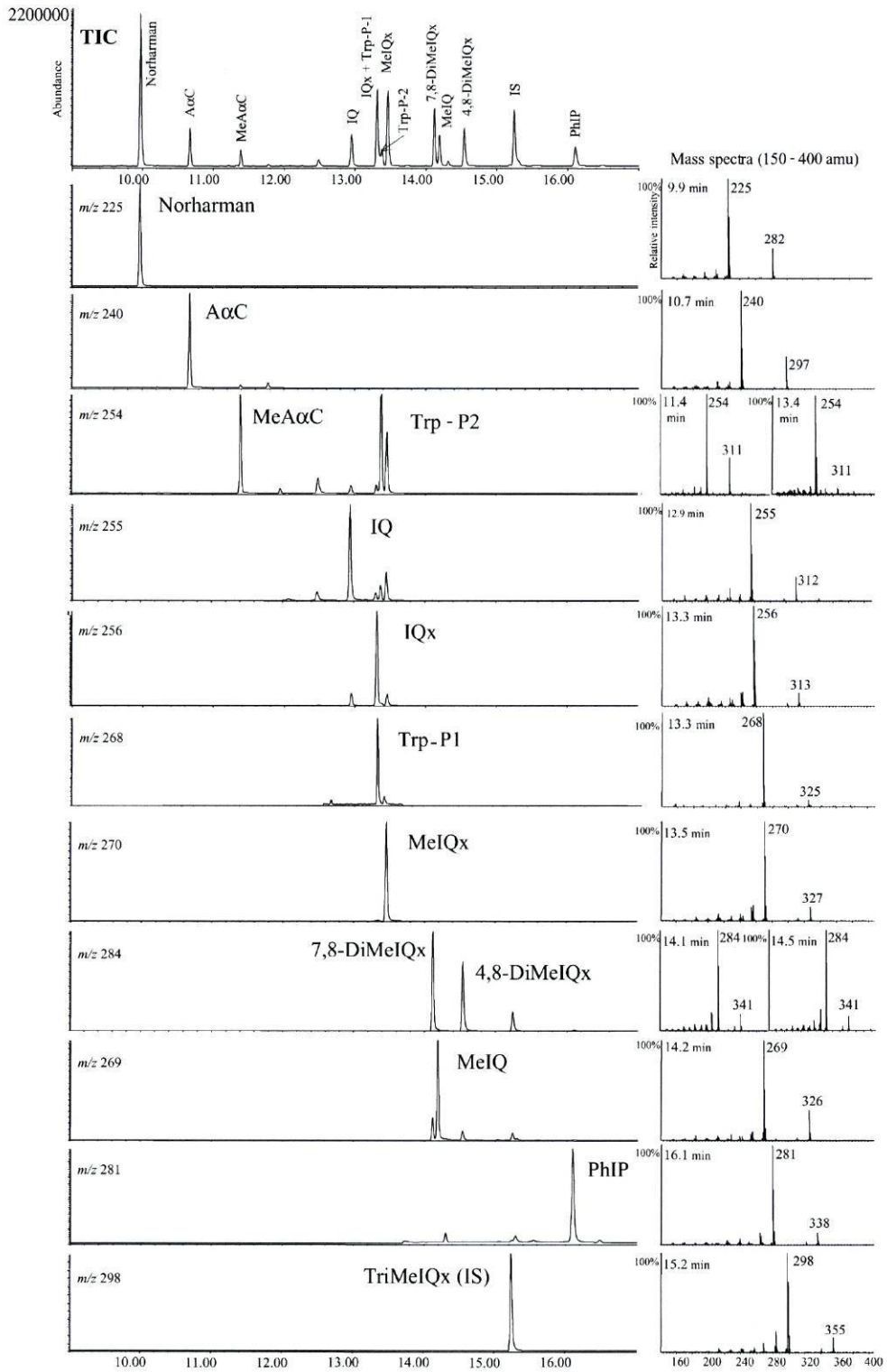


Fig. 2. Total ion compound (TIC) chromatogram of a standard solution with 12 HAs (25 ng each) with the internal standard (above), together with the individual chromatograms in the SIM mode. Each individual mass spectra, obtained in the full-mode, is represented on the right.

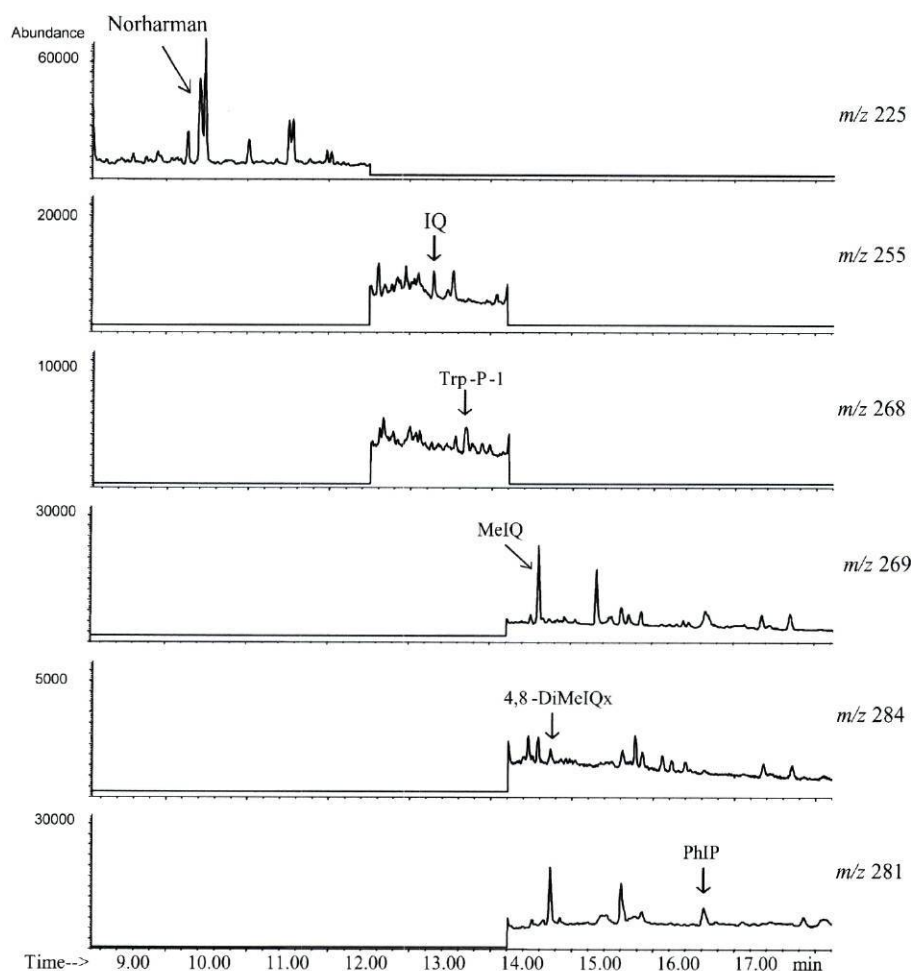


Fig. 3. SIM chromatogram from a fried bacon sample.

tested by applying the method described by Murray et al. [20] on the final extracts, already cleaned as described in Section 2. In this case, the final cleaned residue was taken with 0.1 M HCl (200 μ l) and washed with hexane (2 μ l \times 750 μ l). Then, 0.5 M sodium carbonate solution (100 μ l) was added to the aqueous phase and the alkaline product extracted with ethyl acetate (2 μ l \times 750 μ l). The organic extracts were combined and taken to dryness under nitrogen.

The derivatization of the dried extracts obtained by these two complementary clean-up procedures gave final extracts still not suitable for GC–MS quantification. Therefore, and only for coffee, the extracts obtained by the PRS/C₁₈ method were analyzed by HPLC, following the Gross and Grüter method [11], as described in Section 2.

In Fig. 4 are represented the DAD and fluorescence chromatograms from both coffee extract and standard solution.

The presence of the co-mutagen norharman was confirmed and harman was also detected, but no mutagenic HAs were detected. These two β -carbolines were quantified

with the fluorescence detector (excitation: 300 nm, emission: 440 nm) with mean levels of $1.3 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$ for norharman and $0.4 \pm 0.1 \mu\text{g/g}$ for harman ($n = 3$). The results are in agreement with the recent results from Herraiz [38], obtained also by HPLC. The levels found in coffee are substantially higher than those found on other cooked foods, but comparable with those described in cigarette smoke [39], making these two habits probably the main exogenous sources of these normal body constituents in mammals.

Harman and norharman are described as co-mutagens. Although *in vitro* coffee mutagenicity has been mainly verified for individual coffee constituents [6], the presence of high amounts of harman and norharman should not be ignored [40]. Also, coffee drinking and smoking seem to be negatively associated with Parkinson's disease with a 20 and 60% reduction, respectively [41,42]. These β -carbolines have not been taken into account, although being important central monoaminoxidase inhibitors [43]. Their association could give further insight into these epidemiological studies.

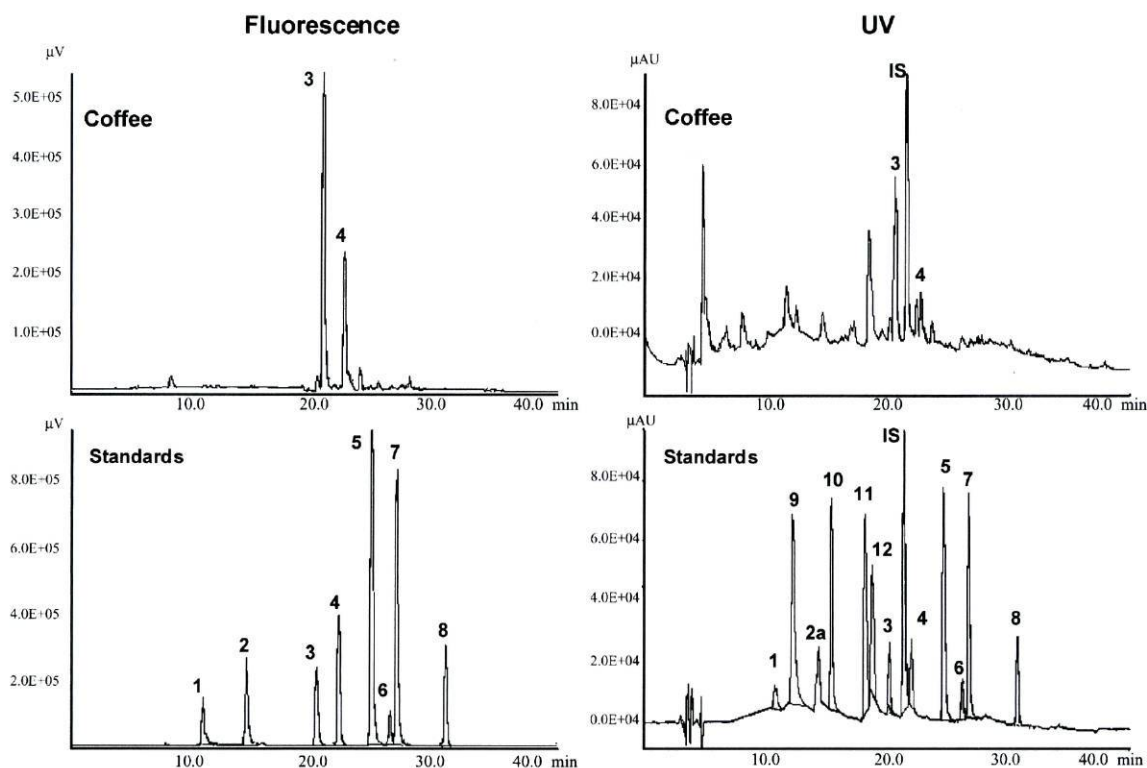


Fig. 4. HPLC chromatograms of a roasted coffee extract and reference standards (50 ng each) on the fluorescence detector (left) and diode array detector (263 nm), obtained under a ternary gradient as specified in Section 2. Peaks identified as follows: (1) Glu-P-2; (2) Glu-P-1; (2a) Glu-P-1 + MeIQ; (3) norharman; (4) harman; (5) Trp-P-2; (6) PhIP; (7) Trp-P-1; (8) AαC; (9) IQ + IQx; (10) MeIQx; (11) 7,8-diMeIQx; (12) 4,8-diMeIQx.

4. Conclusions

These experiments demonstrated that the HAs can be accurately determined in food samples by GC–MS as their *tert*-butyldimethylsilyl derivatives. The derivatization method is simple, selective and sensitive, allowing the simultaneous quantification of twelve HAs. When applied to some food samples, low limits of detection were found, thus providing a less expensive alternative to the LC–MS techniques to estimate the content of HAs in food samples.

Acknowledgements

S.C. acknowledges the support of the “Sub-programa Ciência e Tecnologia do 2º Quadro Comunitário de apoio” for a grant (9580/96).

References

- [1] J.H. Weisburger, *Mutat. Res.* 480 (2001) 23.
- [2] Y. Oda, P. Aryal, T. Terashita, E.M.J. Gillam, F.P. Guengerich, T. Shimada, *Mutat. Res.* 492 (2001) 81.
- [3] H. Kataoka, *J. Chromatogr. A* 774 (1997) 121.
- [4] K. Kikugawa, T. Kato, S. Takahashi, *J. Agric. Food Chem.* 37 (1989) 881.
- [5] G.A. Gross, U. Wolleb, *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991) 2231.
- [6] A. Nehlig, G. Debry, *Mutat. Res.* 317 (1994) 145.
- [7] H. Ohgaki, S. Takayama, T. Sugimura, *Mutat. Res.* 259 (1991) 399.
- [8] N.J. Gooderham, S. Murray, A.M. Lynch, M. Yadollahi-Farsani, K. Zhao, A.R. Boobis, D.S. Davies, *Drug Metab. Dispos.* 29 (2001) 529.
- [9] N. Ishibe, R. Sinha, D.W. Hein, M. Kulldorff, P. Strickland, A.J. Fretland, W.-H. Chow, F.F. Kadlubar, N.P. Lang, N. Rothman, *Pharmacogenetics* 12 (2002) 145.
- [10] E.G. Snyderwine, R. Sinha, J.S. Felton, L.R. Ferguson, *Mutat. Res.* 506–507 (2002) 1.
- [11] G.A. Gross, A. Grüter, *J. Chromatogr.* 592 (1992) 271.
- [12] F. Toribio, L. Puignou, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 836 (1999) 223.
- [13] M. Vollenbröker, K. Eichner, *Eur. Food Res. Technol.* 212 (2000) 122.
- [14] H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 35.
- [15] B. Janoszka, U. Blaszczyk, L. Warzecha, M. Strózyk, A. Damasiewicz-Bodzek, D. Bodzek, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 155.
- [16] M.G. Knize, J.S. Felton, G.A. Gross, *J. Chromatogr.* 624 (1992) 253.
- [17] P. Pais, M.G. Knize, *J. Chromatogr. B* 747 (2000) 139.
- [18] K. Skog, A. Solyakov, P. Arvidsson, M. Jägerstad, *J. Chromatogr. A* 803 (1998) 227.
- [19] S. Murray, N.J. Gooderham, A.R. Boobis, D.S. Davies, *Carcinogenesis* 9 (1988) 321.
- [20] S. Murray, A.M. Lynch, M.G. Knize, N.J. Gooderham, *J. Chromatogr.* 616 (1993) 211.
- [21] S. Murray, B.G. Kake, S. Gray, A.J. Edwards, C. Springall, E.A. Bowey, G. Williamson, A.R. Boobis, N.J. Gooderham, *Carcinogenesis* 22 (2001) 1413.

- [22] L.M. Tikkanen, T.M. Sauri, K.J. Latva-Kala, *Food Chem. Toxic.* 31 (1993) 717.
- [23] S. Vainiotalo, K. Matveinen, A. Reunanen, *Fresenius J. Anal. Chem.* 345 (1993) 462.
- [24] E. Richling, M. Kleinschnitz, P. Schreier, *Eur. Food Res. Technol.* 210 (1999) 68.
- [25] H. Kataoka, K. Kijima, *J. Chromatogr. A* 767 (1997) 187.
- [26] H. Kataoka, S. Nishioka, M. Kobayashi, T. Hanaoka, S. Tsugane, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69 (2002) 682.
- [27] R. Reistad, O.J. Rosland, K.J. Latva-Kala, T. Rasmussen, R. Vikse, G. Becher, J. Alexander, *Food Chem. Toxic.* 35 (1997) 945.
- [28] R.P. Evershed, in: K. Blau, J.M. Halket (Eds.), *Handbook of Derivatives for Chromatography*, Wiley, Chichester, 1993, p. 52.
- [29] C.J. Biermann, C.M. Kinoshita, J.A. Marlett, R.D. Steele, *J. Chromatogr.* 357 (1986) 330.
- [30] H.J. Chaves das Neves, A.M.P. Vasconcelos, *J. Chromatogr.* 392 (1987) 249.
- [31] V.Y. Taguchi, in: R.E. Clement (Ed.), *Gas Chromatography: Biochemical, Biomedical and Clinical Applications*, Wiley, Chichester, 1990, p. 129.
- [32] F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 948 (2002) 267.
- [33] K.I. Skog, M.A.E. Johansson, M.I. Jägerstad, *Food Chem. Toxic.* 36 (1998) 879.
- [34] R. Sinha, M.G. Knize, C.P. Salmon, E.D. Brown, D. Rhodes, J.S. Felton, O.A. Levander, N. Rothman, *Food Chem. Toxic.* 36 (1998) 289.
- [35] P. Pais, C.P. Salmon, M.G. Knize, J.S. Felton, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1098.
- [36] A. Solyakov, K. Skog, M. Jägerstad, *Food Chem. Toxic.* 37 (1999) 1.
- [37] B. Zimmerli, P. Rhym, O. Zoller, J. Schlatter, *Food Addit. Contam.* 18 (2001) 533.
- [38] T. Herraiz, *Food Addit. Contam.* 19 (2002) 748.
- [39] Y. Totsuka, H. Ushiyama, J. Ishihara, R. Sinha, S. Goto, T. Sugimura, K. Wakabayashi, *Cancer Lett.* 143 (1999) 139.
- [40] W. Pfau, K. Skog, *J. Chromatogr. B* 802 (2004) 115.
- [41] C. Martyn, C. Gale, *BMJ* 326 (2003) 561.
- [42] E.-K. Tan, C. Tan, S.M.C. Fook-Chong, S.Y. Lum, A. Chai, H. Chung, H. Shen, Y. Zhao, M.L. Teoh, Y. Yih, R. Pavanni, V.R. Chandran, M.C. Wong, *J. Neurol. Sci.* 216 (2003) 163.
- [43] E. Ruiz-Durántez, J.A. Ruiz-Ortega, J. Pineda, L. Ugedo, *Neuroscience Lett.* 308 (2001) 197.

Capítulo 8 – Metilimidazol

Gas chromatographic-mass spectrometric quantification of
4-(5-)methylimidazole in roasted coffee after ion-pair extraction”

in *J. Chromatogr. A.*, 976, 285-291, 2002



ELSEVIER

Journal of Chromatography A, 976 (2002) 285–291

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

Gas chromatographic–mass spectrometric quantification of 4-(5)-methylimidazole in roasted coffee after ion-pair extraction

S. Casal*, J.O. Fernandes, M.B.P.P. Oliveira, M.A. Ferreira

CEQUP/Fac. Farmácia, Serviço de Bromatologia, Rua Aníbal Cunha 164, 4050-047 Oporto, Portugal

Abstract

A GC–MS method is described for quantification of 4-(5)-methylimidazole (4MI) in coffee. Although tested, GC–flame ionization detection proved inadequate for this purpose due to the complexity of the coffee matrix. The developed method was based on ion-pair extraction with bis-2-ethylhexylphosphate and derivatization with isobutylchloroformate. Quantification was carried out by the standard addition method using 2-ethylimidazole as internal standard. Reproducibility data from the complete procedure are presented. Mean recoveries were higher than 98%. The method was applied to green and roasted coffee samples from the two most important varieties, arabica and robusta, and to commercial “torrefacto” coffee blends. 4MI was not detected in the green coffee samples analysed and ranged from 0.307 to 1.241 mg/kg in roasted samples.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Coffee; Food analysis; Derivatization, GC; Chloroformates; Methylimidazole; Imidazoles

1. Introduction

4-(5)-Methylimidazole (4MI) is a simple nitrogen-containing heterocyclic compound that may be formed from sugars' reaction with ammonia under specific conditions. It is a central nervous system (CNS) agent that could illicit convulsions in animals and has attracted special attention due to its possible toxicity. The reported oral LD₅₀ values for mouse and chicken are 370 and 590 mg/kg, respectively. Because of its wide presence and lack of carcinogenic information, the chronic toxicity of 4MI is currently being evaluated in “in vivo” animal studies [1]. Meanwhile, the World Health Organisation has recommended a limit content of 200 mg/kg

for ammonia process caramels, one of the major known sources of this compound for humans.

Accurate methods to determine 4MI content in several products, namely food, are needed, in order to determine the ingested amounts. This compound has been detected in several beverages coloured with caramel, like beer, colas or fruit juices, and other foods such as milk, sauces, roasted barley and bread. Presently there is no information available about the possible concentration of 4MI in coffee. As ammonia content in coffee is negligible [2] it is not expected to find high levels of 4MI from the reaction of sugars with ammonia, the more traditional reported source. However it is known that 4MI can also be formed by pyrolysis, such as in cigarette smoke [3]. Since coffee is submitted to a roasting process, more or less intense according to requirements, we were aiming to verify the possible presence of 4MI in roasted coffee.

The coffee matrix is an extremely complex one,

*Corresponding author. Tel.: +351-2-2207-8929; fax: +351-2-2200-3977.

E-mail address: sucasal@ff.up.pt (S. Casal).

since several thousand different compounds are present, especially after roasting. An efficient clean-up procedure is therefore necessary in order to achieve correct quantification of 4MI. Based on reported clean-up methods, ion-pair extraction seemed the most selective one and was therefore chosen for this work. The possibility to determine 4MI in coffee by gas chromatography using both flame ionisation detection (GC–FID) and mass spectrometry (GC–MS) is discussed in detail.

2. Experimental

2.1. Chemicals

4-(5-)Methylimidazole was from Sigma (St Louis, MO, USA). The internal standards imidazole (I) and 2-ethylimidazole (EI) were from Aldrich (Steinheim, Germany). Stock standard solutions at 1.0 mg/ml were prepared in 0.1 M HCl and stored at 4 °C. Working solutions were prepared by dilution with 0.1 M HCl and stored under the same conditions. Ethylchloroformate (ECF), isobutylchloroformate (IBCF), ethanol, isobutanol and pyridine were from Fluka (Neu-Ulm, Germany) and bis-2-ethylhexyl-phosphate (BEHPA) was from Aldrich. All other chemicals were analytical grade or higher.

2.2. Coffee samples

A *Coffea arabica* sample from Brazil and a *C. robusta* from Ivory Coast were analysed, either green or after a standard industrial roast procedure (160–220 °C, 14 min). Commercial blends of “torrefacto coffee” (coffee roasted in the presence of sugar) with “natural coffee” were also analysed.

All samples were ground to pass a 25-mesh sieve. Loss in mass at 105 °C was determined according to ISO 11294-1994, immediately after grinding and weighing for extraction, in order to express the results on a dry weight basis.

2.3. Extraction

A 2.00 g portion of each powdered coffee was extracted three times with methanol, after addition of the internal standard (EI). The methanolic extract

was dried under nitrogen, at ambient temperature, and redissolved in 4 ml of phosphate buffer (0.2 M; pH 6). The tube was capped and vortex-mixed for 30 s. After centrifugation at 3500 g, 3 ml were removed to a second tube and extracted with an equal amount of 0.1 M BEHPA in chloroform and again vortex-mixed to extract 4MI. After centrifugation, 2 ml of the lower phase (chloroformic) were transferred to a third tube containing 2 ml of 0.1 M HCl. Upon shaking and centrifugation, the upper hydrochloric phase was ready for derivatization.

2.4. Derivatization

Derivatization was performed as described by Fernandes et al. [4] with minor modifications. A second internal standard (heptylamine), used to control the derivatization step efficiency, was added to a silanized screw cap tube containing 1000 µl of the aqueous extract. Acetonitrile (150 µl), pyridine (100 µl) and alcohol (300 µl), either ethanol or isobutanol, were added and vortex-mixed. Subsequently, 75 µl chloroformate (ethylchloroformate or isobutylchloroformate) was added. After a brief shaking, 1 ml of a 1.0 M $\text{NaHCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ solution and 250 µl of chloroform were added and the mixture further vortex-mixed for 4–5 s for extraction of the derivatives into the organic layer. After centrifugation at 3500 g for 1 min, the vials were stored below 4 °C until chromatographic analysis. Then, about 1.2 µl of the chloroformic phase was injected directly into the gas chromatographic system.

2.5. Gas chromatography–flame ionization detection

GC–FID was carried out on a Chrompack CP-9001 gas chromatograph equipped with an automatic Liquid Sampler CP-9050 (Chrompack, Netherlands).

The temperatures of the injector and detector were 250 and 280 °C, respectively. Helium was used as carrier gas at an initial inlet pressure of 80 kPa. Splitless injection was used with a purge time delay of 1 min. Several programmed temperature gradients (from 70 to 280 °C) were used in order to improve

separation of the compounds from other interfering peaks.

2.6. Gas chromatography–mass spectrometry

GC–MS analysis was carried out using two different Hewlett-Packard (Little Falls, DE, USA) systems. Initially with a HP 5890/MSD-5970B, and later with a HP 6890/MSD-5973N system. Both systems were equipped with a capillary column coupled directly to the mass detector. The injection was carried out at 250 °C in the splitless mode. Purge-off time was set at 1 min. Helium was used as carrier gas with a head pressure of 80 kPa. Initial column temperature was 70 °C programmed with a two-step gradient to achieve 280 °C after 16 min (10 min hold). The transfer line temperature was 280 °C. Calibration of the GC–MS system was carried out weekly using the autotune function of the mass selective detector. Electron impact mass spectra were measured at an acceleration energy of 70 eV. Data acquisition was performed in the full-scan mode during the optimisation of the method and in the selected ion-monitoring mode (SIM) for quantification. Characteristic mass fragments (m/z) of the imidazoles after derivatization with isobutylchloroformate were used: 4MI-a (m/z 68, m/z 82, m/z 182), 4MI-b (m/z 82, m/z 182), 2-ethylimidazole (m/z 196). The m/z 160 was also scanned in order to detect heptylamine, the internal standard used to control the derivatization step. Dwell time in the SIM mode was 30 ms, allowing 4.35 cycles per s. The detector was switched off in the initial 6 min in order to completely remove the excess of isobutylchloroformate that could damage the filament. The overall systems were controlled by Hewlett-Packard Chemstations.

2.7. Chromatographic columns

Three analytical columns were used throughout this study: DB-5MS and DB-1701, both 30 m × 0.25 mm I.D. (0.25 μm film thickness) (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) and SP-Sil-8CB, 25 m × 0.25 mm I.D. (0.12 μm film thickness) (Chrompack, Netherlands). A 2-m guard column was used with all columns and periodically a small piece was cut-off.

3. Results and discussion

3.1. 4-(5-)Methylimidazole identification

After some preliminary studies, the presence of 4-(5-)methylimidazole was confirmed in roasted coffee by GC–MS after derivatization with IBCF. In green coffee, no 4MI was observed. The sample extract was obtained with methanol and no internal standard was used in order to confirm their absence.

3.2. Gas chromatography–flame ionisation detection

Once the presence of 4MI in roasted coffee was confirmed, our first attempt was to analyse it by GC–FID. Aware of the difficulty of this method, two types of derivatives were considered. Based on previous analysis developed in our laboratory [4], we have tested the derivatization method described therein, with isobutylchloroformate–isobutanol–pyridine. Another derivatization method was also tested using ethylchloroformate–ethanol–pyridine as also recently reported by us [5]. The reagent quantities were adjusted in order to achieve a more concentrated final extract. Two internal standards (IS) were used: I and EI.

The derivatization methods were examined for linearity of the calibration plots. The peak areas of 4MI and IS were measured and the peak-area ratio calculated. A linear response relationship was obtained with the correlation coefficients being above 0.9999 in the range 2–250 μg/ml with both IS (without IS the correlation coefficient was as small as 0.99). Relative standard deviations (RSDs) at the mid-point of the calibration graphs were lower than 1% from three replicates. Without IS, the same RSD was around 5%. The minimum detectable amounts to give a signal-to-noise ratio of 3 under our GC conditions was 0.1 ng/μl injected.

Fig. 1 represents a chromatogram of standards at 250 mg/l on the DB5-MS column, derivatized with ethylchloroformate. As observed two peaks corresponding to 4MI (a and b) were detected. This observation was valid either for standards or samples and it was already described by Fernandes et al. [4]. It is probably due to the natural tautomerism characteristic of substituted imidazoles [6,7]. Table 1

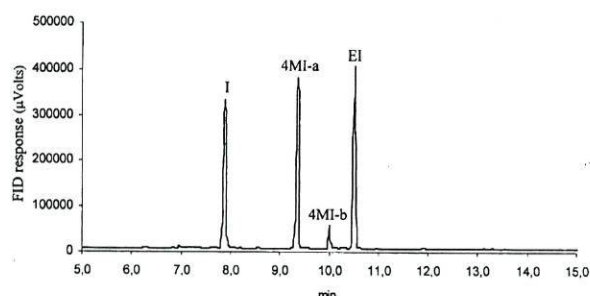


Fig. 1. GC–FID chromatogram of a pure standard solution (250 mg/l) derivatized with ethylchloroformate.

summarises some analytical characteristics obtained with both derivatization conditions.

Due to the complexity of the coffee matrix a purification procedure was necessary in order to achieve the GC analysis of 4MI. The methanolic extract, as used in the preliminary studies described previously, gave complex chromatograms being impossible to find the correct peak identification.

A literature review was done in order to find adequate clean-up procedures. Different methodologies are reported such as solvent extraction [8,9], ion exchange [10–12], or ion-pair extraction [4,13–16]. None of the reported methods using solvent extraction or ion exchange can be considered entirely suitable when the criteria of accuracy, precision, and analysis time are considered. Furthermore, these reported methods do not seem to be specific enough to be used with a complex mixture such as coffee.

Ion-pair extraction with BEHPA was first described by Thomsen and Willumsen [13] and has been the more reported method, with some minor improvements, in the last two decades. Ion-pair extraction seemed very promising for coffee analysis since it proved efficient in other complex matrices,

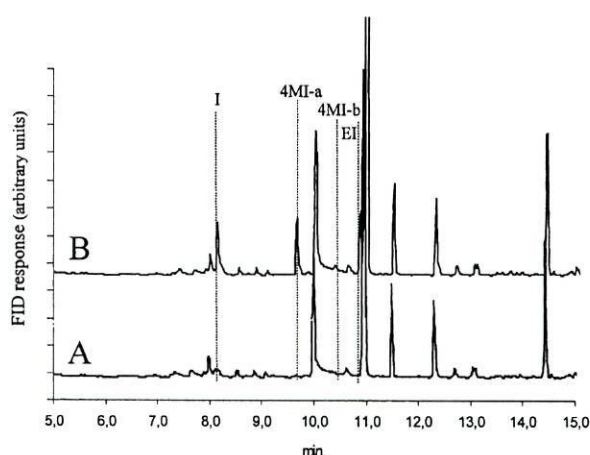


Fig. 2. GC–FID chromatogram of (A) an arabica roasted coffee, and (B) the same sample spiked with 4MI, EI (IS) and I (IS), after derivatization with ethylchloroformate.

such as forage samples and body fluids, where it is described as yielding a clean extract, due to the selectivity in the co-extraction [13].

Ion-pair extraction, performed as described in the Experimental section, was tested on coffee extracts obtained with several solvents, namely methanol, phosphate buffer, 0.1 M H₂SO₄, hot water, and chloroform/ethanol. The highest contents were extracted with methanol, so this solvent was selected.

Fig. 2 represents chromatograms of: (A) roasted coffee, and (B) the same sample spiked with 4MI, EI (IS) and I (IS), after derivatization with ethylchloroformate. Fig. 3 represents the same coffee after derivatization with IBCF.

It can be easily perceived that the peaks corresponding to the compound under analysis, 4MI, are very small and thus difficult to integrate. Also there is some peak interference under the imidazole peak which makes it inappropriate to use as IS.

Table 1
Some analytical characteristics of the derivatives tested

	Retention times (min)		Injection precision (RSD, %) ^a		
	ECF	IBCF	Retention time	Peak area	Peak area/IS
Imidazole	8.2	10.9	0.3	1.1	–
4-(5)Methylimidazole-a	9.7	12.4	0.3	1.4	0.6
4-(5)Methylimidazole-b	10.4	13.1	0.3	1.5	0.7
2-Ethylimidazole	10.9	13.5	0.2	1.2	–

^a Liquid sampler.

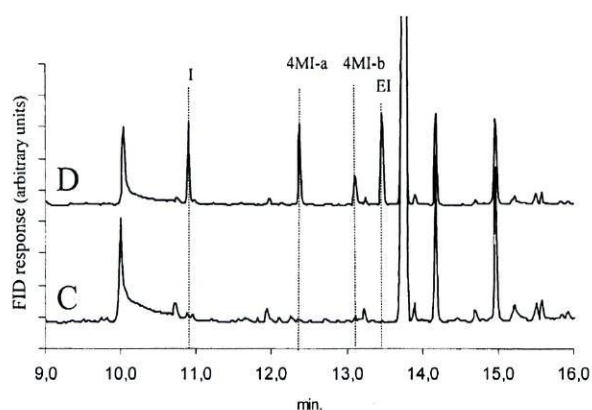


Fig. 3. GC–FID chromatogram of (C) an arabica roasted coffee, and (D) the same sample spiked with 4MI, EI (IS) and I (IS), after derivatization with isobutylchloroformate.

Based on these observations, we have concluded that the determination of 4MI by GC–FID may be possible with other matrices of less complexity but not with those as complex as coffee, even after a selective clean-up procedure such as ion-pair extraction.

3.3. Gas chromatography–mass spectrometry

3.3.1. Quantification method

Full scanning MS, although providing the most unequivocal evidence for identification, does not provide an accurate basis for quantification [17]. Sensitivity can be improved using SIM. We have used multiple-ion monitoring selecting the molecular ions area for each compound quantification, after derivatization with IBCF. Sensitivity could be improved using the main ion m/z 82 for 4MI but the chromatograms were less clear. The other ions were scanned in order to increase selectivity.

Quantification was carried out by the standard addition method. Each sample was analysed without spiking and after a four level spiking, usually from 0.1 to 0.5 mg/kg.

Fig. 4 displays a total ion chromatogram of a torrefacto coffee sample, the corresponding reconstructed molecular ion chromatograms m/z 182 and 196, and the electron impact mass spectra of 4MI-a extracted.

It can be observed that although not completely separated from interfering compounds present, the

use of reconstructed chromatograms enables peak separation and accurate area measurement.

The detection limit was estimated at 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ at a signal-to-noise ratio of 3 for the 4MI-a corresponding to 0.005 $\text{ng}/\mu\text{l}$ in the injected extract. The quantification limit was about 0.04 mg/kg.

3.3.2. Reproducibility, recovery and stability

The reproducibility was evaluated by performing five replicate extractions of the same sample. Day-to-day precision was estimated for the same sample over a period of 3 days. The average content was 0.741 mg/kg with a RSD of 5% within extractions and 8% within days. Data obtained from measurements of the recovery efficiency are listed in Table 2, achieving mean results over 98%.

3.3.3. Derivative stability

Once derivatized and stored at 4 °C, the 4MI contained in coffee samples was very stable. The same chloroformic extract analysed after 1 year by different instruments (HP 5890/MSD-5970 and HP 6890/MSD-5973N) gave the same concentration (1.9% RSD).

3.3.4. Chromatographic performance

With both chromatographic columns used, a slight degradation was observed in the peak shape after several injections. The cause for this reduction in the chromatographic performance may be the excess of chloroformate not consumed in the derivatization as described by Fernandes et al. [18]. This problem was not observed in a previous study with chloroformates for amino acid analysis developed by us [5]. Probably the chromatographic column used there (Chirasil) was not affected by the reagent. Attempts to consume this excess of reagent by alkaline methanol or evaporation proved unsuccessful for our compounds as the derivatives were partially lost.

For our purposes, the problem was almost completely resolved by regenerating the column (Bounded Phase Column Rinse Kit, J&W Scientific, USA), although being time consuming.

3.3.5. Sample quantification

The average contents (mg/kg dry wt.) of the coffee samples analysed are reported in Table 3.

To our knowledge, this is the first quantification of

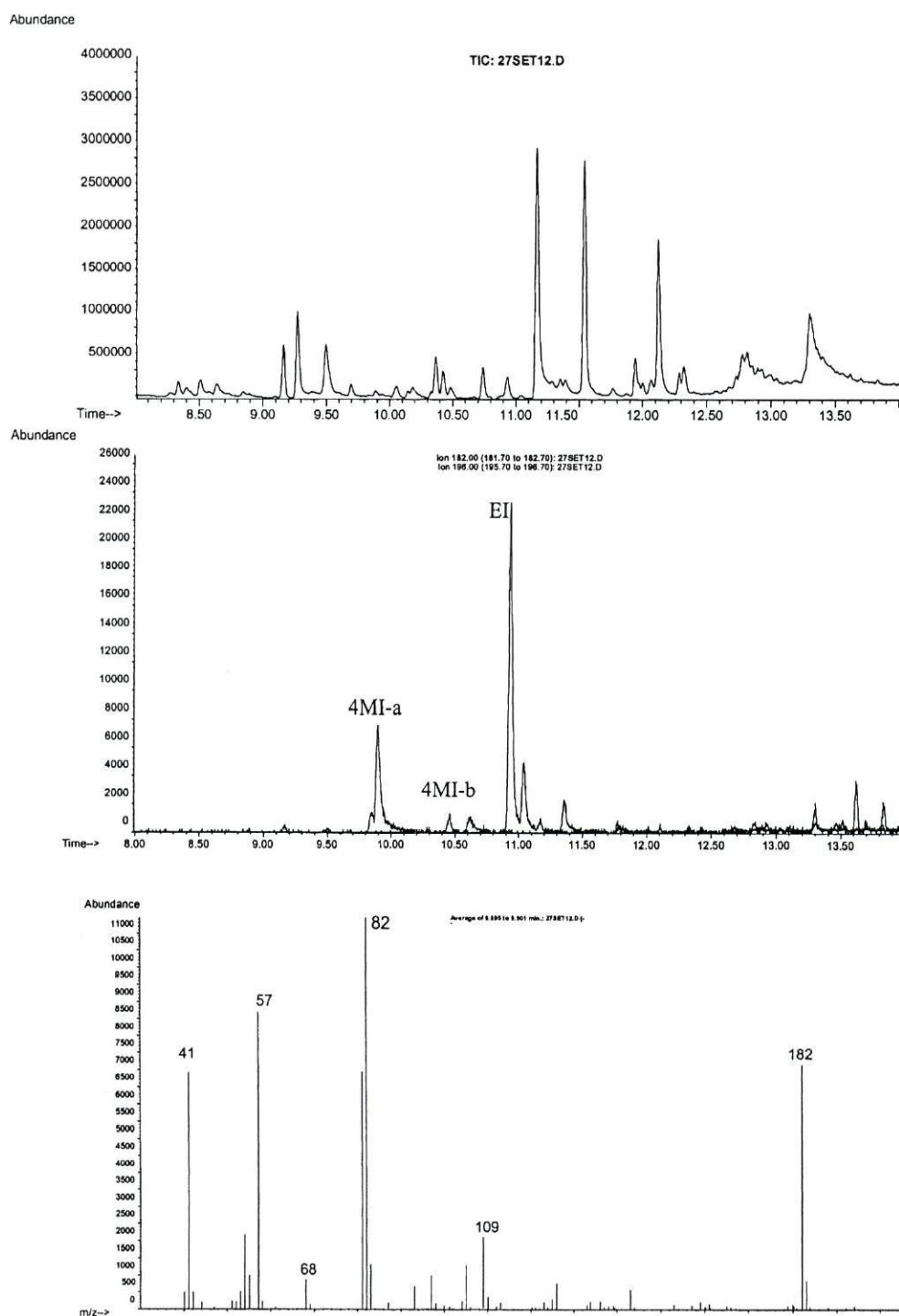


Fig. 4. GC–MS total ion chromatogram of a torrefacto coffee sample (top), the corresponding reconstructed ion chromatograms m/z 182 and 196 (middle), and 4MI-a derivative mass spectra extracted (bottom), after derivatization with isobutylchloroformate.

Table 2
Recoveries from spiked coffee samples

Sample	4MI (mg/kg)			Recovery (%)
	Initial amount	Added	Found	
Roasted arabica	0.702	0.200	0.895	96.4
		0.500	1.201	99.9
Roasted robusta	0.750	0.200	0.956	102.8
		0.500	1.253	100.6
Torrefacto	0.393	0.200	0.594	100.9
		0.500	0.894	100.2
Green arabica	n.d.	0.500	0.432	86.5
		1.000	1.005	100.5

4MI in coffee samples. 4MI was not observed in green coffee and after roasting, the amounts were quite variable ranging from 0.307 to 1.241 mg/kg (dry wt.). The levels found do not seem to be correlated with the coffee variety nor the type of roast, but a larger study is necessary to confirm these possibilities. It would also be interesting to find out if there is any association with the roast type and intensity.

Despite a vast amount of research, evidence to support a direct link of coffee with some diseases has been limited and inconsistent. Overall, the scientific information available supports the safety of moderate consumption [19]. The levels of 4MI present in coffee are extremely low and do not seem to contribute to potential adverse effects.

Table 3
4MI content in several roasted coffees

Sample		mg/kg (dry wt.)
Arabica	Brazil	0.741
Robusta	Ivory Coast	0.801
Torrefacto	100%	0.424
	50%	0.819
	50% ^a	0.307
	50% ^b	0.504
	30%	1.241

^b Decaffeinated.

^a 100% Arabica.

Acknowledgements

S.C. acknowledges the support of the Sub-programa Ciência e Tecnologia do 2° Quadro Comunitário de Apoio for a grant (9580/96).

References

- [1] J.H. Yuan, L.T. Burka, *Xenobiotica* 25 (1995) 885.
- [2] R. Macrae, in: R.J. Clarke (Ed.), *Coffee*, Vol. 1: Chemistry, Elsevier Applied Science, London, 1989, Ch. 4, p. 140.
- [3] P. Moree-Testa, Y. Saint-Jalm, A. Testa, *J. Chromatogr.* 290 (1984) 263.
- [4] J.O. Fernandes, M.A. Ferreira, *J. Chromatogr. A* 786 (1997) 299.
- [5] S. Casal, M.B. Oliveira, M.A. Ferreira, *J. Chromatogr. A* 866 (2000) 221.
- [6] G.A. Worth, P.M. King, W.G. Richards, *Biochim. Biophys. Acta* 993 (1989) 134.
- [7] K. Hasegawa, T. Ono, T. Noguchi, *J. Phys. Chem. B* 104 (17) (2000) 4253.
- [8] G. Fuchs, S. Sundell, *J. Agric. Food Chem.* 23 (1975) 120.
- [9] M. Cerny, A. Blumenthal, *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* 168 (1979) 87.
- [10] R.A. Wilks, A.J. Shingler, L.S. Thurman, J.S. Warner, *J. Chromatogr.* 87 (1973) 411.
- [11] R.A. Wilks, M.W. Johnson, A.J. Shingler, *J. Agric. Food Chem.* 25 (1977) 605.
- [12] G.K. Buckee, T.P. Bailey, *J. Inst. Brew.* 84 (1978) 158.
- [13] M. Thomsen, D. Willumsen, *J. Chromatogr.* 211 (1981) 213.
- [14] E. Karangwa, G.E. Mitchell Jr., R.E. Tucker, *J. Chromatogr.* 532 (1990) 105.
- [15] P. Nielsen, C. Friis, I. Kraul, *Res. Vet. Sci.* 54 (1993) 72.
- [16] L. Muller, W. Langseth, T. Sivertsen, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 3172.
- [17] J. Gilbert (Ed.), *Applications of Mass Spectrometry in Food Science*, Elsevier Applied Science, London, 1987, p. 73.
- [18] J.O. Fernandes, I.C. Judas, M.B. Oliveira, I.M.P.L.V.O. Ferreira, M.A. Ferreira, *Chromatographia Suppl.* 53 (2001) S327.
- [19] *Coffee, Tea, Mate, Methylxanthines and Methylglyoxal*, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 51, WHO, Geneva and IARC, Lyon, 1991.

Discussão geral

Discussão geral

A autenticidade do café é, conforme discutido no capítulo 1, um tema muito importante a nível mundial. No café verde, a distinção visual entre arábica e robusta é relativamente fácil, bem como o tipo de processamento sofrido, seco ou húmido. A distinção da origem geográfica já é de extrema dificuldade, senão impossível. No entanto, começa a ser imprescindível na cotação dos cafés no mercado internacional. Após a torra, e principalmente após moagem, deixa de ser possível qualquer distinção.

Numa tentativa de responder a estes desafios desenvolveram-se métodos analíticos visando a distinção, nas mais variadas facetas, das espécies de café. Os resultados desses mesmos desenvolvimentos, bem como a sua aplicação à discriminação das espécies e ao estudo do processo de torra, foram sendo detalhadamente discutidos ao longo dos diversos trabalhos apresentados na parte experimental.

Neste capítulo, designado discussão geral, pretendeu-se salientar os pontos mais importantes de cada trabalho realizado e/ou avaliado. Sempre que possível tentou-se encontrar correlações entre os parâmetros e as espécies bem como entre os tipos de torra.

9.1. Cafeína, trigonelina e ácido nicotínico

A cafeína, de acordo com a literatura, está presente em teores muito diferentes nos cafés arábica e robusta. Embora a sua determinação não seja suficiente para discriminar as espécies, a conjugação com outras determinações poderia eventualmente permiti-lo. Por seu lado, a trigonelina também se apresenta como potencial discriminador das duas espécies no estado verde, sendo progressivamente destruída pela torra, com formação de ácido nicotínico. Assim, com a determinação simultânea destes três compostos, pretendeu-se, de forma mais rápida, avaliar simultaneamente a capacidade discriminativa do conjunto cafeína-trigonelina e verificar a existência de correlações entre o grau de torra e os teores de trigonelina e ácido nicotínico.

Dada a natural absorvência no ultravioleta, e de acordo com os métodos publicados na literatura, o HPLC em fase reversa, com detecção UV, surgiu como inevitável. Embora o ácido nicotínico se apresente em quantidade reduzida e, simultaneamente, tenha um coeficiente de resposta menor, a utilização do detector de díodos permitiu ultrapassar diversas dificuldades. Para além de permitir verificar a pureza dos picos cromatográficos, e assim a sua efectiva separação dos restantes componentes, permitiu ainda quantificar cada

composto no seu máximo de absorção, com um inevitável aumento na sensibilidade.

O controlo do pH do eluente em valores inferiores ao pKa do ácido nicotínico (4,8) mostrou-se imprescindível para a sua efectiva separação da trigonelina. Embora a metodologia analítica permitisse ainda a determinação de outros compostos, tais como ácidos clorogénicos ou HMF, para além de não constituir um objectivo deste trabalho, os picos cromatográficos eram bastante impuros, requerendo ajustes no processo cromatográfico, bem como no protocolo extractivo.

No âmbito da extracção o objectivo foi sempre, ao longo de todos os trabalhos experimentais, caracterizar o grão de café, verde ou após torra, e não a bebida obtida a partir dele. Desta forma, as metodologias de extracção foram sempre desenvolvidas de forma a extrair o máximo de compostos da matriz.

No caso da cafeína, trigonelina e ácido nicotínico, trata-se de compostos bastante solúveis em água quente. Dado que a cafeína se apresenta, em parte, complexada com outros componentes, tais como ácidos clorogénicos, é sugerido na literatura que o processo extractivo demore algum tempo (Clifford, 1985). Por forma a obter os melhores rendimentos de extracção foram testados diversos solventes, utilizados em alguns dos trabalhos citados na Tabela 2.1 (pág. 60), sendo a extracção múltipla com água quente a que forneceu resultados melhores.

Os diversos processos de limpeza testados, tais como clarificação ou extracção em colunas de fase sólida, não acrescentaram grandes melhorias ao processo de separação cromatográfico, conforme confirmado pelo detector de díodos, para além de, obviamente, tornar o processo mais moroso. Optou-se assim, pela extracção múltipla com água quente, seguida de filtração e injeção directa no sistema cromatográfico. O método apresentou-se adequado para café verde e torrado, conforme comprovado pela validação do método, apresentada nas páginas 110-114. Para o ácido nicotínico no café verde, as recuperações foram, no entanto, da ordem dos 83%. Conforme referido no artigo em causa, o ácido nicotínico no café verde encontra-se em quantidade muito reduzida, próxima do limite de detecção da técnica (0,5 mg/100g). De qualquer forma, a determinação do ácido nicotínico tem mais interesse no café torrado, onde a recuperação apresentou valores superiores.

Uma vez validado o método, a metodologia foi aplicada à determinação dos teores de cafeína, trigonelina e ácido nicotínico, em diversas amostras de café, com o intuito de discriminar o café torrado.

Os teores em cafeína mostraram-se bastante diferentes (Figura 2, pág. 118). Os teores de trigonelina também se apresentaram distintos, mas com alguma sobreposição em

certas amostras. Os teores em ácido nicotínico mostraram-se pouco uniformes e não directamente relacionados com o teor original no seu precursor, a trigonelina. A dispersão dos teores dos três componentes mostrou-se bastante semelhante nas duas espécies.

Através de uma análise de clusters (Figura 3, pág. 119), e com base nos três compostos, verificou-se uma clara distinção entre as espécies. Não foi possível, no entanto, vislumbrar nenhuma outra separação de acordo, por exemplo, com a origem geográfica.

Através de uma análise de componentes principais (Figura 4, pág. 119), por forma a encontrar os compostos responsáveis por aquela separação, verificou-se uma correlação fortemente negativa entre os teores de cafeína e trigonelina, explicando estes compostos mais de dois terços da separação. Quando as espécies são analisadas separadamente, verifica-se também uma correlação negativa entre os teores de cafeína e os de ácido nicotínico, mostrando-se esta correlação mais significativa do que a primeira.

Estes resultados permitiram concluir que, embora seja possível a discriminação dos cafés no seu estado puro, através dos seus teores em cafeína e trigonelina, dificilmente poderá ser feita com grande rigor a discriminação de misturas. A discriminação geográfica, com base apenas nestes compostos, também não deverá ser possível.

O estudo do comportamento destes compostos com a torra constituiu um outro trabalho (pág. 123-127). Numa primeira fase, as amostras foram avaliadas após torras de 15 minutos a diferentes temperaturas, idênticas para as duas amostras (arábica e robusta).

Os teores determinados encontram-se descritos na Tabela 2 (pág. 124). De referir que, nesta tabela, a legenda indica erradamente mg/kg quando deveria constar g/kg, tal como no artigo anterior.

Conforme seria de esperar, o teor de cafeína diminuiu ligeiramente. Para as primeiras torras, no entanto, verificou-se um aumento aparente desta substância pela perda de massa do próprio grão. Para as temperaturas mais elevadas ocorre, paralelamente à perda de massa, alguma perda de cafeína, provavelmente por sublimação.

Em ambas as amostras, a trigonelina foi degradada com a torra, mais intensamente após os 200°C. No entanto, esta degradação foi menos pronunciada na amostra de café robusta, com valores residuais (a 240°C) superiores, por oposição aos teores iniciais. De referir que esta última torra (15 min. a 240°C) corresponde a uma torra muito escura, pouco utilizada. Para a torra imediatamente anterior (220°C) a trigonelina residual correspondia a cerca de 63% do teor inicial, nas duas amostras.

Simultaneamente, ocorreu aumento nos teores de ácido nicotínico. No café verde os valores eram da ordem dos 2-3 mg/100g, muito reduzidos, tendo aumentado significativamente com a torra, em ambas as espécies. Quando comparadas, a amostra de

café arábica apresentou teores superiores de ácido nicotínico, coerentes com o teor inicial superior em trigonelina, composto que está na sua origem. Para torras ainda mais drásticas, esse mesmo ácido nicotínico formado é também degradado, conforme pode ser verificado na Figura 3 da mesma página, para 20 minutos a 240°C. Esta torra está claramente fora dos limites usuais, mas levanta a questão do fornecimento efectivo de ácido nicotínico nos cafés de torras mais escuras, tal como é usual em certos países, nomeadamente em França.

Para clarificar a influência efectiva da matriz no comportamento verificado, realizaram-se também torras, em sistemas fechados, com as substâncias químicas puras, isoladas e em mistura (Figuras 2-4, pág. 126). A redução da trigonelina é acentuada pela sua interacção com outros compostos, dado que, quando aquecida individualmente, as perdas são menores. O aquecimento individual desta substância originou ácido nicotínico, provando-se assim que ela estará na sua origem. Já a cafeína apresentou um comportamento muito semelhante quando no estado puro, confirmando-se que as reduções se devem essencialmente a sublimações e não a degradações.

Conforme referido por outros autores, a determinação destes três parâmetros poderá ser um auxiliar no controlo do processo de torra, embora se trate de um processo um pouco moroso, mesmo com a metodologia analítica desenvolvida para a sua determinação simultânea.

9.2. Aminoácidos

A determinação dos teores em aminoácidos surgiu com uma multiplicidade de objectivos. Tendo em atenção os resultados publicados na literatura, em diversas revisões, o perfil de aminoácidos não parecia permitir, com facilidade, a discriminação das espécies. No entanto, certos aminoácidos não proteicos, tais como o ácido pipecólico, poderiam servir esse propósito (Macrae, 1985). Por outro lado, o perfil de aminoácidos poderia ser alterado com o tipo de processamento do café verde, nomeadamente por isomerização durante os processos fermentativos. Já o perfil total em aminoácidos poderia servir todos esses propósitos no café verde e torrado e a sua isomerização servir para controlo do processo de torra, como aliás descrito por Nehring e Maier (1992). Através da isomerização dos aminoácidos durante a torra poderia estudar-se, também, a susceptibilidade das espécies aos efeitos do calor.

As metodologias mais comumente descritas na literatura para determinação dos

aminoácidos D fazem uso da cromatografia gasosa com colunas quirais. Dentro destas, a Chirasil L-val é a coluna comercial que tem apresentado melhores resultados, pelo que constituiu também opção neste trabalho.

Para a determinação dos aminoácidos por cromatografia gasosa é necessário recorrer à sua derivatização prévia. Nesta área, existem alguns processos de derivatização descritos para a sua posterior separação quiral, conforme descrito na pág. 132, mas fazem usualmente uso de elevadas temperaturas. Sabendo que os aminoácidos são facilmente isomerizáveis com o calor, estas metodologias conduzem, inevitavelmente, a algum grau de racemização inerente à técnica, dificultando a distinção dos teores de aminoácidos D realmente existentes nas amostras, principalmente quando os teores são reduzidos.

Assim, o primeiro objectivo consistiu em desenvolver um método de derivatização que se processasse à temperatura ambiente. Para isso serviram de base os trabalhos de Hušek (1991) e posteriormente de Wang *et al.* (1994), que utilizaram derivatização com diferentes cloroformatos para quantificação de aminoácidos, embora sem a sua separação quiral.

Para o efeito estudou-se a derivatização com diferentes cloroformatos, em combinação com diferentes álcoois, segundo o mecanismo de reacção apresentado na página 136, por forma a obter um método de derivatização reprodutível. Este método deveria ainda permitir uma efectiva separação cromatográfica na coluna seleccionada, a baixa temperatura, e simultaneamente uma correcta quantificação, com elevada sensibilidade. A resposta do detector, bem como os tempos de retenção, mostraram-se proporcionais ao tamanho dos grupos alquilo introduzidos. Dado que a coluna cromatográfica em causa não podia ser utilizada a temperaturas superiores a 200°C, os derivados de maior massa molecular eram eluídos muito tardiamente e com um comportamento cromatográfico pouco aceitável. A substituição dos álcoois etílico e butílico pelo álcool fluorado, heptafluorobutanol (HFB), permitia diminuir os tempos de retenção simultaneamente com aumento de sensibilidade (Tabela 2, pág. 134). A resolução efectiva dos enantiómeros foi superior utilizando etilcloroformato em conjugação com HFB, tendo os estudos prosseguido com estes reagentes. Por forma a evitar a formação de derivados duplos, as condições de derivatização, nomeadamente a proporção entre os reagentes, foi cuidadosamente ajustada.

A reprodutibilidade do método, bem como a estabilidade dos derivados formados, foi também objecto de estudo, com resultados bastante satisfatórios. A técnica não permitiu, no entanto, a derivatização da arginina, como aliás já mencionado por Hušek (1991). Para além disso, o coeficiente de resposta dos aminoácidos hidroxilados (serina e treonina) era bastante baixo. No âmbito da resolução cromatográfica (Tabela 3, pág. 135) apenas os

enantiómeros da prolina não são separados.

Tratando-se de uma nova metodologia foi aplicada a diversas matrizes alimentares, para além do café, por forma a verificar a sua adequação a determinações em diversas áreas importantes, tal como descrito no capítulo 2.

Estabelecido o método cromatográfico houve que estudar o melhor processo extractivo dos aminoácidos da matriz, com vista à análise dos aminoácidos livres e totais.

Conforme referido na página 151 foram testados diversos solventes de entre os descritos na literatura para o efeito. Os melhores resultados foram obtidos com o ácido sulfosalicílico, após remoção prévia da fracção lipídica. Os extractos assim obtidos eram sujeitos a um processo selectivo de extracção dos aminoácidos por recurso a colunas catiónicas de extracção em fase sólida, conforme descrito frequentemente na literatura. Os resultados da validação do processo encontram-se descritos na Tabela 1 da pág. 143.

Se a extracção dos aminoácidos livres se apresentou como relativamente fácil, a determinação dos aminoácidos totais requeria hidrólise da amostra, com o inevitável uso de temperaturas elevadas. Sabendo que durante os processos de hidrólise clássicos ocorre alguma isomerização, tentou otimizar-se o processo especificamente para a matriz em causa, por forma a diminuir ao máximo esta isomerização inevitável. O ácido metilsulfónico é descrito na literatura como uma alternativa ao ácido clorídrico nos processos de hidrólise ácida, com menor indução de racemização, tendo sido confirmado no trabalho desenvolvido. Dado que a isomerização era mais intensa a partir das 16-18 horas, e que para esse tempo a hidrólise da amostra parecia estar já completa, optou-se por utilizar apenas 18h. O pequena racemização verificada mesmo nestas condições não se apresenta como significativa para efeitos comparativos, dado que todas as amostras são sujeitas ao mesmo processo.

Dado que os aminoácidos livres são degradados com a torra, a sua determinação como parâmetro discriminativo pode apenas ter algum significado nos cafés verdes. Embora os teores totais fossem relativamente semelhantes nas duas espécies (Tabela 2, pág. 144), individualmente eram sempre superiores no café robusta, excepto o ácido glutâmico. Confirmou-se ainda que o ácido pipecólico também existe no café robusta, o que elimina a hipótese da sua utilização como parâmetro diferenciador.

A partir destes resultados foi feita uma análise de clusters, tal como no trabalho anterior, e verificou-se imediatamente uma distinção entre as duas espécies. Também parece haver tendência para uma separação pelo tipo de processamento utilizado (seco ou húmido) (Figura 2, pág. 144).

Após uma análise de componentes principais (Figura 3, pág. 145) foi possível verificar a importância do triptofano na discriminação das espécies, com teores superiores no café robusta. De realçar que este aminoácido essencial é o precursor da niacina, pelo que, da sua extracção para o café bebida, poderá resultar também um contributo para a manutenção dos níveis normais desta vitamina, conforme referido no capítulo 2.

Por oposição, e como seria de esperar, as amostras arábica apresentam maiores teores de ácido piperólico e de ácido glutâmico.

A percentagem de formas livres de aminoácidos D no café verde é baixa, com valores da ordem de 1% (Tabela 2, pág. 144). A separação das amostras pelo tipo de processamento a que foram sujeitas é possível, conforme pode ser visualizado na Figura 3 (pág. 145). Para isso contribuem os maiores teores de L-triptofano e ácido D-glutâmico no café processado a húmido. Conforme esperado, a fermentação verificada no processamento a húmido parece aumentar a isomerização, por acção microbiana. O ácido glutâmico aparece como principal discriminador, o que advém, provavelmente, do facto de constituir o aminoácido maioritário do café arábica (ver Tabela 2, pág. 144).

Da análise dos aminoácidos após hidrólise verificou-se um valor ligeiramente superior de formas D, 1,3 e 1,8% no café robusta e arábica, respectivamente, para o que poderão contribuir, conforme discutido, as condições utilizadas nessa mesma hidrólise, embora se tratem de valores baixos comparativamente aos descritos na literatura. Após a torra, ocorre um aumento significativo para cerca de 10% da forma isomerizada.

Os teores em aminoácidos após hidrólise foram superiores nos cafés robusta (Tabela 3, pág. 145). Após a torra, a maioria dos aminoácidos foi reduzida, uns em maior percentagem do que outros. Os aminoácidos totais no café torrado apresentaram-se, pelo contrário, superiores nos cafés arábica. No que concerne à sua utilidade para os objectivos deste trabalho, embora possam ser utilizados na discriminação, conforme pode ser visualizado nas Figuras 5 e 6 (pág. 146), o poder discriminatório é menor. Para além disso, trata-se de uma determinação analítica mais morosa.

Ao efectuar o estudo detalhado da variação dos aminoácidos com o processo de torra (pág. 149-156) verificou-se um aumento das formas D com o aumento da temperatura. No que concerne aos aminoácidos livres foram todos gradualmente destruídos com o calor, embora com comportamentos diferentes. Paralelamente, ocorreu um aumento das formas D, atingindo, antes de todos os aminoácidos serem degradados, valores médios da ordem dos 56% no café arábica e 68% no robusta (Tabelas 2/3, pág. 152/153). Quando observadas individualmente, as velocidades de isomerização são diferentes, sendo o ácido

aspártico, tal como descrito noutras áreas, o que apresenta maior isomerização. No caso específico do café robusta, este aminoácido apresentou-se, para a torra realizada a 220°C (Figura 2, pág. 154), totalmente na forma D, embora, obviamente, já em teores residuais (3,8 mg/kg). Por seu lado, a valina apresentou-se como o aminoácido mais resistente à isomerização, em ambas as espécies.

No que concerne aos aminoácidos após hidrólise, estes são menos afectados pela temperatura, atingindo valores de isomerização apenas da ordem dos 11%, sem aparente diferença entre as espécies (Tabelas 4 e 5, pág. 154 e 155). De destacar mais uma vez, o teor superior de aminoácidos no café robusta, que neste caso pode ser directamente correlacionado com um maior teor proteico (Tabela 1, pág. 152), conforme descrito na literatura.

9.3. Aminas biogénicas

Conforme referido anteriormente, os dados disponíveis sobre os teores em aminas biogénicas no café eram muito escassos na literatura. Sabendo que existiam no café verde e que naturalmente seriam destruídos com a torra, apresentaram-se como mais um parâmetro interessante para estudar o processo de torra. Para além disso, estando implicadas nos processos fermentativos, poderiam ter também algum significado na distinção dos processamentos a seco e a húmido.

Assim, numa primeira fase, procedeu-se à validação de uma metodologia que permitisse a sua determinação rigorosa no café verde e torrado (pág. 159-173). Com base na literatura, a cromatografia líquida em fase reversa surgiu, mais uma vez, como a melhor alternativa. No entanto, e contrariamente ao primeiro trabalho, fosse necessário recorrer à derivatização. Para isso, procurou-se, simultaneamente, o melhor processo extractivo para a matriz em causa, e as condições ideais de derivatização, recorrendo, neste último caso, ao cloreto de dansilo e optimizando diversos parâmetros tais como pH, concentração, temperatura e tempo da reacção. Os resultados da validação do método encontram-se na Tabela 3 (pág. 169), apresentando limites de quantificação médios inferiores a 0,1 µg/g.

Procedeu-se então, como nos restantes casos, à aplicação da metodologia às amostras, com vista à sua discriminação e ao estudo da sua evolução com a torra. No entanto, quando se estudava a variação nos teores das aminas com a torra, os resultados iniciais mostraram-se, de certa, forma inesperados, com algumas aminas aparentemente a

aumentarem durante algumas fases do processo. Sendo que dificilmente seriam formadas e que o aumento não poderia ser explicado simplesmente pela perda de massa dos grãos, seria então provável que estivessem já presentes mas que, de certa forma, não tivessem sido determinadas no café verde. Dado que as recuperações obtidas aquando da validação da técnica se mostraram razoáveis surgiu a hipótese de estarem conjugadas com outros componentes da matriz.

Consultando a bibliografia para situações semelhantes noutras plantas, verificou-se ser comum a existência de conjugações de amins biogénicas, nomeadamente poliaminas, com ácido hidroxicinâmicos. A serotonina, por seu lado pode também apresentar-se, conforme referido no capítulo 1, conjugada com ácidos gordos, na forma de 5-hidroxitriptaminas. Assim, procedeu-se à validação de uma nova metodologia extractiva que permitisse determinar não só as amins biogénicas livres, como também as conjugadas. Com base nos trabalhos de Armas *et al.* (1999) desenvolveu-se um método extractivo no qual o extracto ácido, onde inicialmente apenas se determinava as amins livres, era hidrolisado, com vista a verificar a existência de formas conjugadas solúveis. Por seu lado, o resíduo sólido de café, que permanecia após a extracção inicial, era também sujeito aos mesmo processo de hidrólise para determinar possíveis formas conjugadas insolúveis no ácido. Um esquema do processo desenvolvido pode ser encontrado na Figura 1 (pág. 187).

De acordo com os mesmos autores, seria possível determinar também os ácidos hidroxicinâmicos libertados nas mesmas fracções hidrolisadas. Desta forma, tornava-se possível aprofundar um pouco mais a natureza das conjugações. No entanto, os ensaios preliminares realizados permitiram observar que esses mesmos ácidos hidroxicinâmicos se apresentavam alterados após o procedimento, provavelmente por oxidação. Embora não se tenha prosseguido com esses trabalhos, seria interessante poder completar o estudo com essa informação, sendo necessário, para isso, otimizar o método por forma a conservar os ácidos hidroxicinâmicos na sua natureza original.

A metodologia foi aplicada à discriminação de espécies (pág. 175-184). No geral, a putrescina foi a amina mais abundante, seguida das poliaminas espermidina e espermina. A putrescina mostrou-se estatisticamente diferente entre as duas espécies, quer livre quer na forma de conjugados, sempre superior nos arábicas. A cadaverina e a tiramina também mostraram algumas diferenças, mas apenas na forma livre. Conforme pode ser observado na Figura 1 (pág. 179), a dispersão entre as espécies é bastante semelhante, excepto para a putrescina, conforme havia sido referido, e para a tiramina.

A tiramina apresentou um comportamento muito interessante dado que, de entre o grupo de amostras de café robusta, apenas as amostras de Angola continham elevados

teores desta amina, superiores em cerca de 10 vezes comparativamente com as restantes. Já Correia *et al.* (1995) haviam reportado a existência cafeoil tirosina nas amostras de café desta região, podendo servir provavelmente como marcadores geográficos. Os elevados teores de tiramina são coerentes com essas observações, mas acrescentam que também a tiramina livre é superior nestas amostras. Dado que no capítulo anterior havíamos determinado o teor de aminoácidos destas amostras, fomos também verificar os teores de tirosina, o seu aminoácidos precursor. Na realidade, também aí as amostras angolanas se distinguem com valores significativamente superiores deste aminoácido.

Conforme discutido detalhadamente no artigo em causa, não se encontrou justificação biológica para o teor comparativamente elevado de putrescina no café arábica. Os aminoácidos precursores directos não parecem justificá-lo.

No que concerne à discriminação do tipo de processamento realizado no grão verde, esperávamos teores mais elevados de aminas biogénicas nos cafés fermentados, o que se veio a confirmar. Mais uma vez a putrescina mostrou capacidade discriminativa entre os dois processos com significância estatística ($p < 0,001$).

Numa primeira análise de clusters (Figura 2, pág. 181) verificou-se imediatamente o descrito nos parágrafos anteriores. Uma distinção total entre as espécies. Para além disso, era possível distinguir o tipo de processamento. No que concerne à discriminação geográfica, apenas o grupo de amostras de Angola se destacou dos restantes. Pela análise discriminante confirmou-se ser a putrescina a responsável pela distinção das espécies (Figura 3, pág. 182). Para a distinção do tipo de processamento parecem contribuir as poliaminas, com teores superiores da de maior massa molecular no processamento a húmido. Esta separação foi, no entanto pouco efectiva, representando apenas 3% da variação total.

No estudo do comportamento com a torra (pág. 183-192), escolheram-se apenas as três maioritariamente mais importantes (putrescina, espermidina e espermina) e, simultaneamente com maior importância fisiológica na planta

Todas as aminas foram degradadas com a torra, mas as formas conjugadas parecem resistir um pouco mais, como aliás seria de esperar. Embora com teores iniciais muito superiores em putrescina, a degradação desta no café arábica é também superior, atingindo valores semelhantes no café torrado.

Por forma a estudar a influência da matriz no processo, efectuaram-se também aquecimentos com as substâncias puras, tanto em sistema aberto como em sistema fechado (Figura 4, pág. 190). Enquanto que no sistema fechado as aminas eram pouco

reduzidas, no sistema aberto diminuíram até teores residuais, principalmente se ultrapassadas as suas temperaturas de sublimação. Estes resultados confirmam que as perdas nas aminas com a torra se deverão principalmente a sublimações. Desta forma o grão de café comporta-se praticamente como um sistema aberto para as aminas biogénicas.

9.4. Aminas heterocíclicas aromáticas

A técnica mais utilizada para determinação de HAs em alimentos processados termicamente é o HPLC com detecção de massa, técnica que tem sofrido avanços consideráveis nos últimos anos. Trata-se, no entanto, de um instrumento bastante dispendioso e inacessível a muitos laboratórios de fracos recursos. Embora também se possa utilizar o detector de díodos, como aliás foi a prática mais comum durante muitos anos, a sensibilidade atingida é menor. Estão igualmente reportadas na literatura algumas metodologias por cromatografia gasosa, mas os métodos descritos, embora sensíveis, apenas permitiam a determinação de alguns dos compostos.

Dada a disponibilidade do referido instrumento no nosso laboratório (GC-MS), surgiu-nos como propósito o desenvolvimento de uma metodologia para a sua determinação por esta técnica. O desenvolvimento de tal técnica permitiria não só analisar o café, o objectivo directo deste trabalho, como também disponibilizar uma nova técnica para outras matrizes e outros laboratórios na mesma situação.

Após uma revisão bibliográfica sobre os métodos de derivatização descritos para aminas, a silição pareceu uma alternativa plausível. Embora tratando-se de uma técnica muito comum, capaz de derivatizar aminas na presença de um catalisador apropriado, não tinha sido aplicada a estes compostos (pág. 195-204).

Por forma a encontrar as melhores condições de derivatização para os compostos em causa, foram testados diversos parâmetros, tais como temperatura, tempo, quantidade e proporção dos reagentes (pág. 198). O referido método de derivatização origina espectros de massa de fácil interpretação dado que sistematicamente apresentam simultaneamente o íon molecular o fragmento correspondente à perda do grupo *t*-butilo, com menos 57 unidades de massa (Figura 1, pág. 199). Desta forma a utilização da monitorização selectiva destes íões (SIM) permite uma elevada sensibilidade e fácil identificação.

No entanto, as aminas Glu-P-1 e 2 não são derivatizadas, bem como o norharmane. Os derivados deverão ainda ser injectados no próprio dia, dado que alguns deles se degradam com relativa facilidade. O método de derivatização demonstrou ser bastante

preciso e com limites de quantificação muito baixos, da ordem dos 5-15 pg (Tabela 4, pág. 200).

Por forma a demonstrar a utilidade do processo aplicou-se a metodologia a algumas das amostras em que é mais usual determinar estes compostos, carnes e derivados destas processados termicamente (Tabela 5, pág. 200). No entanto, o nosso objectivo não deixou de ser a sua determinação no café (pág. 200).

Embora os resultados para café publicados na literatura não fossem conclusivos, com dois autores em aparente contradição, ambos faziam uso de metodologias menos expeditas. A metodologia foi também aplicada ao café torrado. No entanto, verificou-se com um problema adicional. Mesmo quando comparado com alimentos proteicos processados termicamente, matrizes já de si caracterizadas pela sua complexidade química, o café mostrou-se ainda mais complexo. Após passos adicionais de limpeza não se conseguiu obter extractos que resultassem em boa performance cromatográfica. Inevitavelmente, acabamos por fazer uso da cromatografia líquida com detector de díodos para a sua determinação, conforme publicado na literatura (Figura 4, pág. 203).

Com base nesta metodologia confirmou-se a inexistência das HAs, mas verificou-se que os dois comutagéneos harmane e norharmane se encontram em teores muito elevados, superiores aos descritos para outras matrizes. Apenas para o fumo do tabaco são reportados teores superiores. Essa observação foi posteriormente confirmada por Herraiz (2002). A ingestão de elevadas quantidades destes compostos através da bebida poderá ter efeitos biológicos importantes, dado que estes compostos, para além de descritos como comutagéneos, são também descritos como inibidores da MAO, estimulantes do SNC e anti-Parkinsónicos.

9.5. Metilimidazol

A determinação do metilimidazol apresentava já algum historial no nosso laboratório tendo sido determinada em caramelos (Fernandes *et al.*, 1997) e algumas bebidas. Dado tratar-se de uma substância que tem atraído alguma atenção pela sua possível toxicidade, pretendeu-se verificar se existia no café (pág. 207-213). Sabíamos que não estariam reunidas as condições clássicas da sua formação, reacção da amónia com açúcares. No entanto, este composto foi já descrito no fumo do tabaco, onde será formado por pirólise, o que também poderia ocorrer no café torrado.

Embora se tentasse fazer uso do GC-FID (Figuras 2 e 3, pág. 210-211), para a

determinação do 4-MI, uma instrumentação mais comumente disponível nos laboratórios, esta não se mostrou possível dada a complexidade do extracto, mesmo após um processo extractivo bastante selectivo e testados diferentes reagentes na derivatização. Optou-se inevitavelmente pela detecção de massa (GC-MS)

Verificamos que o composto não existe no café verde mas que se forma durante a torra, sem aparentes diferenças entres as duas espécies (Tabela 3, pág. 213). O estudo da cinética da sua formação poderá permitir verificar se se trata de mais um candidato ao controlo do processo de torra, estando a decorrer estudos nesse sentido. O facto de apresentar valores muito semelhantes nas duas espécies é um sinal promissor, dado que qualquer marcador químico para a intensidade da torra deverá ser independente da espécie de café em causa.

No que concerne ao seu potencial biológico, os teores de 4-MI são muito baixos comparativamente com os limites admitidos para os caramelos, pelo que não será de esperar efeitos daí resultantes.

Sabendo que o café torrefacto é torrado na presença de açúcar, desenvolvendo uma camada de caramelo na sua superfície, surgiu como inevitável a verificação dos teores deste composto neste tipo de café (Tabela 3, pág. 213). Na realidade os teores apresentaram-se muito semelhantes aos dos cafés sujeitos a torra normal, sugerindo mais uma vez que se deverá formar internamente a partir de constituintes naturais do café e não do caramelo formado.

Conclusões finais

Conclusões finais

A dissertação apresentada pretendeu contribuir para um melhor conhecimento da fracção nitrogenada do café, numa tentativa de estudar a sua aplicabilidade como marcador para a discriminação das espécies comercialmente mais importantes e da intensidade do processo de torra. Assim, numa primeira etapa, desenvolveram-se métodos analíticos baseados em técnicas cromatográficas para a quantificação de uma ampla gama de compostos nitrogenados para, numa segunda fase, aplicar os métodos desenvolvidos ao estudo do café arábica e robusta, verde e após diversas torras experimentais de intensidade diversa.

No que concerne às metodologias analíticas desenvolvidas, estas mostraram-se adequadas para a correcta quantificação dos compostos na matriz em estudo. Em certos casos, nomeadamente nos D,L-aminoácidos e aminas heterocíclicas aromáticas, demonstrou-se ainda a sua aplicabilidade a outras matrizes, permitindo, desta forma, uma aplicação mais alargada a outras áreas, nomeadamente na indústria alimentar. Dada a complexidade química que caracteriza a matriz café, principalmente após torra, as diversas metodologias foram frequentemente acompanhadas de processos de limpeza, mais ou menos morosos, bem como de derivatizações adequadas à determinação cromatográfica em causa.

No que respeita aos resultados obtidos nos estudos com vista à discriminação de espécies, parecem de destacar como mais válidas as aminas biogénicas e os D,L-aminoácidos.

As aminas biogénicas foram determinadas pela primeira vez no café robusta. Foi também a primeira vez que estes compostos foram avaliados na forma livre e conjugada, bem como no café sujeito a diferentes tipos de processamento nos locais de produção (seco ou húmido). Os resultados mostraram-se estatisticamente muito interessantes, com a putrescina a constituir o mais importante marcador, com valores significativamente superiores no café arábica, e dentro desta espécie, no café dela resultante quando processado a húmido. A tiramina mostrou-se ainda como um importante marcador para as amostras Angolanas.

Os aminoácidos livres permitiram, por seu lado, a discriminação das espécies, bem como o tipo de processamento. Para a primeira discriminação apresentaram-se como importantes o ácido pipercolico (superior no café arábica) e o triptofano (superior no robusta). Já no tipo de tratamento com vista à obtenção do café verde comercial, as

amostras processadas a húmido apresentaram teores superiores de formas isoméricas D dos aminoácidos, principalmente do ácido glutâmico, o aminoácido quantitativamente mais importante. Os aminoácidos totais, para além de envolverem um processamento analítico mais moroso e delicado, não permitiram discriminações tão evidentes.

No campo do estudo dos compostos em função da intensidade da torra, demonstrou-se um comportamento diferente nos cafés arábica e robusta, não só função dos diferentes teores iniciais de certos compostos, como também da aparente susceptibilidade da matriz ao efeito do calor. De destacar uma maior isomerização dos aminoácidos no café robusta. O menor tamanho do grão robusta, ou a maior exsudação de lípidos para a superfície no café arábica, formando uma espécie de barreira, poderão estar na sua origem e explicar essa diferença. Já para as amins biogénicas, bem como para a cafeína, se verificou aparentemente uma resistência superior no café robusta.

No campo da utilização destes compostos como possíveis marcadores da intensidade da torra, é de salientar a degradação da trigonelina, o aumento dos D-aminoácidos, bem como a formação de 4-metilimidazol e das β -carbolinas harmane e norharmane. No entanto, o comportamento da maioria dos compostos analisados parece estar dependente da espécie.

Da ingestão do café bebida, de destacar, a nível biológico, a formação de ácido nicotínico com a torra, podendo, no entanto ver os seus teores reduzidos nas torras mais drásticas. Os teores de aminoácidos D são, no geral, relativamente baixos, não parecendo constituir facto para preocupação, o mesmo podendo ser referido para o 4-metilimidazol. As amins heterocíclicas aromáticas não parecem ser formadas durante a torra, mas é de destacar a presença das duas β -carbolinas – harmane e norharmane. Estes compostos encontram-se no café torrado em teores muito elevados comparativamente com os de outras matrizes. Para além de descritos como estimulantes do sistema nervoso central, ou mesmo alucinogéneos, trata-se também de dois comutagéneos, pelo que o seu estudo deveria ser aprofundado.

Acreditamos que, sendo a maioria dos compostos nitrogenados abrangidos neste estudo resultantes do metabolismo secundário destas espécies, seja possível que uma análise estatística global de todos os compostos possa fornecer uma infomação mais valiosa do que apresentada com a análise parcial dos diferentes compostos tipo avaliados.

Bibliografia

- Abdulkarim, B. G., Smith, J. S., Heterocyclic amines in fresh and processed meat products, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4680-4687, **1998**.
- Abe, I., Nakamura, K., Toyonaga, T., Kobara, Y., Wasa, T., Determination of D,L-amino acids in natural water by gas chromatography with enantiomer labeling, *Anal. Sci.*, 9, 775-778, **1993**.
- Abe, I., Nishiyama, T., Nakahara, T., Enantiomer separation of amino acids after derivatization with alkyl chloroformates by chiral phase capillary gas chromatography, *Anal. Sci.*, 10, 501-504, **1994**.
- Abe, I., Fujimoto, N., Nishiyama, T., Terada, K., Nakahara, T., Rapid analysis of amino acid enantiomers by chiral-phase capillary gas chromatography, *J. Chromatogr. A*, 722, 221-227, **1996**.
- Abe, I., Nakahara, T., Enantiomer separation of amino acids as their *N*-alkyloxycarbonyl alkylamide derivatives by chiral phase capillary GC, *J. High Resol. Chromatogr.*, 19, 511-514, **1996**.
- Abe, I., Yanagi, H., Nakahara, T., Improvement in analytical procedures and precision of aspartic acid racemization age dating, *J. High Resol. Chromatogr.*, 20, 451-455, **1997**.
- Abraham, S.K., Anti-genotoxic effects in mice after interaction between coffee and dietary constituents, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 15-20, **1996**.
- Adrian, J., Xabregas, J., Pena, J., Carvalho, J.M., Gomes, N., La restauration en vitamine PP par la consommation de café – étude chez le pellageux, in *Proc. 5th ASIC Colloquium* (Lisbon), ASIC, Paris, **1971**.
- Aeschbacher, H.U., Wolleb, U., Löliger, J., Spadone, J.C., Liardon, R., Contribution of coffee aroma constituents to the mutagenicity of coffee, *Food Chem. Toxicol.*, 27, 227-232, **1989**.
- Ahmad, R., Magan, N., Microfloral contamination and hydrolytic enzyme differences between monsooned and non-monsooned coffees, *Let. in Appl. Microb.*, 34, 279-282, **2002**.
- Aishima, T., Aroma Discrimination by Pattern Recognition Analysis of Responses from Semiconductor Gas Sensor Array, *J. Agric. Food Chem.*, 39, 752-756, **1991**.
- Albertini, S., Friederich, U., Schlatter, C., Würzler, F.E., The influence of roasting procedure on the formation of mutagenic compounds in coffee, *Food Chem. Toxicol.*, 23, 593-597, **1985**.
- Alexander, J., Reistad, R., Hegstad, S., Frandsen, H., Ingebrigtsen, K., Paulsen, J.E., Becher, G., Biomarkers of exposure to heterocyclic amines: approaches to improve the exposure assessment, *Food Chem. Toxicol.*, 40, 1131-1137, **2002**.
- Alves, M.R., Casal, S. Oliveira, M. B.P.P., and Ferreira, M.A., Contribution of fatty acid profile obtained by HRGC / chemometric-techniques to the authenticity of green and roasted varieties, *JAOCS*, 80, 511-517, **2003**.
- Amorim, H.V., Basso, L.C., Crocomo, O.J., Teixeira, A.A., Polyamines in green and roasted coffee, *J. Agric. Food Chem.*, 25, 957-958, **1977**.
- Anderson, K. A., Smith, B. W., Chemical profiling to differentiate geographic growing origins of coffee., *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2068-2075, **2002**.

- Andrade, P.B., Leitão, R., Seabra, R.M., Oliveira, M.B., Ferreira, M.A., 3,4-Dimethoxycinnamic acid levels as a tool for differentiation of *Coffea canephora* var. *robusta* and *Coffea arabica*, *Food Chem.*, 61, 511-514, **1997**.
- Andrade, P.B., Leitão, R., Seabra, R.M., Oliveira, M.B., Ferreira, M.A., Development of an HPLC/diode-array detector method for simultaneous determination of seven hydroxycinnamic acids in green coffee, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 20, 2023-2030, **1997**.
- Antolini, F., Franciosini, S., Floridi, A.L., Floridi, A., An ion-pair HPLC method for the determination of histamine, tyramine, tryptamine, β -phenylethylamine and their amino acid precursors in cheeses for industrial purposes, *Ital. J. Food Sci.*, 11, 335-345, **1999**.
- Armas, R., Martinez, M., Vicente, C., Legaz, M.-E., Free and conjugated polyamines and phenols in raw and alkaline-clarified sugarcane juices *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2086-3092, **1999**.
- Arnold, U., Ludwig, E., Kühn, R., Möschwitzer, U., Analysis of free amino acids in green coffee beans. I. Determination of amino acids after precolumn derivatization using 9-fluorenylmethylchloroformate, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 199, 22-25, **1994**.
- Arnold, U.; Ludwig, E., Analysis of free amino acids in green coffee beans. II. Changes of the amino acid content in arabica coffees in connection with post-harvest model treatment, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 203, 379-384, **1996**.
- Ascherio, A., Zhang, S.M., Hernán, M.A., Kawachi, I., Colditz, G.A., Speizer, F.E., Willet, W.C., Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women, *Annals of Neurology*, 50, 56-63, **2001**.
- Ashihara, H., Crozier, A., Caffeine: a well known but little mentioned compounds in plant science, *Trends Plant Sci.*, 6, 407-413, **2001**.
- Augustsson, K., Skog, K., Jägerstad, M., Dickman, P.W., Steineck, G., Dietary heterocyclic amines and cancer of the colon, rectum, bladder, and kidney: a population-based study, *The Lancet*, 353, 703-707, **1999a**.
- Augustsson, K., Lidbland, J., Övervik, E., Steinek, G., A population-based dietary inventory of cooked meat and assessment of the daily intake of food mutagens, *Food Addit. Cont.*, 16, 215-225, **1999b**.
- Avallone, S., Guyot, B., Micghaux-Ferrière, N., Guiraud, J.P., Olguin, E., Brillouet, J.-M., Cell wall polysaccharides of coffee bean mucilage. Histological characterization during fermentation, in *Proc. 18th ASIC Colloquium* (Helsinki), ASIC, Paris, **1999**.
- Avallone, S., Guiraud, J.-P., Guyot, B., Olguin, E., Brillouet, J.-M., Fate of mucilage cell wall polysaccharides during coffee fermentation, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5556-5559, **2001**.
- Avallone, S., Guyot, B., Brillouet, J.-M., Olguin, E., Guiraud, J.-P., Microbial and biochemical study of coffee fermentation, *Current Microbiology*, 42, 252-256, **2001**.
- Avallone, S., Brillouet, J.-M., Guyot, B., Olguin, E., Guiraud, J.-P., Involvement of pectolytic microorganisms in coffee fermentation, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 37, 191-198, **2002**.
- Babe, E., Stress physiology: the functional significance of the accumulation of nitrogen-containing compounds, *J. Hort. Sci.*, 65, 231-243, **1990**.

- Bagni, N., Metabolism and accumulation of biogenic amines in plant food, *Amino Acids*, 17, 57, **1999**.
- Bais, H.P., Ravishankar, G.A., Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 1-34, **2002**.
- Baker, R.S.U., Arlauskas, A., Bonin, A.M., Angus, D., Detection of mutagenic activity in human urine following fried pork or bacon meals, *Cancer Lett.*, 16, 387-389, **1982**.
- Balyaya, K.J., Clifford, M.N., Chlorogenic acids and caffeine contents of monsooned Indian arabica and robusta coffees compared with dry and wet processed coffees from the same geographical area. In *Proc. 16th ASIC Colloquium (Kyoto)*, ASIC, Paris, 316-325, **1995**.
- Balzer, H.H., Acids in Coffee, in *Coffee: recent developments*, Clarke, R.J., Vitzthum, O.G., Eds.; Blackwell Science Ltd., United Kingdom, 18-32, **2001**.
- Banks, M., McFadden, C., Atkinson, C., *The world encyclopedia of coffee*: Lorenz Books, London, **1999**.
- Barceló-Barrachina, E., Moyano, E., Puignou, L., Galceran, M.T., Evaluation of different liquid chromatography-electrospray mass spectrometry systems for the analysis of heterocyclic amines, *J. Chromatogr. A.*, 1023, 67-78, **2004**.
- Bardner, R., Pest control, in *Coffee: Botany, Biochemistry, and Production of Beans and Beverage*, Clifford, M.N., Wilson, K.C., Eds.; Croom Helm, London, 208-218, **1985**.
- Bardócz, S., Duguid, T.J., Brown, D.S., Grant, G., Pusztai, A., White, A., Ralph, A., The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth, *British J. Nut.*, 73, 819-828, **1995**.
- Bättig, K., The physiological effects of coffee consumption, in *Coffee: Botany, Biochemistry, and Production of Beans and Beverage*, Clifford, M.N., Wilson, K.C., Eds.; Croom Helm, London, 304-439, **1985**.
- Baxter, J. H., Amino acids, in *Handbook of food analysis*, Nollet, L. M. L., ed., Marcel Dekker, New York, 197-228, **1996**.
- Berglund, T., Nicotinamide, a missing link in the early stress response in eukaryotic cells: a hypothesis with special reference to oxidative stress in plants, *FEBS Let.*, 351, 145-149, **1994**.
- Berglund, T., Ohlsson, A.B., Defensive and secondary metabolism in plant tissue cultures, with special reference to nicotinamide, glutathione and oxidative stress, *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, 43, 137-145, **1995**.
- Bergström, J., Factors affecting the formation of 4-methylimidazole in ammonia-treated fodder, *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1422-1425, **1991**.
- Bezuglov, V.V., Bobrov, M.Y., Archakov, A.V., Bioactive amides of fatty acids, *Biochemistry (Moscow)*, 63, 27-37, **1998**.
- Bicchi, C.P., Binello, A., Pellegrino, G.M., Vanni, A.C., Characterization of Green and Roasted Coffees through the Chlorogenic Acid Fraction by HPLC-UV and Principal Component Analysis, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1549-1555, **1995**.

- Bicchi, C.P., Panero, O.M., Pellegrino, G.M., Vanni, A.C., Characterization of Roasted Coffee and Coffee Beverages by Solid Phase Microextraction – Gas Chromatography and Principal Component Analysis, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4680-4686, **1997**.
- Biermann, C.J., Kinoshita, C.M., Marlett, J.A., Steele, R.D., Analysis of amino acids as *tert*-butyldimethylsilyl derivatives by gas chromatography, *J. Chromatogr.*, 357, 330-334, **1986**.
- Boxtel, M.P.J., Schmitt, J.A.J., Bosma, H., Jolles, J., The effects of habitual caffeine use on cognitive change: a longitudinal perspective, *Pharmac. Biochem. Behav.*, 75, 921-927, **2003**.
- Bradbury, A.G.W., Halliday, D.J., Chemical Structures of green coffee bean polysaccharides, *J. Agric. Food Chem.*, 38, 389-392, **1990**.
- Bradbury, A.G.W, Carbohydrates, in *Coffee: recent developments*, Clarke, R.J., Vitzthum, O.G., Eds.; Blackwell Science Ltd., United Kingdom, 1-17, **2001**.
- Briandet, R., Kemsley, E.K. and Wilson, R.H. Discrimination of *Arabica* and *Robusta* in Instant Coffee by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 170-174, **1996**.
- Brink, B., Damink, C., Joosten, H., Veld, J., Occurrence and formation of biologically active amines in foods, *Int. J. Food Microb.*, 11, 73-84, **1990**.
- Brückner, H., Hausch, M., Gas chromatographic detection of D-amino acids as common constituents of fermented foods, *Chromatographia*, 28, 487-492, **1989a**.
- Brückner, H., Wittner, R., Hausch, M., Godel, H., Chiral amino acid analysis in fermented foods using *o*-phthalaldehyde and novel *N*-acyl-L-cysteines, *Fresenius Z. Anal. Chem*, 333, 775-776, **1989b**.
- Brückner, H., Hausch, M., Detection of free D-amino acids in food by chiral phase capillary gas chromatography, *J. High Resol. Chromatogr.*, 12, 680-684, **1989c**.
- Brückner, H., Hausch, M., D-amino acids in food: detection and nutritional aspects, in *Chirality and Biological activity*. Holmsedt, B., Frank, H., Testa, B., eds., Alan R. Liss, Inc., New York, 129-136, **1990**.
- Brückner, H., Becker, D., Lüpke, M., Chirality of Amino Acids of microorganisms used in food biotechnology, *Chirality*, 5, 385-392, **1993**.
- Brückner, H., Westhauser, T., Godel, H., Liquid chromatographic determination of D- and L-amino acids by derivatization with *o*-phthalaldehyde and *N*-isobutyryl-L-cysteine. Applications with reference to the analysis of peptidic antibiotics, toxins, drugs and pharmaceutically used amino acids, *J. Chromatogr. A*, 711, 201-215, **1995**.
- Brückner, H., Schieber, A., Determination of free D-amino acids in mammalian by chiral gas chromatography-mass spectrometry, *J. High Resol. Chromatogr.*, 23, 576-582, **2000**.
- Brückner, N., Westhauser, T., Chromatographic determination of L- and D- amino acids in plants, *Amino Acids*, 24, 43-55, **2003**.
- Buckee, G.K., Bailey, T.P., Examination of some brewing materials and caramels for the possible occurrence of 4-methylimidazole, *J. Inst. Brew*, 84, 158-159, **1978**.

- Buffo, R.A., Cardelli-Freire, C., Coffee flavour: an overview, *Flavour and Fragr. J.*, 19, 99-104, **2004**.
- Burton, D.E., Powell, L.L., Xi, X., Reproducibility of the determination of caffeine in coffee by micellar electrokinetic capillary chromatography, *J. Microcol. Sep.*, 6, 5-10, **1994**.
- Butler, L.M., Sinha, R., Millikan, R.C., Martin, C.F., Newman, B., Gammon, M.D., Ammerman, A.S., Sandler, R.S., Heterocyclic amines, meat intake, and association with colon cancer in a population-based study, *Am. J. Epidemiol.*, 157, 434-445, **2003**.
- Camargo, M.C.R., Toledo, M.C.F., Farah, H.G., Caffeine daily intake from dietary sources in Brazil, *Food Addit, Contam.*, 16, 79-87, **1999**.
- Campa, C., Ballester, J.F., Doulebeau, S., Dussert, S., Hamon, S., Noirot, M., Trigonelline and sucrose in wild *Coffea* species, *Food Chem.*, in press, **2004**.
- Campos, L. S., Rodrigues, J. M. L. Application of chromatographic methods of analysis to free amino acids in green coffees, in *Proc. 5th ASIC Colloquium* (Lisbon), ASIC, Paris, 91-96 **1973**.
- Carnevale, J., An improved method for the determination of 4-methylimidazole in caramel, *Food Technol. Australia*, April, 165-172, **1975**.
- Carrier, O., Pons, G., rey, E., Richard, M.-O., Moran, C., Badoual, J., Olive, G., Maturation of caffeine metabolic pathways in infancy, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 44, 145-151, **1988**.
- Casal, S., Oliveira M. B., Ferreira M. A., Discrimination of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* var. *robusta* beans by their fatty acid composition, Euro Food Chem IX, Interlaken, Switzerland, 24-26 September, **1997**.
- Casal, S., Oliveira, M. B., & Ferreira, M. A., Development of an HPLC/diode-array detector method for simultaneous determination of trigonelline, nicotinic acid, and caffeine in coffee, *J. Liq. Chrom. & Rel. Techn.*, 21, 3187-3195, **1998**.
- Casal, S., Andrade, P.B., Oliveira, M.B., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Ferreira, M.A., Analysis of Hydroxycinnamic Acids of Coffee: A comparison of High Performance Liquid Chromatography and Capillary Zone Electrophoresis, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 22, 513-521, **1999**.
- Casal, S., Oliveira, M.B., Ferreira, M.A., A importância dos D-aminoácidos no controlo de qualidade dos produtos alimentares, *Rev. Port. Farm.*, 49, 81-86, **1999a**.
- Casal, S., Oliveira, M. B., & Ferreira, M. A., Gas chromatographic quantification of amino acid enantiomers in food matrices by their *N(O,S)*-ethoxycarbonyl heptafluorobutyl ester derivatives, *J. Chromatogr. A*, 866, 221-230, **2000**.
- Casal, S., Oliveira, M. B., Ferreira, M. A., HPLC/diode-array applied to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid, and caffeine in coffee, *Food Chem.*, 68, 481-485, **2000**.
- Casal, S., Oliveira, M.B., Ferreira, M.A., Aminas heterocíclicas aromáticas: implicações da sua presença nos alimentos tratados termicamente, *Rev. Port. Farm.*, 50, 65-79, **2000a**.
- Casal, S., Oliveira, M.B.P.P., Alves, M.R., Ferreira, M.A., Discriminate analysis of roasted coffee varieties for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine content, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3420-3424, **2000**.

- Casal, S., Oliveira, M. B. P. P., Alves, M. R., Ferreira, M. A., Characterization of free amino acid enantiomers of arabica and robusta coffee species, in *Proc. 19th ASIC Colloquium* (Trieste), ASIC, Paris, **2001**.
- Casal, S., Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, M.A., Determination of biogenic amines in coffee by an optimized liquid chromatographic method, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 25, 2535-2549, **2002**.
- Casal, S., Alves, M.R., Mendes, E., Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, M.A., Discrimination between Arabica and Robusta Coffee Species on the Basis of their Amino Acid Enantiomers, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 6495-6501, **2003**.
- Cerny, M., Blumenthal, A., 4-methylimidazole in caramel and foods coloured with caramel. Gas chromatographic determination with nitrogen-specific detectors, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 168, 87-90, **1979**.
- Chaves das Neves, H.J., Vasconcelos, A.M.P., Capillary gas chromatography of amino acids, including asparagine and glutamine: sensitive gas chromatographic–mass spectrometric and selected ion monitoring gas chromatographic–mass spectrometric detection of the N,O(S)-tert.-butyldimethylsilyl derivatives, *J. Chromatogr.*, 392, 249-258, **1987**.
- Chaves das Neves, H.J., Vasconcelos, A.M.P., Costa, M.L., Racemization of wine free amino acids as function of bottling age, *Chirality and Biological activity*. Holmsedt, B., Frank, H., Testa, B., eds., Alan R. Liss, Inc., New York, 137-143, **1990**.
- Chaves das Neves, H.J., Noronha, J.P., Recognition of vinification technology through gas chromatographic data on enantiomeric purity of free amino acids, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 352, 783-787, **1995**.
- Chen, B. H., Chiu, C. P., Analysis, formation and inhibition of heterocyclic amines in foods: an overview, *J. Food Drug Anal.*, 6, 625-636, **1998**.
- Chiavaro, E., Caligiani, A., Palla, G., Chiral indicators of ageing in balsamic vinegars of Modena, *Ital. J. Food Sci.*, 4, 329-337, **1998**.
- Chiu, C. P., Yang, D. Y., Chen, B. H., Formation of heterocyclic amines in cooked chicken legs, *J. Food Prot.*, 61, 712-719, **1998**.
- Christensen, L., Murray, T., A review on the relationship between coffee consumption and coronary heart disease, *J., Commun. Health*, 15, 391-408, **1990**.
- Christian, M.S., Brent, R.L., Teratogen update: evaluation of the reproductive and development risks of caffeine, *Teratology*, 64, 51-78, **2001**.
- Cidec, Centro Interdisciplinar de Estudos Económicos, *Sector torrefactor – potencialidades e perspectivas de desenvolvimento*; Associação Nacional dos Torrefactores, **1991**.
- Ciolino, L.A., Determination and classification of added caramel color in adulterated acerola juice formulations, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1746-1753, **1998**.
- Cirilo, M.P.G., Coelho, A.F.S., Araújo, C.M., Gonçalves, F.R.B., Nogueira, F.D., Glória, M.B.A., Profiles and levels of bioactive amines in green and roasted coffee, *Food Chem.*, 82, 397-402, **2003**.

- Clarke, R.J., Green coffee processing, *Coffee: Botany, Biochemistry, and Production of Beans and Beverage*, Clifford, M.N., Wilson, K.C., Eds.; Croom Helm, London, 230-250, **1985a**.
- Clarke, R.J., The technology of converting green coffee into the beverage, in *Coffee: Botany, Biochemistry, and Production of Beans and Beverage*, Clifford, M.N., Wilson, K.C., Eds.; Croom Helm, London, 375-393, **1985b**.
- Clarke, R.J., Grading, Storage, Pre-treatments and Blending, in *Coffee*, Vol. 2 – Technology, Clarke, R.J., Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science, London, 35-58, **1987a**.
- Clarke, R.J., Roasting and Grinding, in *Coffee*, Vol. 2 – Technology, Clarke, R.J., Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science, London, 73-107, **1987b**.
- Clarke, R.J., Packing of roast and instant coffee, in *Coffee*, Vol. 2 – Technology, Clarke, R.J., Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science, London, 210-219, **1987c**.
- Clarke, R.J., Green coffee, in *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P., Eds.; Academic Press, London, 1481-1487, **2003a**.
- Clarke, R.J., Roast and Ground, in *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P., Eds.; Academic Press, London 1487-1493, **2003b**.
- Clifford, M.N., Chlorogenic acids – their complex nature and routine determination in coffee beans, *Food Chem.*, 4, 63-71, **1979**.
- Clifford, M. N., Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. in *Coffee: Botany, Biochemistry, and Production of Beans and Beverage*, Clifford, M.N., Wilson, K.C., Eds.; Croom Helm, London, 305-374, **1985a**.
- Clifford, M.N., Chlorogenic acids, In *Coffee: Vol.1 Chemistry*, Clarke, R.J., Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science Publishers: London, chp.5, 153-202, **1985b**.
- Clifford, M.N., Kellard, B., Ah-Sing, E., Caffeoyltyrosine from green robusta coffee beans, *Phytochem.*, 28 1989-1990, **1989a**.
- Clifford, M.N., Williams, T., Bridson, D., Chlorogenic acids and caffeine as possible taxonomic criteria in *Coffea* and *Psilanthus*, *Phytochem.*, 28, 829-838, **1989b**
- Clifford, M.N., Ramirez-Martinez, J.R., Phenols and caffeine in wet-processed coffee beans and coffee pulp, *Food Chem.*, 40, 35-42, **1991**.
- Clifford, M.N., The nature of chlorogenic acids – are they advantageous compounds in coffee?, in *Proc. 17th ASIC*, Kenya, 79-91, **1997**.
- Clifford, M.N., Johnston, K.L., Knight, S., Kuhnert, N., Hierarchical scheme for LC-MS identification of chlorogenic acids, *J Agric Food Chem.*, 51, 2900-2011, **2003**.
- Conover, W.J., *Practical nonparametric Statistics*, John Wiley & Sons, Inc., New York, **1980**.
- Correia, A.M., *Manual da tecnologia do café*; Cultivar, Porto, **1995**.
- Correia, A.M.N.G., Leitão, M.C.A., Clifford, M.N., Caffeoyl-tyrosine and Angola II as characteristic markers for Angolan *robusta* coffees, *Food Chem.*, 53, 309-313, **1995**.

- Cortez, J.G., Menezes, H.C., A new method for green coffee bean processing and some flavour characteristics of the beverage, In *Proc. 16th ASIC Colloquium* (Kyoto), ASIC, Paris, **1995**.
- Coué, I., Hummel, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., Amrani, A., Involvement of polyamines in root development, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76, 1-10, **2004**.
- Cruz, R.M.V., *Controlo de qualidade de cafés e de cacaos*, Relatório de estágio, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, **1992**.
- Csapo, J., Csapo, K.Z., Stefler, J., Martin, T.G., Nemethy, S., Influence of mastitis on D-amino acid content of milk, *J. Dairy Sci.*, 78, 2375-2381, **1995**.
- Danho, D., Naulet, N., Martin, G.J., Deuterium, carbon and nitrogen isotopic analysis of natural and synthetic caffeine. Authentication of coffees and coffee extracts, *Analisis*, 20, 179-184, **1992**.
- D'Aniello, A., D'Onofrio, G., Pischelota, M., D'Aniello, G., Vetere, A., Petrucelli, L., Fisher, G., Biological role of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase. Effects of D-amino acids, *J. Biol. Chem.*, 268, 26941-26949, **1993**.
- D'Aniello, A., Di Fiore, M., & Fisher, G., Occurrence of D-aspartic acid in animal tissues and its role in the nervous and endocrine systems, *Trends in Comp. Bioch. Phys.*, 4, 1-21, **1998**.
- Daglia, M., Cuzzoni, M.T., Dacarro, C., Antibacterial activity of coffee: relationship between biological activity and chemical markers, *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2273-2277, **1994**.
- Daglia, M., Peptti, A., Gregotti, C., Bertè, F., Gazzani, G., In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1449-1454, **2000**.
- Dart, S.K., Nursten, H.E., Volatile components, in *Coffee: Vol.1 Chemistry*, Clarke, R.J., Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science Publishers: London, chp.7, 223-265, **1985**.
- Dashwood, R.H., Xu, M., Hernaez, J.F., Hasaniya, N., Youn, K., Razzuk, A., Cancer chemopreventive mechanisms of tea against heterocyclic amine mutagens from cooked meats, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 220, 239-243, **1999**.
- Dashwood, R.H., Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an "A-to-Z" guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models, *Mut. Res.*, 511, 89-112, **2002**.
- Dauberte, B., Estienne, J., Guerere, M, Contribution à l'étude de la formation d'hydroxymethylfurfural dans les boissons a base de jus de fruits et dans les cafés "torrefacto", *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 83, 231-253, **1990**.
- De Maria, C.A.B., Trugo, L.C., Neto, F.R.A., Moreira, R.F.A., Arabinogalactan as a potential furfural precursor in roasted coffee, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 29, 559-562, **1994**.
- De Maria, C.A.B., Trugo, L.C., Moreira, R.F.A, Simultaneous determination of total chlorogenic acid, trigonelline and caffeine in green coffee samples by high performance gel filtration chromatography, *Food Chem.*, 52, 447-449, **1995**.
- De Maria, C.A.B., Trugo, L.C., Neto, F.R.A., Moreira, R.F.A., Alviano, C.S., Composition of green coffee water-soluble fractions and identification of volatiles formed during roasting, *Food Chem.*, 55, 203-207, **1996a**.

- De Maria, C.A.B., Trugo, L.C., Corá, G., Application of HPSE chromatography with refractive index detector to green coffee analysis, *Quim. Nova*, 19, 350-352, **1996b**.
- Decreto-Lei 53/89, artigo 4º c). Denominação e características dos produtos, Diário da república nº 44, 22 de Fevereiro, **1989**.
- Dennis, M.J., Recent developments in food authentication, *Analyst*, 123, 151R-156R, **1998**.
- Domínguez, E., Marko-Varga, G., Carlsson, M., Gorton, L., Liquid chromatographic separation and stereoselective detection of L- and D-amino acids with catalytic reaction detection using immobilized enzymes, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 8, 825-830, **1990**.
- Dorfner, R., Ferge, T., Uchimura, T., Yeretizian, C., Zimmermann, R., Kettrup, A., Laser / chemical ionization – mass spectrometry as an on-line analysis technique for monitoring the coffee roasting process, in *Proc. 19th ASIC Colloquium* (Trieste), ASIC, Paris, **2001**.
- Downey, G., Briandet, R., Wilson, R.H., Kemsley, E.K., Near- and Mid-Infrared Spectroscopies in Food Authentication: Coffee Varietal Identification, *J. Agric. Food Chem.* 45, 4357-4361, **1997**.
- Drozd, J., Amino Acids, in *Chemical Derivatization in gas chromatography*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands, 126-148, **1991**.
- Dubois, C.P.R., International Coffee Organization (ICO), in *Coffee: recent developments*, Clarke, R.J., Vitzthum, O.G., Eds.; Blackwell Science Ltd., United Kingdom, 238-241, **2001**.
- Duflos, G., Dervin, C., Malle, P., Bouquelet, S., Relevance of Matrix effect in Determination of Biogenic Amines in Plaice (*Pleuronectes platessa*) and Whiting (*Merlangus merlangus*). *J. AOAC Int.*, 82, 1097-1101, **1999**.
- Duplatre, A., Tisse, C., Estienne, J., Contribution à l'identification des espèces Arabica et Robusta par étude de la fraction stérolique, *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 828, 259-270, **1984**.
- Duplatre, A., Arzouyan, C., Tisse, Ch., Guerere, M., Estienne, J., Essai de différenciation entre café a torrefaction conventionnelle et café a torrefaction rapide, *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 80, 139-153, **1987**.
- Dutra, E.R., Oliveira, L.S., Franca, A.S., Ferraz, V.P., Afonso, R.J.C.F., A preliminary study on the feasibility of using the composition of coffee roasting exhaust gas for the determination of the degree of roast, *J. Food Engin.*, 47, 241-246, **2001**.
- Edenharder, R., Sagr, J.W., Glatt, H., Muckel, E., Platt, K.L., Protection by beverages, fruits, vegetables, herbs, and flavonoids against genotoxicity of 2-acetylaminofluorene and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in metabolically competent V79 cells, *Mut. Res.*, 521, 57-72, **2002**.
- Eggers, R., Pietsch, A., Technology I: Roasting, in *Coffee: recent developments*, Clarke, R.J., Vitzthum, O.G., Eds.; Blackwell Science Ltd., United Kingdom, 90-107, **2001**.
- Einarsson, S., Josefsson, B., Moller, P., Sanchez, D., Separation of amino acid enantiomers and chiral amines using precolumn derivatization with (+)-1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate and reversed-phase liquid chromatography, *Anal. Chem.*, 59, 1191, **1987**.

- Embola, C.W., Weisburger, J.H., Weisburger, M.C., Urinary excretion of *N*-OH-2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline-*N*-glucuronide in F344 rats is enhanced by green tea, *Carcinogenesis*, 22, 1095-1098, **2001**.
- Erbe T., Brückner, H., Chiral amino acid analysis of vinegars using gas chromatography – selected ion monitoring mass spectrometry, *Z. Lebensm. Unters. Forch. A*, 207, 400-409, **1998**.
- Erbe, T., Brückner, H., Chromatographic determination of amino acid enantiomers in beers and raw materials used in their manufacture, *J. Chromatogr. A*, 881, 81-91, **2000**.
- Ercal, N., Luo, X., Matthews, R.H., Armstrong, D.W., In vitro study of the metabolic effects of D-amino acids, *Chirality*, 8, 24-29, **1996**.
- Evershed R.P., Advances in Silylation, in *Handbook of Derivatives for Chromatography*, Blau, K., Halket, J.M., Eds., John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England, 52-101, **1993**.
- Fábián, V., Morvai, M., Pintér-Szakács, M., Molnár-Perl, I., Standardization of cation-exchange clean-up prior to gas chromatography of amino acids, *J. Chromatogr.*, 553, 87-92, **1991**.
- Fábián, Z., Izvekov, V., Salgó, A., Örsi, F., Near-infrared Reflectance and Fourier Transform Infrared Analysis of Instant Coffee Mixtures, *Analytical Proceedings Including Analytical Communications*, 31, 261-263, **1994**.
- Facchini, P.J., Hagel, J., Zulak, K.G., Hydroxycinnamic acid amide metabolism: physiology and biochemistry, *Can. J. Bot./Rev. Can. Bot.*, 80, 577-589, **2002**.
- FAOSTAT data, www.faostat.fao.org, **2004**.
- Felton, J.S., Fultz, E., Dolbeare, F.A., Knize, M.G., Reduction of heterocyclic amine mutagen/carcinogens in fried beef patties by microwave pre-treatment, *Food Chem. Toxic.*, 32, 879-903, **1994**.
- Fernandes, J.O., Ferreira, M.A., Gas chromatographic-mass spectrometric determination of 4-(5)methylimidazole in ammonia caramel colour using ion-pair extraction and derivatization with isobutylchloroformate, *J. Chromatogr. A*, 786, 299-308, **1997**.
- Fernandes, J.O., Ferreira, M.A., Combined ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the simultaneous determination of diamines, polyamines and aromatic amines in Port wine and grape juice, *J. Chrom. A*, 886, 183-195, **2000**.
- Fernandes, J.O., Judas, I.C., Oliveira, M.B., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Ferreira, M.A., A GC-MS method for quantification of histamine and other biogenic amines in beer, *Chromatographia Suppl.*, 53, S-327-S-331, **2001**.
- Ferreira, L.A.B., Oliveira, E.F., Vilar, H., Aguiar, H.C., Contribuições para a identificação da genuinidade do café, in *Proc. 5th ASIC Colloquium* (Lisboa), ASIC, Paris, France, **1971**.
- Fisher, G.H., D'Aniello, A., Vetere, A., Padula, L., Cusano, G.P., Man, E.H., Free D-aspartate and D-alanine in normal and Alzheimer brain, *Brain Res. Bull.*, 26, 983-985, **1991**.
- Fischer, G.H., Torres, D., Bruna, J., Cerwinski, S., Martin, T., Bergljung, C., Gruneiro, A., Chou, S.-J., Man, E.H., Papatheoderou, S., Presence of D-Aspartate and D-Glutamate in tumor proteins, *Cancer Biochem. Biophys.*, 15, 79-82, **1995**.

- Fischer, M., Reimann, S., Trovato, V., Redgwell, R.J., Polysaccharides of green arabica and robusta coffee beans, *Carbohydrate Research*, 330, 93-101, **2001**.
- Fixon-Owoo, S., Levasseur, F., William, K., Sabado, T.N., Lowe, M., Klose, M., Mercier, A.J., Fields, P., Atkinson, J., Preparation and biological assessment of hydroxycinnamic acid amides of polyamines, *Phytochem.*, 63, 315-334, **2003**.
- Flores, H.E., Young, N.D., Galston, A.W., Polyamine metabolism and plant stress. In *Cellular and Molecular Biology of Plant Stress*, Key, J.L., Kosuge, T., Eds.; Alan R. Liss, Inc.: New York, 93-114, **1985**.
- Folstar, P., van der Plas, H.C., Pilnik, W., Schols, H.A., Melger, P., Liquid chromatographic analysis of N^β-alkanoyl-5-hydroxytryptamine (C-5-HT) in green coffee beans, *J. Agric. Food Chem.*, 287, 12-15, **1979**.
- Folstar, P., Schols, H.A., van der Plas, H.C., Pilnik, W., Landheer, C.A., Veldhuizen, A., New tryptamine derivatives isolated from wax of green coffee beans, *J. Agric. Food Chem.*, 28, 872-874, **1980**.
- Folstar, P., Lipids, in *Coffee*, Vol. 1 – Chemistry, Clarke, R.J., Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science, London, 203-222, **1985**.
- Fountoulakis, M., Lahm, H.-W., Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins, *J. Chromatogr. A*, 826, 109-134, **1998**.
- Franca, A.S., Oliveira, L.S., Borges, M.L.A., Vitorino, M.D., Evolução da composição do extrato aquoso de café durante o processo de torrefacção, *Ver. Brasil.de Armazenamento*, 46, 37-47, **2001**.
- Frandsen, H., Frederiksen, H., Alexander, J., 2-Amino-1-methyl-6-(5-hydroxy)phenylimidazo[4,5-β]pyridine (5-OH-PhIP), a biomarker for the genotoxic dose of the heterocyclic amines, 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-β]pyridine, *Food Chem. Toxicol.*, 40, 1125-1130, **2002**.
- Frank, H., Nicholson, G.J., Bayer, E., Rapid gas chromatographic separation of amino acid enantiomers with a novel chiral stationary phase, *J. Chromatogr. Sci.*, 15, 174-176, **1977**.
- Frank H., G.J. Nicholson, E. Bayer, Enantiomer labelling, a method for the quantitative analysis of amino acids, *J. Chromatogr.*, 167, 187-196, **1978**.
- Frega, N., Bocci, F., Lercker, G., High resolution gas chromatographic method for determination of Robusta coffee in commercial blends, *J. High Resol. Chromatogr.*, 17, 303-307, **1994**.
- Friedman, M., Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3457-3479, **1999**.
- Fuchs, G., Sundell, S., Quantitative determination of 4-methylimidazole as 1-acetyl derivative in caramel color by gas-liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.*, 23, 120-122, **1975**.
- Fukushima T., Santa, T., Homma, H., Nagatomo, R., Imai, K., Determination of D-amino Acids in serum from patients with renal dysfunction, *Biol. Pharm. Bull.*, 18, 1130-1132, **1995**.
- Galceran, M. T., Pais, P., Puignou, L., Isolation by solid-phase extraction and liquid chromatographic determination of mutagenic amines in beef extracts, *J. Chromatogr. A.*, 719, 203-212, **1996**.

- Gandolfi, I., Palla, G., Delprato, L., De Nisco, F., Marchelli, R., Salvadori, C., D-Amino acids in milk as related to heat treatments and bacterial activity, *J. Food Sci.*, 57, 377-379, **1992**.
- Gehrke, C.W., Kuo, K.C., Zumwalt, R.W., *Amino Acid Analysis by Gas Chromatography*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, **1987**.
- Gennaro, M.C., Giacosa, D., Abrigo, C., Biglini, P., Campi, E., Organic bases, in *Handbook of Food Analysis*, Nollet, L., Ed, Marcell Dekker, Inc., New York, Vol. 1, 745-820, **1996**.
- Gilbert, J., Ed., Applications of Mass Spectrometry in Food Science, Gilbert, J., Ed.; Elsevier Applied Science, England, 73, **1987**.
- Glória, M.B.A., Amines, in *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, Caballero, B. Trugo, L., Finglas, P. Eds.; Academic Press: London, 173-181, **2003**.
- Gooderham, N.J., Murray, S., Lynch, A.M., Yadollahi-Farsani, M., Zhao, K., Boobis, A.R., Davies, D.S., Food-derived heterocyclic amine mutagens: variable metabolism and significance to humans, *Drug Metab. Disp.*, 29, 529-534, **2001**.
- Gross, G.A., Simple methods for quantifying mutagenic heterocyclic aromatic amines in food products, *Carcinogenesis*, 11, 1597-1603, **1990**.
- Gross, G. A., Wolleb, U., 2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline is not detectable in commercial instant and roasted coffees, *J. Agric. Food Chem*, 39, 2231-2236, **1991**.
- Gross, G. A., Grüter, A., Quantitation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic aromatic amines in food products, *J. Chromatogr. A*, 592, 271-278, **1992**.
- Guerrero, G., Suárez, M., Chlorogenic Acids as a Potential Criterion in Coffee Genotype Selections, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2454-2458, **2001**.
- Guyot, B., Guele, D., Assemat, S., Tchana, E., Pomathios, L., Influence du mode de préparation du café vert robusta sur la composition chimique et ses qualités organoleptiques. In *Proc. 16th ASIC Colloquium (Kyoto)*, ASIC, Paris, 267-277, **1995**.
- Halász, A., Caráth, Á., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W., Biogenic amines and their production by microorganisms in food, *Trends Food Sci. Technol.*, 5, 42-49, **1994**.
- Hargreaves, M.B., Jones, B.C., Smith, D.A., Gescher, A., Inhibition of p-nitrophenol hydroxylase in rat liver microsomes by small aromatic and heterocyclic molecules, *Drug Metab. Dispos.*, 22, 806-810, **1994**.
- Hasegawa, K., Ono, T., Noguchi, T., Vibrational spectra and ab initio DFT calculations of 4-methylimidazole and its different protonation forms: Infrared and Raman markers of the protonation state of a histidine side chain, *J. Phys. Chem. B*, 104, 4253-4265, **2000**.
- Hashim, L., Chaveron, H., Use of methylpyrazine ratios to monitor the coffee roasting, *Food Res.Int.*, 28, 619-623, **1996**.
- Hashimoto, A., Nishikawa, T., Oka, T., Takahashi, K., Determination of free amino acid enantiomers in rat brain and serum by high-performance liquid chromatography after derivatization with *N*-tert.-butyloxycarbonyl-L-cysteine and *o*-phthalaldehyde, *J. Chromatogr.*, 582, 41-48, **1992**.

- Hawthorne, S.B., Miller, D.J., Powliszyn, J., Arthur, L., Solventless determination of caffeine in beverages using solid-phase microextraction with fused-silica fibers, *J. Chromatogr.*, 603, 185-191, **1992**.
- Heaney, R.P., Effects of caffeine on bone and the calcium economy, *Food Chem. Toxic.*, 40, 1263-1270, **2002**.
- Herraiz T., Identification and occurrence of the bioactive β -carbolines norharman and Harman in coffee brews, *Food Addit. Contam.*, 19, 748, **2002**.
- Hornero-Mendez, D., Garrido-Fernandes, A., Biogenic amines in table olives. Analysis by high-performance liquid chromatography, *Analyst*, 119, 2037-2041, **1994**.
- Hurst, W.J., Martin Jr., R.A., The quantitative determination of caffeine in beverages using capillary electrophoresis, *Analisis*, 21, 389-391, **1993**.
- Hušek, P., Amino acid derivatization and analysis in five minutes, *FEBS Letters*, 280, 354-356, **1991a**.
- Hušek, P., Rapid derivatization and gas chromatographic determination of amino acids, *J. Chromatogr.*, 552, 289-299, **1991b**.
- Hušek P., Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents, *J. Chromatogr. B*, 717, 57-91, **1998**.
- ICO, International Coffee Organization, www.ico.org, 2004.
- Igarashi K., Kashiwagi, K., Polyamines: Mysterious Modulators of Cellular Functions, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 271, 559-564, **2000**.
- Iki, N., Narumi, F., Suzuki, T., Sugawara, A., Miyano, S., A new chiral stationary phase for gas chromatography by use of a chiral thiacalix[4]arene derivative, *Chem. Lett.*, 1065-1066, **1998**.
- Illy, A., Viani, R., *Espresso Coffee: the chemistry of quality*; Academic Press Limited, London, **1995**.
- Imai, K., Fukushima T., Santa, T., Homma, H., Hamase, K., Sakai, K., Kato, M., Analytical chemistry and biochemistry of D-amino acids, *Biomed. Chromatogr.*, 10, 303-312, **1996**.
- Imai, K., Fukushima T., Santa, T., Homma, H., Huang, Y., Sakai, K., Kato, M., Distribution of free D-amino acids in tissues and body fluids of vertebrates, *Enantiomer*, 2, 143-145, **1997**.
- IPQ, Instituto Português da qualidade, www.ipq.pt, **2004**.
- ISO, International Organization for Standardization, www.iso.ch, **2004**.
- Inamasu, T., Luks, H., Vavrek, M. T., Weisburger, J. H., Metabolism of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in the male rat, *Food Chem. Toxic.*, 27, 369-376, **1989**.
- Ishibe, N., Sinha, R., Hein, D.W., Kulldorff, M., Strickland, P., Fretland, A.J., Chow, W.-H., Kadlubar, F.F., Lang, N.P., Rothman, N., Genetic polymorphisms in heterocyclic metabolism and risk of colorectal adenomas, *Pharmacogenetics*, 12, 145-150, **2002**.
- Itoh, E., Nishida, Y., Togashi, Y., Ohru, H., Meguro, H., Simultaneous analysis of enantiomeric amino acids based on derivatization with (S)-(+)-2-*t*-butyl-2-methyl-1,3-benzodioxole-4-carboxylic acid and high-performance liquid chromatography, *Anal. Sci.*, 12, 551-556, **1996**.

- Jacobs, B.L., Serotonin, Motor Activity and Depression-Related Disorders. *American Scientist*, **1994**, 82, 456-463.
- Jacobson, T., Gunderson, R. W., Applied cluster analysis, in *Statistical Procedures in Food Research*; Piggott, J. R., ed., Elsevier Applied Science: London, U.K., **1986**.
- Janoszka, B., Blaszczyk, U., Warzecha, L., Strózyk, M., Damasiewicz-Bodzek, A., Bodzek, D., Clean-up procedures for the analysis of heterocyclic aromatic amines (aminoazaarenes) from heat-treated meat samples, *J. Chromatogr. A* 938, 155-165, **2001**.
- Johansson, M. A. E., Knize, M. G., Jägerstad, M., Felton, J.S., characterization of mutagenic activity in instant hot beverage powders, *Environ. Mol. Mut.*, 25 154-161, **1995**.
- Josyula, S., Schut, H.A.J., Dietary omega-3 fatty acids as potential inhibitors of carcinogenesis: effect on DNA adducts formation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in mice and rats, *Food Chem. Toxic.*, 37, 287-296, **1999**.
- Kakkar, R.J., Rai, V.K., Plant polyamines in flowering and fruit ripening, *Phytochem.*, 33, 1281-1288, **1993**.
- Kamm, W., Dionisi, F., Fay, L.-B., Hischenhuber, C., Schmarr, H., Engel, K.-H., Rapid and simultaneous analysis of 16-O-methylcafestol and sterols as markers for assessment of green coffee bean authenticity by on-line LC-GC, *JAOCS*, 79, 1109-1113, **2002**.
- Karangwa, E., Mitchell Jr., G.E, Tucker, R.E., High-performance liquid chromatographic determination of 4-methylimidazole in sheep plasma and in ammoniated tall fescue hay, *J. Chromatogr.*, 532, 105-113, **1990**.
- Karangwa, E., Mitchell Jr., G.E, Tucker, R.E., Pharmacokinetics of 4-methylimidazole in sheep, *J. Animal Sci.*, 68, 3277-3284, **1990a**.
- Karr, R.M., Bronchoprovocation studies in coffee workers asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 64, 650-654, **1974**.
- Kataoka H., Nishioka S., Kobayashi M., Hanaoka T., Tsugane S., Analysis of mutagenic heterocyclic amines in cooked food samples by gas chromatographic with nitrogen-phosphorus detector, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 69, 682-689, **2002**.
- Kataoka, H., Methods for the determination of mutagenic heterocyclic amines and their applications in environmental analysis, *J. Chromatogr. A*, 774, 121-142, **1997a**.
- Kataoka, H., Kijima, K., Analysis of heterocyclic amines as their N-dimethylaminomethylene derivatives by gas chromatography with nitrogen-phosphorous selective detection, *J. Chromatogr. A*, 767, 187-294, **1997b**
- Kataoka, H., Lord, H.L., Pawliszyn, J., Applications of solid-phase microextraction in food analysis, *J. Chromatogr. A*, 880, 35-62, **2000**.
- Keating, G.A., Sinha, R., Layton, D., Salmon, C.P., Knize, M.G., Bogen, K.T., Lynch, C.F., Alavanja, M., Comparison of heterocyclic amine levels in home-cooked meats with exposure indicators (Unites States), *Cancer Causes Cont.*, 11, 731-739, **2000**.
- Keating, G.A., Bogen, K.T., Methods for estimating heterocyclic amine concentration in cooked meats in the US diet, *Food Chem. Toxic.*, 39, 29-43, **2001**.

- Kele, M., Ohmacht, R., Determination of serotonin released from coffee wax by liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.*, 730, 59-62, **1996**.
- Kemsley, E.K., Ruault, S., Wilson, R.H., Discrimination between *Coffea arabica* and *Coffea canephora* variant *robusta* beans using infrared spectroscopy, *Food Chem.*, 54, 321-326, **1995**.
- Kikugawa, K., Kato, T., Takahashi, S., Possible presence of 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline and other heterocyclic amine-like mutagens in roasted coffee beans, *J. Agric. Food Chem.*, 37, 881-886, **1989**.
- Kino, T., Takagi, T., Effects of far infrared heating on coffee beans roasting, in *Proc. 16th ASIC Colloquium* (Kyoto), ASIC, Paris, **1995**.
- Kitson, F. G, Larsen, B.S., McEwen, C.N., Amino acids, in *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical guide*, Kitson, F. G, Larsen, B.S., McEwen, C.N., Eds., Academic Press Inc., San Diego, California, 87-94, **1996**.
- Klejduš, B., Moravcová, J., Kubáň, V., Reversed-phase high-performance liquid chromatographic/mass spectrometric method for separation of 4-methylimidazole and 2-acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole at pg levels, *Anal. Chim. Acta*, 477, 49-58, **2003**.
- Knize, M.G., Felton, J.S., Gross, G.A., Chromatographic methods for the analysis of heterocyclic amine food mutagens/carcinogens, *J. Chromatogr.*, 624, 253-265, **1992**.
- Knize, M.G., Dolbeare, F.A., Carroll, K.L., Moore, D.H., Felton, J.S., Effect of cooking time and temperature on the heterocyclic amine content of fried beef patties, *Food Chem. Toxic.*, 32, 595-603, **1994**.
- Knize, M. G., Dolbeare, F. A., Cunningham P. L., Felton, J. S., Mutagenic activity and heterocyclic amine content of the human diet, in *Princess Takamatsu Symp.*, Princeton Scientific Publishing Co., Inc., New Jersey. USA, 30-38, **1995**.
- Knize, M. G., Sinha, R., Rothman, N., Brown, E. D., Salmon, C. P., Levander, O. A., Cunningham, P. H., Felton, J. S., Heterocyclic amine content in fast-food meat products, *Food Chem. Toxic*, 33, 545-551, **1995a**.
- Knize, M. G., Salmon, C. P., Hopmans, E. C., Felton, J. S., Analysis of foods for heterocyclic aromatic amine carcinogens by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 763, 179-185, **1997a**.
- Knize, M. G., Salmon, C. P., Mehta, S. S., Felton, J. S., Analysis of cooked muscle for heterocyclic aromatic amine carcinogens, *Mut. Res.*, 376, 129-134, **1997b**.
- Knize, M. G., Sinha, R., Brown, E. D., Salmon, C. P., Levander, O. A., Felton, J. S., Rothman, N., Heterocyclic amine content in restaurant-cooked hamburgers, steaks, ribs, and chicken, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4648-4651, **1998**.
- Knize, M. G., Salmon, C. P., Pais, P., Felton, J. S., Food heating and the formation of heterocyclic aromatic amine and polycyclic aromatic hydrocarbon mutagens/carcinogens, in *Impact of Processing on Food Safety*, Jackson, S. L., Knize, M. G., Morgan, J. N., Eds., Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 179-193, **1999**.

- König, W. A., Krebber, R., Mischnick, P., Cyclodextrins as chiral stationary phases in capillary gas chromatography. Part V: Octakis(3-O-butyl-2,6-di-O-pentyl)- γ -cyclodextrin, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 12, 732-738, **1989**.
- Kölling-Speer, I., Kurt, A., Nguyen Thu, Speer K., Cafestol and Dehydrocafestol in Roasted Coffee. *Proc. 17th ASIC Colloquium* (Nairobi), ASIC, Paris, **1997**.
- Kölling-Speer, I., Frenzel, T., Speer, K., A new Method for the Determination of 16-o-Methylcafestol in Roasted Coffee. In *Proc. 18th ASIC Colloquium* (Helsinki), ASIC, Paris, **1999**.
- Kölling-Speer, I., Speer, K., 16-O-methylkahweol in Robusta coffee, In *Proc. 19th ASIC Colloquium* (Trieste), ASIC, Paris, **2001a**.
- Kölling-Speer, I., Speer, K., Contents of diterpenes in green coffees assigned for the European market In *Proc. 19th ASIC Colloquium* (Trieste), ASIC, Paris, **2001b**.
- Koppenhoefer, B., Bayer, E., *The Science of Chromatography*, Bruner, F., ed.; Elsevier, Amsterdam, Netherlands, **1985**.
- Kreil, G., D-amino acid in animal peptides, *Annu. Rev. Biochem.*, 66, 337-345, **1997**.
- Kwasny, H., Werkhoff, P., Die Bestimmung des Röstgrades von Bohnenkaffee im daraus hergestellten Kaffee-Extrakt, *Lebensmittelchemie und Gerichtliche Chemie*, 32, 36-38, 1978, citado em Macrae, R., Nitrogenous Components, *Coffee*, Vol. I: Chemistry, Clarke, R.; Macrae, R., Eds., Elsevier Applied Science, London, 130, **1987**.
- Ky, C.L., Guyot, B., Louarn, J., Hamon, S., Noiro, M., Trigonelline inheritance in the interspecific *Coffea pseudozanguebariae* x *C. liberica* var. *dewevrei* cross, *Theor. Appl. Genet.*, 102, 630-634, **2001**.
- Labadini, L., Marchelli, R., Dossena, A., Palla, G., Mori, G., Bocchi, C., Pilone, M., Butto, S., Chiral Analysis as a Quality Control Tool in Food Chemistry: From GC and HPLC to Biosensors, in *Current Status and Future Trends in Analytical Food Chemistry*, Somitag, G., Pfannhauser, W., Eds., Vol. 1, 127-130, **1995**.
- Lemière, C., Malo, J.-L., McCants, M., Lehner, S., Occupational asthma caused by roasted coffee: immunologic evidence that roasted coffee contains the same antigens as green coffee, but at lower concentration, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 98, 464-466, **1996**.
- Lercker, G., Frega, N., Bocci, F., Rodriguez-Estrada, M.T., High resolution gas chromatographic determination of diterpenic alcohols and sterols in coffee lipids, *Chromatographia*, 41, 29-33, **1995**.
- Lida, T., Matsunaga, H., Fukushima, T., Santa, T., Homma, H., Imai, K., Complete enantiomeric separation of phenylthiocarbamoylated amino acids on a tandem column of reversed and chiral stationary phases, *Anal. Chem.*, 69, 4463-4468, **1997**.
- Lida, T., Santa, T., Toriba, A., Imai, K., Amino acid sequence and D/L-configuration determination methods for D-amino acid-containing peptides in living organisms, *Biomed. Chromatogr.*, 15, 319-327, **2001**.

- Liew, C., Schut, H.A.J., Chin, S.F., Pariza, M.W., Dashwood, R.H., Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms, *Carcinogenesis*, 16, 3037-3043, **1995**.
- Lima, J.L.F.C., Delerue-Matos, C., Nouws, H.P.A., Vaz, M.C.V.F., An automatic determination of caffeine in soft drinks using flow injection system with amperometric detection. *Food Addit. Contam.*, 15, 265-269, **1998**.
- Løvaas, E., Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines, in *Advances in Pharmacology*, Sies, H., Ed.; Academic Press: London, vol. 38, 119-149, **1997**.
- Lüpke, M., Brückner, H., Gas chromatographic evaluation of amino acid epimerisation in the course of gelatin manufacturing and processing, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 206, 323-328, **1998**.
- Macrae, R. Nitrogenous Components, *Coffee Vol. I: Chemistry*, Clarke, R.; Macrae, R., Eds., Elsevier Applied Science, London, 115-152, **1987**.
- Macrae, R., Petracco, M., Illy, E., Trace metal profiles of green coffees, in *Proc. 15th ASIC Colloquium* (Montpellier), ASIC, Paris, **1993**.
- Maeztu, L., Andueza, S., Ibañez, C., Paz de Peña, M., Bello, J., Cid, C., Multivariate Methods for Characterization and Classification of Espresso Coffees from Different Botanical Varieties and Types of Roast by Foam, Taste, and Mouthfeel, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4743-4747, **2001**.
- Maier, H.G., On the Composition of Fast Roasted Coffees. In *Proc. 11th ASIC Colloquium* (Lomé), ASIC, Paris, **1985**.
- Marchelli, R., Dossena, A., Palla, G., The potential of enantioselective analysis as a quality control tool, *Trends Food Sci. & Tec.*, 7, 113-119, **1996**.
- Marchelli, R., Palla, G., Dossena, A., Galaverna, G., Corradini, R., Clementi, S., D-amino acids: molecular markers of ageing and authenticity for Parmigiano reggiano and Grana padano cheese (em italiano), *Sci. Tecn. Lattiero-Casearia*, 48, 21-32, **1997**.
- Mardia, K.V.; Kent, J.T.; Bibby, J.M. *Multivariate Analyses*, Academic Press, London, chp. 12 and 13, 333-393, **1979**.
- Marshall, C.F., World Coffee trade. In *Coffee: botany, biochemistry, and production of beans and beverage*; Clifford, M.N., Wilson, K.C., Eds.; Croom Helm, Beckenham, U.K., 251-283, **1985**.
- Martín, M.J., Pablos, F., González, A.G., Application of pattern recognition to the discrimination of roasted coffees, *Anal. Chim. Acta*, 320, 191-197, **1996**.
- Martín, M.J., Pablos, F., Bello, M.A., González, A.G., Determination of trigonelline in green and roasted coffee from single column ionic chromatography, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 357, 357-358, **1997**.
- Martín, M.J., Pablos, F., González, A.G., Characterization of arabica and robusta roasted coffee varieties and mixture resolution according to their metal content, *Food Chem.*, 66, 365-370, **1999**.
- Martín, M.J., Pablos, F., González, A.G., Valdenebro, M.S., León-Camacho, M., Fatty acids profiles as discriminant parameters for coffee varieties differentiation, *Talanta*, 54, 291-297, **2001**.

- Martin, R., Lilley, T.H., Falshaw, C.P., Haslam, E., Begley, M.J., Magnolato, D., The caffeine-potassium chlorogenate molecular complex, *Phytochem.y*, 26, 273-279, **1987**.
- Martin-Tanguy, J., Cabanne, F., Perdrizet, E., Martin, C., The distribution of hydroxycinnamic acid amides in flowering plants, *Phytochem.*, 17, 1927-1928, **1978**.
- Martin-Tanguy, J., The occurrence and possible function of hydroxycinnamoyl acid amines in plants, *Plant Growth Regul.*, 3, 381-399, **1985**.
- Martin-Tanguy, J., Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical molecular and physiological approaches, *Physiologia Plantarum*, 100, 675-688, **1997**.
- Martyn, C., Gale, C., Tobacco, coffee, and Parkinson's disease, *BMJ*, 326, 561-562, **2003**.
- Mayer, F., Grosch, W., Aroma simulation on the basis of the odourant composition of roasted coffee headspace, *Flavour Fragr. J.*, 16, 180-190, **2001**.
- Mazzafera, P., Crozier, A., Magalhães, A.C., Caffeine metabolism in *Coffea arabica* and other species of coffee, *Phytochem.*, 30, 3813-3916, **1991a**.
- Mazzafera, P., Trigonelline in coffee, *Phytochem.*, 30, 2309-2310, **1991b**.
- Mazzafera, P., Wingsle, G., Olsson, O., Sandberg, G., S-adenosyl-L-methionine: theobromine 1-N-methyltransferase, an enzyme catalyzing the synthesis of caffeine in coffee, *Phytochem.*, 37, 1577-1584, **1994**.
- Miller, A. J., Thermally induced mutagens in protein foods, in *Protein quality and the affect of processing*, Phillips, R.D., Finley, J. W., Eds.; Marcel Dekker, Inc., New York, 145-188, **1989**.
- Mitchell, J.B.O., Smith, J., D-amino acid residues in peptide and proteins, *Proteins: Struct., Funct. Gen.*, 50, 563-571, **2003**.
- Mollins-Legua, C., Campíns-Falcó, P., Sevillano-Cabeza, A., Pedrón-Pons, M. Urine polyamines determination using dansyl chloride derivatization in solid-phase extraction cartridges and HPLC, *The Analyst*, 124, 477-482, **1999**.
- Mondello, L., Casilli, A., Tranchida, P.Q., Dugo, P., Costa, R., Festa, S., Dugo, G., Comprehensive multidimensional GC for the characterization of roasted coffee beans, *J Sep. Sci.*, 27, 442-450, **2004**.
- Monti, S.M., Ritieni, A., Sacchi, R., Skog, K., Borgen, E., Fogliano, V., Characterization of phenolic compounds in virgin olive oil and their effect on the formation of carcinogenic/mutagenic heterocyclic amines in a model system, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3969-3975, **2001**.
- Moree-Testa, P., Saint-Jalm, Y., Testa, A., Identification and determination of imidazole derivatives in cigarette smoke, *J. Chromatogr.*, 290, 263-274, **1984**.
- Moret, S., Conte, L., High Performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods. An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics, *J. Chromatogr. A*, 729, 363-369, **1996**.
- Muhtadi, F.J., El-Hawary, S.S., Hifnawy, M.S., Comparative HPLC and GLC determination of caffeine in different food products, *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.*, 13, 1013-1028, **1990**.

- Müller, L., Langseth, W., Sivertsen, T., Ammoniated forage poisoning: isolation and characterization of alkyl-substituted imidazoles in ammoniated forage and in milk, *J. Agric. Food Chem.* 46, 3172-3177, **1998**
- Murata, M., Okada, H., Homma, S., Hydroxycinnamic Acid Derivatives and *p*-Coumaroyl-(L)-tryptophan, A Novel Hydroxycinnamic Acid Derivative, from Coffee Beans, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1887-1890, **1995**.
- Murkovic, M., Friedrich, M., Pfannhauser, W., Heterocyclic aromatic amine in fried poultry meat, *Z. Lebesm. Unters. Forsch. A*, 205, 347-350, **1997**.
- Murray, S., Gooderham, N.J., Boobis, A.R., Davies, D.S., Measurement of MeIQx and DiMeIQx in fried beef by capillary column gas chromatography electron capture negative ion chemical ionisation mass spectrometry, *Carcinogenesis*, 9, 321-325, **1988**.
- Murray, S., Lynch, A.M., Knize, M.G., Gooderham, N.J., Quantification of the carcinogens 2-amino-3,8-dimethyl- and 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in food using a combined assay based on gas chromatography-negative ion mass spectrometry, *J. Chromatogr.*, 616, 211-219, **1993**.
- Murray, S., Lake, B.G., Gray, S., Edwards, A.J., Springall, C., Bowey, E.A., Williamson, G., Boobis, A.R., Gooderham, N.J., Effect of cruciferous vegetable consumption on heterocyclic aromatic amine metabolism in man, *Carcinogenesis*, 22, 1413-1420, **2001**.
- Nagao, M., Fujita, Y., Wakabayashi, K., Nukaya, H., Kosuge, T., Sugimura, T., Mutagens in coffee and other beverages, *Environm. Heath Perspec.*, 67, 89-91, **1986**.
- Nagaraju, V.D., Ramalaxmi, K., Quick roasting of coffee beans, an overture to the fluid bed technique, in *Proc. 17th ASIC Colloquium* (Nairobi), ASIC, Paris, **1997**.
- Nagata, Y., Yamamoto, K., Shimojo, T., Determination of D- and L- amino acids in mouse kidney by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 575, 147-152, **1992**.
- Nagata, Y., Borghi, M., Fisher, G.H., D'Aniello, A., Free D-Serine concentration in normal and Alzheimer human brain, *Brain Res. Bull.*, 38, 181-183, **1995**.
- Nardini, R., Ghiselli, A., Determination of free and bound phenolic acids in beer, *Food Chem.*, 84, 137-143, **2004**.
- Nawrot, P., Jordan, S., Eastwood, J., Rotstein, J., Hugenholtz, A., Feeley, M., Effects of caffeine on human health, *Food Additiv. Contam.*, 20, 1-30, **2003**.
- Nebesny, E., Budryn, G., Effect of the roasting method on the content of 5-hydroxytryptamides of carboxylic acids in roasted coffee beans, *Nahrung*, 46, 279-282, **2002**.
- Nehlig, A., Daval, J.-L., Debry, G., Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action biochemical, metabolic and psychostimulant effects, *Brain Res. Rev.*, 17, 139-170, **1992**.
- Nehlig, A., Debry, G., Potential genotoxic, mutagenic and antimutagenic effects of coffee, a review, *Mut. Res.*, 317, 145-162, **1994**.
- Nehlig, A., Debry, G., Potential teratogenic and neurodevelopment consequences of coffee and caffeine exposures: a review on human and animal data, *Neurotox. Terato.* 16, 531-543, **1994a**.

- Nehlig, A., Debry, G., Coffee and cancer: a review of human and animal data, *World Rev. Nutr. Diet*, Simopoulos, A.P., Ed., Basel, Karger, 79, 185-221, **1996**.
- Nehring, U. P., Maier, H. G., Indirect determination of the degree of roast in coffee, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 195, 39-42, **1992**.
- Nielsen, P., Friis, C., Kraul, I., Disposition of 4-methylimidazole in goats and heifers, *Res. Vet. Sci.*, 54, 72-79, **1993**.
- Nunes, M.F., Coimbra, M.A., Duarte, A.C., Delgadillo, I., Foamability, Foam Stability, and Chemical Composition of Espresso Coffee as Affected by the Degree of Roast, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3238-3243, **1997**.
- Oda, Y., Aryal, P., Terashita, T., Gillam, E.M.J., Guengerich, F.P., Shimada, T., Metabolic activation of heterocyclic amines and other procarcinogens in *Salmonella typhimurium umu* tester strains expressing human cytochrome P4501A1, 1A2, 1B1, 2C9, 2D6, 2E1, and 3A4 and human NADPH-P450 reductase and bacterial O-acetyltransferase, *Mut. Res.*, 492, 81-90, **2001**.
- Oliveira, B., Casal, S., Ferreira, M., Avaliação simultânea de 5-HMF, Furfural, ácido 5-O-cafeoilquinico e Cafeína em cafés torrefactos, *XII Encontro Luso-Galego de Química*, Porto, **1998**.
- Oh, C., Kim, J., Kim, K., Mabry, T., Rapid gas chromatographic screening of edible seeds, nuts and beans for non-protein and protein amino acids, *J. Chromatogr. A*, 708, 131-141, **1995**.
- Ohgaki, H., Takayama, S., Sugimura, T., Carcinogenicities of heterocyclic amines in cooked food, *Mut. Res.*, 259, 399-410, **1991**.
- Ôi, S., Ochiai, Y., Miyano, S., Separation of enantiomeric amino acid derivatives on axially chiral 1,1'-binaphthyl-2,2'-bis(*N*-decylcarboxamide) as a stationary phase for capillary gas chromatography, *Chem. Lett.*, 1575-1576, **1991**.
- Okuma, E., Abe, H., Simultaneous determination of D- and L-amino acids in the nervous tissues of crustaceans using precolumn derivatization with (+)-1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate and reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B*, 660, 243-250, **1994**.
- Ong, C.P., Ng, C.L., Lee, H.K., Li, S.F.Y., Separation of imidazole and its derivatives by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 686, 319-324, **1994**.
- Ortolá, M.D., Londonõ, L., Gutiérrez, C.L., Chiralt, A., Influence of roasting temperature on physicochemical properties of different coffees, *Food Sci. Technol. Int.*, 4, 59-66, **1998**.
- Pais, P., Moyano, E., Puignou, L., Galceran, M. T., Liquid chromatographic-electrospray mass spectrometry with in-source fragmentation for the identification and quantification of fourteen amines in beef extracts, *J. Chromatogr. A*, 775, 125-136, **1997a**.
- Pais, P., Moyano, E., Puignou, L., Galceran, M.T., Liquid chromatographic-atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry as a routine method for the analysis of mutagenic amines in beef extracts., *J Chromatogr. A*, 778, 207-218, **1997b**.

- Pais, P., Knize, M. G., Photodiode-array HPLC peak matching for complex thermally processed samples, *LC-GC*, 16, 378-384, **1998**.
- Pais, P., Salmon, C. P., Knize, M. G., Felton, J. S., Formation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in dry-heated model systems, meats, and meat drippings, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1098-1108, **1999**.
- Pais, P., Knize, M.G., Chromatographic and related techniques for the determination of aromatic heterocyclic amines in foods, *J. Chromatogr. B*, 747, 139-169, **2000**.
- Palla, G., Dossena A., Marchelli R., Oligo-oxaalkanoyl tetraamides derived from L-phenylalanine as stationary phases in capillary gas chromatographic resolution of D,L-amino acids *J. Chromatogr.*, 349, 9-15, **1985**.
- Palla, G., Marchelli, R., Dossena, A., Casnati, G., Occurrence of D-amino acids in foods - detection by capillary gas chromatography and by reversed-phase high-performance liquid chromatography with L-phenylalaninamides as chiral selectors, *J. Chromatogr. A*, 475, 45-53, **1989**.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Brand, D., Mohan, R., Roussos, S., Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husks for bioprocesses, *Biochem. Eng. J.*, 6, 153-162, **2000a**.
- Pandey, S., Ranade, S.A., Nagar, P.K., Kumar, N., Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence, *J. Biosci.*, 25, 291-299, **2000b**.
- Pardo M., Sberveglieri G., Coffee analysis with an Electronic Nose, *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, 51, **2002**.
- Paulis, T., Schmidt, D.E., Bruchey, A.K., Hirby, M.T., McDonald, M.P., Commers, P., Lovinger, D.M., Martin, P.R., Dicinnamoylquinidines in roasted coffee inhibit the human adenosine transporter, *Europ. J. Pharmacol.*, 442, 215-223, **2002**.
- Pereira, A., Jr.; Pereira, M. M., Amino acids present in coffees, in *Proc. 5th ASIC Colloquium* (Lisbon), ASIC, Paris, 85-90, **1973**.
- Perfetti, G. A., Determination of heterocyclic aromatic amines in process flavors by a modified liquid chromatographic method, *J. AOAC Int.*, 79, 813-816, **1996**.
- Persson, E., Graziani, G., Ferracane, R., Fogliano, V., Skog, K., Influence of antioxidants in virgin olive oil on the formation of heterocyclic amines in fried beefburgers, *Food Chem. Toxic.*, 41, 1587-1597, **2003**.
- Pettigrew, J., *Coffee*; PRC Publishing Ltd., London, **1999**.
- Pfau, W., Skog, K., Exposure to β -carbolines norharman and harman, *J. Chromatogr. B*, 802, 115-126, **2004**.
- Pfeiffer, J., Schurig, V., Enantiomer separation of amino acid derivatives on a new polymeric chiral resorc[4]arene stationary phase by capillary gas chromatography, *J. Chromatogr. A*, 840, 145-150, **1999**.
- Pike, N.B., Wise, A., Identification of a nicotinic acid receptor: is this the molecular target for the oldest lipid-lowering drug?, *Curr. Opin. Investig. Drugs.*, 5, 271-275, **2004**.

- Pictet, G., Rehacek, J., Controles analytiques du degre de torrefaction, in *Proc. 10th ASIC Colloquium* (Salvador), ASIC, Paris, 219-234, **1982**.
- Pires, A.J.V., Garcia, R., Souza, A.L., Silva, F.F., Veloso, C.M., Cardoso, G.C., Oliveira, T.N., Silva, P.A., Avaliação do consumo de silagens de sorgo tratadas com amônia anidra e/ou, sulfureto de sódio na alimentação de novilhas Indubrazil/Holandês, *R. Bras. Zootec.*, 32, 1525-1531, **2003**.
- Porta, M., Vioque, J., Ayude, D., Alguacil, J., Jarrod, M., Ruiz, M., Murillo, J.A., Coffee drinking: the rationale for treating it as a potential effect modifier of carcinogenic exposures, *Eur. J. Epidem.*, 18, 289-298, **2003**.
- Prodolliet, J., Authenticity of coffee, in *Food Authentication*, Ashurst, P. R., Dennis, M. J., eds.; Blackie Academic and Professional/Chapman and Hall, London, U.K., 304-338, **1996**.
- Prodolliet, J., Baumgartner, M., Martin, Y.-L., Remaud, G., Determination of the geographical origin of green coffees by stable isotope techniques, in *Proc. 17th ASIC Colloquium* (Nairobi), ASIC, Paris, **1997**.
- Prodolliet, J., Zbinden, P., Andrey, D., Baumgartner, M., Determination of the geographical origin of green coffee by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), in *Proc. 19th ASIC Colloquium* (Trieste), ASIC, Paris, **2001**.
- Reistad, R., Rossland, O.J., Latva-Kala, K.J., Rasmussen, T., Vikse, R., Becher, G., Alexander, J., Heterocyclic aromatic amines in human urine following a fried meat meal, *Food Chem. Toxic.*, 35, 945-955, **1997**.
- Remler, P., Pfanhauser, W., Discrimination of arabica and robusta in ground coffee by molecular biological techniques, *5th European Symposium on Food Authenticity*, La Baule, France, **1999**.
- Richling, E., Kleinschnitz, M., Schreier, P., Analysis of heterocyclic aromatic amines by high resolution gas chromatographic-mass spectrometry: a suitable technique for the routine control of food and process flavours, *Eur. Food Res. Technol.*, 210, 68, **1999**.
- Roffi, J., Santos, A. C., Mexia, J. T., Busson, F., Maigrot, M., Green and roasted Angola coffees. Chemical studies, in *Proc. 5th ASIC Colloquium* (Lisbon), ASIC, Paris, 179–200, **1973**.
- Rohrmann, S., Linseisen, J., Becker, N., Norat, T., Sinha, R., Skeie, G., Lund, E., Martínez, C., Barricarte, A., Mattisson, I., Berglund, G., Welch, G., Davey, G., Overvad, K., Tjønneland, A., Clavel-Chapelon, F., Kesse, E., Lotze, G., Klipstein-Grobusch, Vasipopoulou, E., Polychronopoulos, E., Pala, V., Celentano, E., Bueno-de-Mesquita, H.B., Peeters, P.H.M., Riboli, E., Slimani, N., Cooking of meat and fish in Europe – results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC), *Eur. J. Clin. Nut.*, 56, 1216-1230, **2002**.
- Roos, B., Weg, G., Urgert, R., Bovenkamp, P., Charrier, A., Katan, M.B., Levels of cafestol, kahweol, and related diterpenoids in wild species of the coffee plant *Coffea*, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3065-3069, **1997**.
- Royle, L., Ames, J.M., Castle, L., Nursten, H.E., Radcliffe, C.M., Identification and quantification of class IV caramels using capillary electrophoresis and its application to soft drinks, *J. Sci. Food Agric.*, 76, 579-587, **1998**.

- Ruiz-Durántez, E., Ruiz-Ortega, J.A., Pineda, J., Ugedo, L., Stimulatory effect of harmane and other β -carbolines on locus coeruleus neurons in anaesthetized rats, *Neurosc. Lett.*, 308, 197-200, **2001**.
- Sakai, K., Homma, H., Lee, J.-A., Fukushima, T., Santa, T., Tashiro, K., Iwatsubo, T., Imai, K., Localization of D-aspartic acid in elongate spermatids in rat testis, *Archiv. Bioch. Bioph.*, 351, 96-105, **1998**.
- Salazar, M.T., Smith, T.K.; Harris, A., High-Performance liquid Chromatographic Method for determination of Biogenic Amines in feedstuffs, Complete Feeds, and Animal Tissues, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1708-1712, **2000**.
- Samozá, V., Lindenmeier, M., Wenzel, E., Frank, O., Erbersdobler, H.F., Hofman, T., Activity-guided identification of a chemopreventive compound in coffee beverage using in vitro and in vivo techniques, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 6861-6869, **2003**.
- Santos, M.H.S., Biogenic amines: their importance in foods, *Int. J. Food Microb.* 29, 213-231, **1996**.
- Sanyal, R., Darroudi, F., Perzefall, W., Nagao, M., Knasmüller, S., Inhibition of the genotoxic effects of heterocyclic amines in human derived hepatoma cells by dietary bioantimutagens, *Mutagenesis*, 12, 297-303, **1997**.
- Sanz, C., Maeztu, L., Zapelena, M.J., Bello, J., Cid, C., Profiles of volatile compounds and sensorial analysis of three blends of coffee: influence of different proportions of Arabica and Robusta and influence of roasting coffee with sugar, *J. Sci. Food and Agric.*, 82, 840-847, **2002**.
- Schieber, A., Brückner, H., Rupp-Classen, M., Specht, W., Nowitzki-Grimm, S., Classen, H.-G., Evaluation of D-amino acid levels in rat by gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry: no evidence for subacute toxicity of orally fed D-proline and D-aspartic, *J. Chromatogr. B*, 691, 1-12, **1997**.
- Scholz-Böttcher, B.M., Maier, H.G., Isomers of quinic acid and quinidines in roasted coffee: indicators for the degree of roast? in *Proc. 14th ASIC Colloquium* (San Francisco); ASIC, Paris, **1991**.
- Schut, H. A. J., Snyderwine, E. G., DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implications for mutagenesis and carcinogenesis, *Carcinogenesis*, 20, 353-368, **1999**.
- Seiler, N., Polyamine metabolism, *Digestion*, 46, 319-330, **1990**.
- Sela, M., Zisman, E., Different roles of D-amino acids in immune phenomena, *FASEB J.*, 11, 449-456, **1997**.
- Semmelroch, P., Grosch, W., Studies on Character Impact Odorants of Coffee Brews, *J. Agric. Food Chem.*, 44; 537- 543, **1996**.
- Sen, N., Seaman, S., Weber, D., Mass Spectrometric Confirmation of the Presence of N-Nitrosopyrrolidine in Instant Coffee, *J. AOAC*, 73, 325-327, **1990**.
- Shibamoto, T., Bjeldanes, L. F., Toxicants formed during food processing, in *Introduction to Food Toxicology*, Academic Press, Inc., San Diego, USA, 183-199, **1993**.
- Shibata, K., Mushiage, M., Kondo, T., Hayakawa, T., Tsuge, H., Effects of vitamin B₆ deficiency on the conversion ratio of typtophan to niacin, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 2060-2063, **1995**.

- Shibata, K., Shimada, H., Kondo, T., Effects of feeding tryptophan-limiting diets on the conversion ratio to niacin in rats, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 1660-1666, **1996**.
- Shimizu, M., Mazzafera, P., A role for trigonelline during imbibition and germination of coffee seeds, *Plant Biol.*, 2, 605 - 611, **2000**.
- Sinha R., Knize M.G., Salmon C.P., Brown E.D., Rhodes D., Felton J.S., Levander O.A., Rothman N., Heterocyclic amine content of pork products cooked by different methods and to varying degrees of doneness, *Food Chem. Toxic.*, 36 289-297, **1998**.
- Sinha, R., Rothman, N., Role of well-done, grilled red meat, heterocyclic amines (HCAs) in the etiology of human cancer, *Cancer Lett.*, 143, 189-194, **1999**.
- Sinha, R., Gustafson, D.R., Kulldorff, M., Wen, W.-Q., Cerhan, J.R., Zheng, W., 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, a carcinogen in high-temperature-cooked meat, and breast cancer risk, *J. Nat. Cancer Inst.*, 92, 1352-1354, **2000a**.
- Sinha, R., Kulldorff, M., Swanson, C.A., Curtin, J., Brownson, R.C., Alavanja, M.C.R., Dietary heterocyclic amines and the risk of lung cancer among Missouri women, *Cancer Res.*, 60, 3753-3756, **2000b**.
- Sinha, R., Kulldorff, M., Wong-Wo, C., Denobile, J., Rothman, N., Dietary intake of heterocyclic amines, meat derived mutagenic activity, and risk of colorectal adenomas, *Canc. Epidem., Biom. Prev.*, 10, 559-562, **2001**.
- Sivertsen, T., Langseth, W., Mo, E., Ingebrigtsen, K., Further arguments against 4-methylimidazole as causal factor in ammoniated forage toxicosis: experimental seed-hay poisoning in young lambs, *Acta Vet. Scand.*, 34, 227-230, **1993**.
- Skog, K., Steineck, G., Augustsson, K., Jägerstad, M., Effect of cooking temperature on the formation of heterocyclic amines in fried meat products and pan residues, *Carcinogenesis*, 16, 861-867, **1995**.
- Skog, K., Augustsson, K., Steineck, G., Stenberg, M., Jägerstad, M., Polar and non-polar heterocyclic amines in fish and meat products and their corresponding pan residues, *Food Chem. Toxic.*, 35, 555-565, **1997**.
- Skog K., Solyakov A., Arvidsson P., Jägerstad M., Analysis of nonpolar heterocyclic amines in cooked foods and meat extracts using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 803, 227-233, **1998**.
- Skog K.I., Johansson, M.A.E., Jägerstad, M.I., Carcinogenic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake, *Food Chem. Toxic.*, 36, 879-896, **1998a**.
- Skog, K., Problems associated with the determination of heterocyclic amines in cooked foods and human exposure, *Food Chem. Toxicol.*, 40, 1197-1203, **2002a**.
- Skog, K., Solyakov, A., Heterocyclic amines in poultry products: a literature review, *Food Chem. Toxic.*, 40, 1213-1221, **2002b**.
- Slow, S., Lever, M., Lee, M.B., George, P.M., Chambers, S.T., Betaine analogues alter homocysteine metabolism in rats, *The Int. J. Biochem. & Cell Biol.*, 36, 870, 880, **2004**.

- Smith, A.W., Introduction, in *Coffee, Vol. 1 – Chemistry*, Clarke, R.J., Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science, London, 1-41, **1985**.
- Smith, C., Payne, V., Doolittle, D.J., Debnath, A.K., Lawlor, T., Hansch, C., Mutagenic activity of synthetic and naturally occurring heterocyclic amines in *Salmonella*, *Mut. Res.*, 279, 61-73, **1992**.
- Smith, A.W., Introduction, in *Coffee, Vol. 1 – Chemistry*, Clarke, R.J., Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science, London, 1-41, **1985**.
- Smith, T.A., Recent advances in the biochemistry of plant amines, *Phytochem.*, 14, 865-890, **1975**.
- Smith, T.A., Amines in food, *Food Chem.*, 6, 169-200, **1980**.
- Smith, T.A., Polyamines, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 36, 117-143, **1985**.
- Smith, T.K., Mogridge, J.-A.L., Sousadias, M.G., Growth-promoting potential and toxicity of spermidine, a polyamine and biogenic amine found in foods and feedstuffs, *J. Agric Food Chem.*, 44, 518-521, **1996**.
- Snyderwine, E. G., Sinha, R., Felton, J.S., Ferguson, L.R., Highlights of the eighth international conference on carcinogenic/mutagenic *N*-substituted aryl compounds, *Mut. Res.*, 506-507, 1-8, **2002**.
- Solyakov, A., Skog, K., Jägerstad, M., Heterocyclic amines in process flavours, process flavour ingredients, bouillon concentrates and a pan residue, *Food Chem. Toxic.*, 37, 1-11, **1999**.
- Solyakov, A., Skog, K., Screening for heterocyclic amines in chicken cooked in various ways, *Food Chem. Toxic.*, 40, 1205-1211, **2002**.
- Somoza, V., Lindenmeier, M., Wenzel, E., Frank, O., Erbersdobler, H.F., Hofman, T., Activity-guided identification of a chemopreventive compound in coffee beverage using in vitro and in vivo techniques, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 6861-6869, **2003**.
- Speer, K., Tewis, R., Montag, A., 16-O-methylcafestol. A quality indicator for coffee, in *Proc. 14th ASIC Colloquium* (San Francisco), ASIC, Paris, 237-244, **1991**.
- Speer, K., Kurzrock, T., Hruschka, A., Diterpene Degradation Products in Roasted Coffees, *Proc. 18th ASIC Colloquium* (Helsinki), ASIC, Paris, **1999**.
- Speer, K., Kölling-Speer, I., Lipids, in *Coffee: Recent Developments*, Clarke, R. J., Vitzthum, O. G., eds.; Blackwell Scientific, Oxford, U.K., 36-41, **2001**.
- Stadler, R.H., Turesky, R.J., Mueller, O., Markovic, J., Leong-Morgenthaler, P.M., The inhibitory effects of coffee on radical-mediated oxidation and mutagenicity, *Mutat. Res.*, 308, 177-190, **1994**.
- Stadler, R.H., Varga, N., Milo, C., Schilter, B., Vera, F.A., Welti, D.H., Alkylpyridiniums. 2. Isolation and quantification in roasted and ground coffee, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 1200-1206, **2002**.
- Stavric, B., Methylxanthines: toxicity to humans. 2. caffeine, *Food Chem. Toxic.*, 26, 645-662, **1988a**.
- Stavric, B., Klassen, R., Watkinson, B., Karpinski, K., Stapley, R., Fried, P., Variability in caffeine consumption from coffee and tea: possible significance for epidemiological studies, *Food Chem. Toxic.*, 26, 111-118, **1988b**.

- Stavric, B., Gilbert, S.G., Caffeine metabolism: a problem in extrapolating results from animal studies to humans, *Acta Pharm. Jugosl.*, 40, 475-490, **1990**.
- Stavric, B., An update on research with coffee / caffeine (1989/1990), *Food Chem. Toxic.*, 30, 533-555, **1992**.
- Steineck, G., Gerhardsson De Verdier, M., Overvik, E., The epidemiological evidence concerning intake of mutagenic activity from the fried surface and risk of cancer cannot justify preventive measures, *Eur. J. Cancer Prev.*, 2, 293-300, **1993**.
- Steinhart, C. E., Doyle M. E., Cochrane, B. A., Mutagens and carcinogens in heated and processed foods, in *Food Safety 1996*, Food Research Institute, Marcel Dekker, Inc., New York, 320-324, **1996**.
- Stenberg, M., Marko-Varga, G., Öste, R., Racemisation of amino acids during classical and microwave oven hydrolysis – Application to aspartame and Maillard reaction system, *Food Chem.*, 74, 217–224, **2001**.
- Stennert, A., Maier, H. G., Trigonelline in coffee: I Comparison of thin-layer with high-performance chromatography. Simultaneous determination of caffeine, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 196, 430-434, **1993**.
- Stennert, A., Maier, H. G., Trigonelline in coffee: II Content of green, roasted and instant coffee, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 199, 198-200, **1994**.
- Stennert, A., Maier, H. G., Trigonelline in coffee: III Calculation of the degree of roast by the trigonelline/nicotinic acid ratio. New gas-chromatographic method for nicotinic acid, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 202, 45-47, **1996**.
- Sugimura, T., Past, present, and future of mutagens in cooked foods, *Environm. Health Persp.*, 67, 5-10, **1986**.
- Sugimura, T., Wakanayashi, K., Mutagens and carcinogens in food, in *Mutagens and carcinogens in the diet*, Pariza, M.W., Aeschbacher, H.U., Felton, J.S., Sato, S., Eds., Wiley-Liss, Inc., New York, USA, 1-18, **1990**.
- Susuki, T., Watanabe, T., Toyo'oka, T., Discrimination of D/L-amino acid in peptide sequence based on fluorescent chiral derivatization by reversed-phase liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta*, 352, 357-363, **1997**.
- Taguchi, H., Sakaguchi, M., Shimabayashi, Y., Trigonelline Content in Coffee Beans and the Thermal Conversion of Trigonelline into Nicotinic Acid during the Roasting of Coffee Beans, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 3467-3471, **1985**.
- Taguchi, V.Y., Derivatization techniques, in *Gas chromatography: Biochemical, Biomedical and Clinical Applications*, Clement, R.E., Ed., John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England, chapt. 7, **1990**.
- Tamine, A.Y., Robinson, R.K., in *Yoghurt: science and technology*, Pergamon Press Ltd, England, 315, **1985**.
- Tan, E.-K., Tan, C., Fook-Chong, S.M.C., Lum, S.Y., Chai, A., Chung, H., Shen, H., Zhao, Y., Teoh, M.L., Yih, Y., Pavanni, R., Chandran, V.R., Wong, M.C, Dose-dependent protective effect of

- coffee, tea, and smoking in Parkinson's disease: a study in ethnic Chinese, *J. Neurol. Sci.*, 216, 163-167, **2003**.
- Tavan, E., Cayeula, C., Antoine, J.-M., Trugnan, G., Chaugier, C., Cassand, P., Effects of dairy products on heterocyclic aromatic amine-induced rat colon carcinogenesis, *Carcinogenesis*, 23, 477-483, **2002**.
- The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, O'Neil, M.J., Smith, A., Heckelman, P. E., Obenchain, Jr. J.R., eds, 13th edn, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA, **2001**.
- Thomsen, M., Willumsen, D., Quantitative ion-pair extraction of 4(5)-methylimidazole from caramel colour and its determination by reversed-phase ion-pair liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 211, 213-221, **1981**.
- Thorn, J., *O Guia do Café*; Centralivros Lda., Portugal, **1998**.
- Tiburcio, A.F., Kaur-Sawiiney, R., Ingersoli, R.B., Galston, A.W., Correlation between polyamines and pyrrolidine alkaloids in developing tobacco callus, *Plant Physiol.*, 78, 323-326, **1985**.
- Tiburcio, A.F., Campos, J.L., Figueras, X., Besford, R.T., Recent advances in the understanding of polyamine functions during plant development, *Plant Growth Reg.*, 12, 331-340, **1993**.
- Tikkanen, L.M., Sauri, T.M., Latva-Kala, K.J., Screening of heat-processed Finnish foods for the mutagens 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline, 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, *Food Chem. Toxic.*, 31, 717-721, **1993**.
- Tomasik, P., Caramel: properties and analysis, in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2nd ed., 852-862, **2003**.
- Toribio, F., Puignou, L., Galceran, M.T., Evaluation of different clean-up procedures for the analysis of heterocyclic aromatic amines in a lyophilized meat extract, *J. Chromatogr. A*, 836, 223-233, **1999**.
- Toribio, F., Moyano, E., Puignou, L., Galceran, M.T., Ion-trap tandem mass spectrometry for the determination of heterocyclic amines in food, *J. Chromatogr. A*, 948, 267-281, **2002**.
- Totsuka, Y., Ushiyama, H., Ishihara, J., Sinha, R., Goto, S., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Quantification of the co-mutagenic β -carbolines, norharman and harman in cigarette smoke condensates and cooked food, *Cancer Lett.*, 143, 139-143, **1999**.
- Tramontano, W.A., Jouve, D., Trigonelline accumulation in salt-stressed legumes and the role of other osmoregulators as cell cycle control agents, *Phytochem.*, 44, 1037-1040, **1997**.
- Trouche, M.D., Derbesy, M., Estienne, J., Contribution à l'identification de mélanges d'espèces *Arabica* et *Robusta* par étude du 16-O-méthylcafestol, *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 90, 121-132, **1997**.
- Trugo, L. C., Macrae, R., The determination of carbohydrates in coffee products using HPLC. in *Proc. 10th Coll ASIC*, ASIC, Paris, 187-192, **1982**.
- Trugo, L.C., Macrae, R., Dick, J., Determination of purine alkaloids and trigonelline in instant coffee and other beverages using high performance liquid chromatography, *J. Sci. Food Agric.*, 34, 300-306, **1983**.

- Trugo, L.C., Macrae R., A Study of the Effect of Roasting on the Chlorogenic Acid Composition of Coffee Using HPLC, *Food Chem.*, 15, 219-227, **1984**.
- Trugo, L.C., Macrae, R., Trugo, N.M.F., Determination of nicotinic acid in instant coffee using high performance liquid chromatography, *J. Micronutr. Anal.*, 1, 55-63, **1985**.
- Trugo, L.C., Macrae, R., Application of high performance liquid chromatography to the analysis of some non-volatile coffee components, *Arch. Latinoam. Nut.*, 39, 96-107, **1989**.
- Trugo, L.C., De Maria C.A.B., Werneck, C.C., Simultaneous Determination of Total Chlorogenic Acid and Caffeine in Coffee by High Performance Gel Filtration Chromatography, *Food Chem.*, 42, 81-87, **1991**.
- Trugo, L.C., Analysis of coffee products, in *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P., Eds.; Academic Press: London, 1498-1506, **2003**.
- Turesky, R. J., Bur, H., Huynh-Ba, T., Aeschbacher, H. U., Milon H., Analysis of mutagenic heterocyclic amines in cooked beef products by high-performance liquid chromatography in combination with mass spectrometry, *Food Chem. Toxic.*, 26, 501-509, **1988**.
- Turesky R. J., Metabolism and biodisposition of heterocyclic amines, in *Mutagens and Carcinogens in the Diet*, Wiley-Liss, Inc., 39-53, **1990**.
- Turesky, R.J., Richoz, J., Constable, A., Curtis, K.D., Dingley, K.H., Turteltaub, K.W., The effects of coffee on enzymes involved in metabolism of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in rats, *Chem.-Biol. Interact.*, 145, 251-165, **2003**.
- Urgert, R., van Vliet, T., Zock, P.L., Katan, M.B., Heavy coffee consumption and plasma homocysteine: a randomized controlled trial in healthy volunteers, *Am. J. Clin. Nutr.*, 72, 1107-1110, **2000**.
- Vainiotalo, S., Matveinen, K., Reunanen, A., GC-MS determination of the mutagenic heterocyclic amines MeIQx and DiMeIQx in cooking fumes, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 345, 462, **1993**.
- Vallé, M.; Malle, P., Optimization of a Liquid Chromatographic Method for Determination of Amines in Fish, *J. AOAC Int.*, 80, 49-56, **1997**.
- Van Duijn, J., Van Der Stengen, G.H.D., Analysis of caffeine and trigonelline using high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 179, 199-204, **1979**.
- Veciana-Nogues, M. T., Hernandez-Jover, T.O., Marine-Font, A.O., Vidal-Carou, M.C., Liquid Chromatographic Method for Determination of Biogenic Amines in Fish and Fish Products. *J. AOAC Int.*, 78 , 1045-1050, **1995**.
- Viani, R., Horman, I., Thermal behaviour of trigonelline, *J. Food Sci.*, 39, 1216-1217, **1974**.
- Viani, R., Physiological effects, in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2nd ed., 1511-1516, **2003**.
- Vincent, J.-C. Green coffee processing, in *Coffee: Vol. 2 Technology*, Clarke, R.J., Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science Publishers, London, 1-33, **1987**.
- Vollenbröker, M., Eichner, K., A new solid-phase extraction method for the quantification of heterocyclic aromatic amines, *Eur. Food Res. Technol.*, 212, 122-125, **2000**.

- Vossen, H.A.M., Agronomy I: Coffee breeding Practises, in *Coffee: recent developments*, Clarke, R.J., Vitzthum, O.G., Eds.; Blackwell Science Ltd., United Kingdom, 184-201, **2001**
- Walden, R., Cordeiro, A., Tiburcio, A.F., Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development, *Plant Physiol.*, 113, 1009-1013, **1997**.
- Waller, J.M., Control of coffee diseases. In *Coffee: botany, biochemistry, and production of beans and beverage*; Clifford, M.N., Wilson, K.C., Eds.; Croom Helm: Beckenham, U.K., **1985**, chp. 9, 219-229.
- Walters, D.R., Polyamines and plant disease, *Phytochemistry*, **2003**, 64, 97-107.
- Wang, J., Huang, Z.-H., Gage, D.A., Watson, J.T., Analysis of amino acids by gas chromatography-flame ionization detection and gas chromatography-mass spectrometry: simultaneous derivatization of functional groups by an aqueous-phase chloroformate-mediated reaction, *J. Chromatogr. A*, 663, 71-78, **1994**.
- Watson, J., Caffeine, in *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P., Eds.; Academic Press: London, 745-750, **2003**.
- Weckerle, B., Richling, E., Heinrich, S., Schreier, P., Origin assessment of green coffee (*Coffea arabica*) by multi-element stable isotope analysis of caffeine, *Anal. Bioanal. Chem.*, 374, 886-890, **2002**.
- Weisburger, J. H., Prevention of heterocyclic amine formation in relation to carcinogenesis, in *Mutagens in food: Detection and Prevention*, Hayatsu, H., Ed, CRC Press, Florida, 193-203, **1991**.
- Weisburger, J. H., Dolan, L., Pittman, B., inhibition of PhIP mutagenicity by caffeine, lycopene, daidzein, and genistein, *Mut. Res.*, 416, 125-128, **1998**.
- Weisburger J.H., Antimutagenesis and anticarcinogenesis, from the past to the future, *Mut. Res.*, 480, 23-35, **2001**.
- Weiss, M., Manneberg, M., Juranville, J.-F., Lahm, H.-W., Foutoulakis, M., Effect of the hydrolysis method on the determination of the amino acid composition of proteins, *J. Chromatogr. A*, 795, 263-275, **1998**.
- White, D.R. Jr., Coffee adulteration and a multivariate approach to quality control, in *Proc. 16th ASIC Colloquium* (Kyoto), ASIC, Paris, **1995**.
- WHO, Ammonia caramel as a food colour, in *Reports of the Scientific Committee for food (thirty sixth series)*, European Commission, 3-9, **1997**.
- WHO, Advancing knowledge on regulating tobacco products, in *Oslo monograph*, World Health organization, **2000**.
- WHO/IARC, Coffee, Tea, Mate, Methylxanthines and Methylglyoxal, in *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 1-513, WHO/IARC, **1991**.
- Wilks, R.A., Shingler, A.J., Thurman, L.S., Warner, J.S., The isolation of 4-methylimidazole from caramel color and its determination by thin-layer and gas-liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 87, 411-418, **1973**.

- Wilks, R.A., Johnson, M.W., Shingler, A.J., An improved method for the determination of 4-methylimidazole in caramel color, *J. Agric. Food Chem.*, 25, 605-608, **1977**.
- Wong, D.W.S., Aminoácidos, in *Química de los alimentos: Mecanismos y teoría*, Editorial Acribia, SA, Zaragoza, España, 299-302, **1989a**.
- Wong, D. W. S., Aminas heterocíclicas, in *Química de los alimentos: Mecanismos y teoría*, Editorial Acribia, SA, Zaragoza, España, 342-344, **1989b**.
- Worth, G.A., King, P.M., Richards, W.G., Theoretical calculation of tautomer equilibria in solution: 4-(5) methylimidazole, *Biochim. Biophys. Acta*, 993, 134-136, **1989**.
- Wu, X., Skog, K., Jägerstad, M., Trigonelline, a naturally constituent of green coffee beans behind the mutagenic activity of roasted coffee?, *Mut. Res.*, 391, 171-177, **1997**.
- Xu, M., Schut, H. A. J., Bjeldanes, L. F., Williams, D. E., Bailey, G. S., Dashwood, R. H., Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-DNA adducts by indole-3-carbinol: dose-response studies in the rat colon, *Carcinogenesis*, 18, 2149-2153, **1997**.
- Yamaguchi, T., Iki, M., Inhibitory effect of coffee extract against some mutagens, *Agric. Biol. Chem.*, 50, 2983-988, **1986**.
- Yeretzian, C., Jordan, A., Badoud, R., Lindinger, W., From the green bean to the cup of coffee: investigating coffee roasting by on-line monitoring of volatiles, *Eur. Food Res. Technol.*, 214, 92-104, **2002**.
- Yu, Z., Xu, M., Santana-Rios, G., Shen, R., Izquierdo-Pulido, M., Williams, D.E., Dashwood, R.H., A comparison of whole wheat, refined wheat and wheat bran as inhibitors of heterocyclic amines in the *Salmonella* mutagenicity assay and in the rat colonic aberrant crypt focus assay, *Food Chem. Toxic.*, 39, 655-665, **2001**.
- Yuan, J.H., Burka, L.T., Toxicokinetics of 4-methylimidazole in the male F344 rat, *Xenobiotica*, 25, 885-894, **1995**.
- Zagon, J., Dehne, L.-I., Bögl, K.-W., D-amino acids in organisms and foods, *Nut. Res.*, 14, 445-463, **1994**.
- Zhao, Y., Schelfaut, M., Sandra, P., Banks, F., Capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry for the analysis of heterocyclic amines, *Electrophoresis*, 19, 2213-2219, **1998**.
- Zheng, X.-q., Ashihara, H., Distribution, biosynthesis and function of purine and pyridine alkaloids in *Coffea arabica* seedlings, *Plant Sci.*, 166, 807-813, **2004**.
- Zimmerli, B., Rhym, P., Zoller, O., Schlatter, J., Occurrence of heterocyclic aromatic amines in the Swiss diet: analytical method, exposure estimation and risk assessment, *Food Addit. Contam.*, 18, 533-551, **2001**.
- Zimmermann, R., Heger, H.J., Yeretzian, C., Nagel, H., Boesl, U., Application of Laser ionization mass spectrometry for on-line monitoring of volatiles in the headspace of food products: roasting and brewing coffee, *Rap. Comm. Mass Spec.*, 10, 1975-1979, **1996**.
- Zwart, F.J., Slow, S., Payne, R.J., Lever, M., George, P.M., Gerrard, J.A., Chambers, S.T., Glycine betaine and glycine analogues in common foods, *Food Chem.*, 83, 197-204, **2003**.