

ANA CAROLINA CALÇADO LOPES MARTINS

**DETERMINAÇÃO DE PRECURSORES DA
SEROTONINA – TRIPTOFANO E
5-HIDROXITRIPTOFANO – EM CAFÉ POR
CLAE-PAR IÔNICO**

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2008**

ANA CAROLINA CALÇADO LOPES MARTINS

**DETERMINAÇÃO DE PRECURSORES DA
SEROTONINA – TRIPTOFANO E
5-HIDROXITRIPTOFANO – EM CAFÉ POR
CLAE-PAR IÔNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.

Orientador: Profa. Maria Beatriz Abreu Glória

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2008**

FOLHA DE APROVAÇÃO COM AS ASSINATURAS

"De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro."

(Fernando Sabino)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por esta vitória.

A minha família: meus pais, Leonel José Martins e Maria José Calçado Lopes Martins, pelo amor incondicional. Aos meus irmãos, Laércio Lopes Martins e Bárbara Calçado Lopes Martins pelo apoio e amizade.

À Professora D^{ra} Maria Beatriz Abreu Glória pela orientação e pelo exemplo de competência e amor pelo trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Professora D^{ra} Marialice Pinto Silvestre, Professora D^{ra} Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira, e Professora D^{ra} Sílvia Mendonça Vieira pelas valiosas contribuições ao trabalho final.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos pela contribuição em minha formação científica.

Ao funcionário Marcos pela ajuda.

Às funcionárias da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos pela colaboração.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Warley, Renata, Tarliane, Juliana, Vivian, Tânia, Priscila, Adriana, Cecília, Bruno, Sílvia, Fernanda, pelos bons momentos, amizade e ajuda.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Carlos, por ser meu equilíbrio. Obrigada pelo apoio, amizade e amor que você demonstra sempre. Espero estar ao seu lado todos os dias para alegrar-me com seu sorriso...

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 DADOS RELEVANTES DO CAFÉ	15
2.1.1 Características sócio-econômicas.....	15
2.1.2 Botânica e estrutura do grão	16
2.1.3 Classificação.....	18
2.2 PROCESSAMENTO DO CAFÉ	20
2.3 PREPARO DA BEBIDA CAFÉ	23
2.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAFÉ	25
2.5 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO CAFÉ	27
2.6 SEROTONINA E OS PRECURSORES, TRIPTOFANO E 5- HIDROXITRIPTOFANO	30
2.6.1 Serotonina.....	30
2.6.2 Triptofano	32
2.6.3 5-Hidroxitriptofano.....	34
2.6.4 Métodos de determinação de triptofano.....	35
2.6.5 Métodos de determinação de 5-HTP	38
2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 MATERIAL	43
3.1.1 Amostras	43
3.1.2 Reagentes e solventes	43
3.2 MÉTODOS	43
3.2.1 Desenvolvimento e validação de metodologia por CLAE-par iônico para determinação simultânea de triptofano e 5-HTP	43
3.2.1.1 <i>Definição das condições de trabalho para a separação de triptofano e 5-HTP por CLAE</i>	44
3.2.1.2 <i>Comparação de métodos de extração simultânea de triptofano não- protéico e 5-HTP</i>	44
3.2.1.3 <i>Otimização do método de extração</i>	45
3.2.1.4 <i>Procedimentos de validação</i>	45
3.2.2 Estudo comparativo dos teores de triptofano protéico e não-protéico e de 5-HTP em grãos de café arábica e robusta crus.....	47
3.2.3 Estudo do efeito de níveis de torração nos teores de triptofano protéico e não-protéico e 5-HTP em grãos de café.....	48
3.2.4 Estudo comparativo dos teores de triptofano protéico e não-protéico e 5-hidroxitriptofano na bebida de cafés arábica e robusta	48
3.3 MÉTODOS DE ANÁLISE	49
3.3.1 Preparo das soluções padrão.....	49
3.3.2 Ensaio de torração.....	49

3.3.3	Caracterização da cor.....	49
3.3.4	Extração simultânea de triptofano não-protéico e 5-HTP	50
3.3.5	Hidrólise alcalina para obtenção de triptofano protéico	51
3.3.6	Separação e determinação de triptofano e 5-HTP por CLAE-par iônico....	52
3.3.7	Determinação dos compostos nitrogenados	53
3.3.8	Determinação dos sólidos totais, concentração e extração da bebida	54
3.3.9	Análise estatística dos dados.....	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1	Desenvolvimento e validação de metodologia por CLAE-par iônico para determinação simultânea de triptofano e 5-HTP em café.....	55
4.1.1	Definição das condições de trabalho.....	55
4.1.2	Comparação de métodos de extração simultânea de triptofano não-protéico e 5-HTP	56
4.1.3	Otimização do método de extração simultânea de triptofano não-protéico e 5-HTP	57
4.1.4	Validação do método de determinação de triptofano e 5-HTP por CLAE-par iônico.....	59
4.2	Teores de triptofano e 5-HTP em grãos de café arábica e robusta crus....	62
4.2.1	Teores de umidade	62
4.2.2	Teores de proteína.....	63
4.2.3	Teores de triptofano e 5-HTP	64
4.3	Influência da torração nos teores de triptofano e 5-HTP em grãos de café arábica e robusta	68
4.3.1	Perda de peso durante a torração	68
4.3.2	Teores de umidade	71
4.3.3	Teores de proteína.....	72
4.3.4	Teores de triptofano e 5-HTP	73
4.4	Teores de triptofano e 5-HTP nas bebidas preparadas a partir de grãos de café arábica e robusta	76
4.4.1	Caracterização das amostras	76
4.4.2	Teores de nitrogênio total.....	78
4.4.3	Teores de triptofano e 5-HTP	79
5	CONCLUSÃO	82
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

LISTA DE TABELAS

1 - Estimativa de produção, área colhida e rendimento médio do cultivo de café no Brasil na safra 2006/2007.....	16
2 - Classificação oficial do café quanto à qualidade da bebida	19
3 - Composição química aproximada em base seca do cafés arábica e robusta crus.....	25
4 - Gradiente ótimo para quantificação simultânea de 5-HTP e triptofano	55
5 - Percentuais de recuperação de triptofano não-protéico e 5-HTP obtidos por meio de diferentes metodologias de extração.....	57
6 - Resultados encontrados para extração de triptofano não-protéico e 5-HTP com diferentes tempos de agitação.....	58
7 - Resultados encontrados para extração de triptofano não-protéico e 5-HTP com 2 e 3 etapas de extração	58
8 - Equações das curvas analíticas e seus respectivos coeficientes de determinação obtidas para triptofano e 5-HTP em três dias diferentes	61
9 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação para amostras adicionadas de triptofano e 5-HTP.....	61
10 - Teores médios de umidade de diferentes amostras de café arábica e robusta crus.....	63
11 - Teores médios de proteína em amostras de café arábica e robusta crus, expressos em base seca.....	64
12 - Teores médios de 5-HTP e triptofano (não-protéico, total e protéico) em base seca em amostras de café arábica e robusta crus	65
13 - Teores médios de triptofano e proteína em amostras de café arábica e robusta crus, em base seca.....	66
14 - Porcentagens médias de perda de peso de amostras de café arábica e robusta submetidos a diferentes níveis de torração.....	68
15 - Características de cor CIE L*a*b* de amostras de café arábica e robusta submetidos a diferentes níveis de torração.....	70
16 - Teores médios de umidade de amostras de café arábica e robusta submetidas a diferentes níveis de torração	71
17 - Teores médios de proteína de amostras de café arábica e robusta submetidas a diferentes níveis de torração	72
18 - Teores médios (e porcentagem de perda) de 5-HTP e triptofano não-protéico e total em amostras de café arábica e robusta submetidas a diferentes níveis de torração	74
19 - Teores médios de sólidos totais, concentração e extração nas amostras de bebidas de cafés arábica e robusta	77

20 - Teores médios de nitrogênio nas amostras de bebidas de café arábica e robusta	78
21 - Teores médios de 5-HTP e triptofano (não-protéico e total) nas amostras de bebidas de cafés arábica e robusta	79

LISTA DE FIGURAS

1- Folhas, flores, frutos e grãos de <i>Coffea arabica</i> L.	17
2 - Esquema do corte transversal de um grão de café.....	18
3 - Fases do ciclo de processamento do café.....	21
4 - Estrutura da 5-HT.	30
5 - Vias de produção e metabolismo de serotonina.	31
6 - Estrutura do triptofano	32
7 - Estrutura do 5-HTP.....	34
8 - Fluxograma das etapas para a determinação cromatográfica de triptofano	36
9 - Fluxograma das etapas para a determinação cromatográfica de 5-HTP.....	38
10- Cromatogramas de detecção por fluorescência de (a) 5-HTP e (b) triptofano em (A) solução padrão e (B) amostra de café arábica.....	56
11 - Curvas analíticas de 5-HTP (A) e triptofano (B), nas concentrações de 0,3 a 40 µg/mL, suas respectivas equações de regressão linear e coeficientes de correlação.....	60
12 - Análise de soluções padrão de concentração 5 µg/mL de triptofano (A) e 5-HTP (B) em diferentes dias no intervalo de um mês	62
13 - Contribuição do triptofano não-protéico ao teor total de triptofano em café arábica (A) e café robusta (B).....	67
14 - Peso de amostras de café arábica e robusta crus e submetidas a diferentes níveis de torração	69
15 - Variação do teor de triptofano total de amostras de café arábica e robusta crus e submetidas a diferentes níveis de torração.....	75
16 - Teores médios de triptofano protéico (A) em grãos submetidos a torra média e (B) nos sólidos totais das bebidas de cafés arábica e robusta.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIC	Associação Brasileira da Indústria de Café
AOAC	Association of Official Analytical Chemist
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Agropecuária
5-HT	Serotonina
5-HTP	5-Hidroxitriptofano
OIC	Organização Internacional do Café
SNC	Sistema Nervoso Central

RESUMO

Recentes estudos epidemiológicos e sobre a composição do café têm demonstrado que entre outras, este possui várias propriedades funcionais em relação ao Sistema Nervoso Central (SNC). A serotonina, que atua como um neurotransmissor do SNC está presente nos grãos de café, mas quando ingerida não influencia a concentração cerebral. O triptofano e o 5-hidroxitriptofano (5-HTP) são precursores da serotonina. Em altos níveis no café estes compostos podem influenciar a síntese de serotonina cerebral. Com o objetivo de determinar os teores destes compostos em grãos e bebidas de café, um método por CLAE-par iônico foi desenvolvido. Este método mostrou ser seletivo, sensível, preciso e exato, e linear na faixa de 0,3 a 40 µg/mL para quantificação de triptofano protéico e não-protéico e 5-HTP nos grãos e na bebida de café. O triptofano protéico foi obtido após hidrólise com NaOH 4,2 N e o 5-HTP e o triptofano não-protéico após extração com solução de metanol a 50%. O 5-HTP não foi encontrado nas amostras de café arábica e robusta (crus, torrados e bebida). O triptofano não-protéico foi encontrado apenas nos grãos crus, com maiores concentrações no café arábica. O triptofano protéico estava presente em maiores níveis no café robusta cru, mas não foi observada diferença significativa nos grãos torrados. Houve uma redução significativa nos teores de triptofano protéico com o aumento de tempo e temperatura de torração. O triptofano protéico foi encontrado nas bebidas de ambas as espécies, com maiores teores no café robusta. A presença de triptofano na bebida café sugere que esta pode ter contribuição no fornecimento deste aminoácido na dieta, mas seu aproveitamento como precursor da serotonina ainda depende da digestibilidade da proteína e da razão entre o triptofano e os outros aminoácidos neutros.

Palavras-chave: triptofano, 5-hidroxitriptofano, café, metodologia, CLAE.

ABSTRACT

.DETERMINATION OF SEROTONIN PRECURSORS – TRYPTOPHAN AND 5-HYDROXYTRYPTOPHAN – IN COFFEE BY ION-PAIR HPLC

Recent epidemiological and compositional studies have indicated that coffee has several functional properties including some associated with the Central Nervous System (CNS). Serotonin, which is a CNS neurotransmitter, is present in coffee grains, but when orally consumed it does not affect brain contents. Tryptophan and 5-hydroxytryptophan (5-HTP) are serotonin precursors. These compounds, at high levels in coffee, could affect serotonin synthesis in the brain. In order to determine the levels of these compounds in coffee grains and beverages, an ion-pair HPLC method was developed. It was observed to be selective, sensitive, precise, accurate and linear in the range of 0.3 to 40 µg/mL for the simultaneous quantification of proteic and free tryptophan and 5-HTP. Proteic tryptophan was obtained after hydrolysis with 4.2 N NaOH and 5-HTP and free tryptophan after extraction with 50% methanol. 5-HTP was not detected in arabica and robusta coffee samples (green, roasted or beverage). Free tryptophan was found only in green coffee, with higher concentrations in arabica coffee. Proteic tryptophan was present at higher levels in robusta green coffee, but no significant difference was observed among roasted grains. There was a significant decrease on proteic tryptophan levels with increased roasting time and temperature. Proteic tryptophan was found in the beverages of both species, with higher levels in robusta compared to arabica. The presence of proteic tryptophan in coffee beverage suggests that it might contribute to the diet tryptophan pool, however its uptake as a precursor of serotonin will depend on the protein digestibility and on the tryptophan/neutral amino acids ratio.

Key words: tryptophan, 5-hydroxytryptophan, coffee, HPLC, method.

1 INTRODUÇÃO

O café possui grande importância sócio-econômica por ser o segundo produto agrícola mais comercializado no mundo, e por representar importante fonte financeira para os países em desenvolvimento, envolvendo um grande número de pessoas em sua cadeia produtiva (EMBRAPA CAFÉ, 2006a; SILVA, 1999).

A bebida café é preparada a partir das sementes do fruto do cafeeiro, que pertence à família *Rubiaceae* e ao gênero *Coffea*, sendo *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* P. as principais espécies cultivadas economicamente no mundo (CARVALHO JÚNIOR, 2002).

Para se transformar no produto em pó a partir do qual será preparada a bebida, os grãos de café passam por etapas de limpeza, classificação, seleção, secagem, torração e moagem, durante as quais tem sua composição química alterada. Os componentes químicos do café também variam de acordo com fatores genéticos e ambientais, tratamentos culturais, condições de desenvolvimento e maturação dos frutos, métodos de colheita, armazenamento, e modo de preparo da bebida (CARVALHO et al., 1997). A torração altera a composição do grão por causa da desidratação, da oxidação, da carbonização e de reações, como a de Maillard. A composição química da matéria prima e as condições de torração são as principais responsáveis pelo aroma e sabor do café torrado, ou seja, pela sua qualidade final (PEREIRA, 1997).

A bebida café é uma infusão obtida pela escaldada do pó preparado pela moagem do grão torrado. Ela tem sua composição variada de acordo com a composição do café torrado, granulometria e quantidade de pó, volume da água utilizada em sua preparação, temperatura da água, ação de misturar o extrato, e tempo de extração (POTTER & HOTCHKISS, 1995; CARVALHO et al., 1997).

Atualmente, muitos estudos epidemiológicos têm demonstrado que o café possui diversas propriedades funcionais. Dentre outros, têm sido encontrados diversos efeitos benéficos em relação ao Sistema Nervoso Central (SNC), como associações com menor risco de suicídio (KLATSKY et al., 1993; KAWACHI et al., 1996), diminuição da incidência do mal de Parkinson (ROSS et al., 2000; STARK, 2006), prevenção da depressão (FLORES et al., 2000), e diminuição no consumo de álcool e cigarros (SANTOS et al., 1991; FLORES et al., 2000; SKOG, 2006). A maioria dos estudos epidemiológicos atribui os efeitos do café à cafeína presente neste. Mas o café possui

muitos outros compostos, e, portanto, a possibilidade de que substâncias com propriedades funcionais estejam presentes deve ser estudada.

A serotonina está presente no trato gastrointestinal, nas plaquetas, e no SNC. Neste último, a serotonina atua como um neurotransmissor envolvido no controle do apetite, do sono, do humor, alucinações, comportamento estereotipado e percepção da dor, entre outros (KATZUNG & JULIUS, 2002). Este composto está presente nos grãos de café (CIRILO et al., 2003), mas não pode influenciar a concentração cerebral, pois além de não ultrapassar a barreira hemato-encefálica (GOIHL, 2006), a maior parte é metabolizada antes de penetrar na corrente sanguínea (RANG et al., 1995).

O triptofano e o 5-hidroxitriptofano são precursores da serotonina, além de exercerem outras funções no organismo. Estes compostos estão presentes na dieta e, em altos níveis, podem influenciar a síntese de serotonina cerebral. O alto conteúdo de triptofano não-protéico, mais facilmente absorvido, poderia ter o efeito de aumentar a viabilidade deste aminoácido ao cérebro (COMAI et al., 2006). O 5-hidroxitriptofano tem se mostrado efetivo como suplemento dietético (BIRDSALL, 1998; DAS et al., 2004), e tem como vantagem sobre o triptofano o fato de sua absorção intestinal não requerer a presença de transportador e não ser afetada pela presença de outros aminoácidos (MAGNUSSEN & NIELSEN-KUDSK, 1980).

Visando fornecer subsídios para a elucidação dos efeitos do café no SNC, este trabalho teve como objetivo geral verificar a existência dos precursores da serotonina – triptofano protéico e não-protéico, e 5-hidroxitriptofano – no café cru e torrado e na bebida café das espécies *C. canephora* Pierre var. *robusta* e *C. arabica* L. Os objetivos específicos foram (i) desenvolver e validar uma metodologia para determinação de triptofano não-protéico e 5-hidroxitriptofano de forma simultânea; (ii) determinar e comparar o conteúdo de triptofano protéico e não-protéico, e 5-hidroxitriptofano em amostras de café cru das espécies *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre var. *robusta*; (iii) estudar o efeito de diferentes níveis (tempo vs. temperatura) de torração nos teores de triptofano protéico e não-protéico e 5-HTP em grãos de café; (iv) estudar comparativamente os teores de triptofano protéico e não-protéico e 5-hidroxitriptofano nas bebidas de *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre var. *robusta*; (v) quantificar os compostos nitrogenados para expressar o percentual de triptofano protéico por grama de proteína contido no café; (vi) determinar o teor de sólidos solúveis, extração e concentração das bebidas de *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre var. *robusta* e relacioná-lo com o conteúdo de triptofano protéico e não-protéico, e 5-hidroxitriptofano nestas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DADOS RELEVANTES DO CAFÉ

2.1.1 Características sócio-econômicas

O café é a segunda maior fonte geradora de riquezas do planeta, perdendo apenas para o petróleo, um mercado que movimenta, anualmente, 91 bilhões de dólares. A cadeia do café emprega direta ou indiretamente meio bilhão de pessoas em todo o mundo, ou 8% da população mundial (EMBRAPA CAFÉ, 2006). O café tem grande importância para o balanço comercial entre países desenvolvidos e em desenvolvimento, representando, para estes últimos, uma importante fonte financeira (SILVA, 1999).

O café é importante para o Brasil desde a época do império. O produto se adaptou tão bem aos solos e climas brasileiros que, quatro anos após o estabelecimento da cultura no país, em 1727, já ocorriam as primeiras exportações. No ano de 1849, a produção brasileira de café já atingia 40% da produção mundial e chegou a contribuir isoladamente com 70% do valor de nossas exportações no período de 1925 a 1929 (EMBRAPA CAFÉ, 2006). Atualmente, o Brasil é o principal país produtor e exportador e com maior consumo interno de café (MAPA, 2007).

A produção nacional na safra 2006/2007 foi de 42,5 milhões de sacas de café beneficiado, das quais, 32 milhões de sacas (78%) forma de café arábica e 9,5 milhões de sacas (22%) de café robusta. A área cultivada foi de 2,2 milhões de hectares, dos quais, 2 milhões (92%) estavam em produção e 200 mil (8%) em formação (MAPA, 2007). Quando comparado com a safra anterior, verifica-se um incremento de 26% na produção e de 31% na produtividade. Esse aumento deve-se aos bons tratamentos culturais, incentivados pela recuperação dos preços de mercados, e à bianualidade positiva da cultura (CONAB, 2007). Alguns dados relevantes sobre a produção de café no Brasil são apresentados na tabela 1.

No Brasil, o Estado de Minas Gerais é o maior produtor de café, com área plantada estimada de 1,1 milhões de hectares de café em produção e em formação. A produção do Estado representa 51% da produção nacional (MAPA, 2007).

Tabela 1 - Estimativa de produção, área colhida e rendimento médio do cultivo de café no Brasil na safra 2006/2007

Produção (milhões de sacas)	Área colhida (milhões de ha)	Rendimento médio (sacas/ha)
42,5	2,2	19,8

Fonte: MAPA (2007).

De janeiro a agosto de 2007 o Brasil exportou um milhão de toneladas de café, incluindo café cru, solúvel, e torrado e moído, o que representa cerca de 2,5 bilhões de dólares no total, ou 6,4% das exportações do agronegócio brasileiro (MAPA, 2007).

O consumo interno brasileiro de café vem crescendo de forma acentuada. No levantamento realizado em 2007, foi encontrado o consumo de 16,9 milhões de sacas de café, o que representa um acréscimo de 5,81% em relação ao ano de 2006. O consumo *per capita* foi de 5,52 kg de café em grão cru ou 4,41 kg de café torrado (MAPA, 2007).

O aumento do consumo do café que vem acontecendo nos últimos anos se deve, principalmente, a um conjunto de fatores que se repetem de forma consistente e duradoura, entre estes, a melhoria contínua da qualidade do café oferecido aos consumidores, consolidação do mercado de cafés tipo Gourmet ou Especiais, diferenciados e de alta qualidade, e a melhoria da percepção do café quanto aos aspectos dos benefícios para a saúde (ABIC, 2006).

2.1.2 Botânica e estrutura do grão

O cafeeiro pertence à família *Rubiaceae* e ao gênero *Coffea*, que é constituído de 60 espécies, das quais seis são de taxonomia incerta ou mal conhecida e as demais estão reunidas nas séries *eucoffea*, *mascarocoffea*, *argocoffea*, *paracoffea* e *mozambicoffea* com 14, 18, nove, oito e cinco espécies, respectivamente. *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre, as principais espécies cultivadas economicamente no mundo, são da série *eucoffea* (COELHO, 2000).

O *Coffea arabica* L. é uma planta tropical adaptada ao clima úmido de temperaturas amenas, enquanto o *Coffea canephora* Pierre é de regiões quentes e úmidas (MELO et al., 1998; SILVA, 1999).

Antes de serem transferidas para a plantação, as plantas de café são cultivadas como mudas em casas-de-vegetação. Os cafeeiros alcançam alturas de 3 a 12 m,

mas, para facilitar a colheita, pode-se controlar o desenvolvimento de maneira que se adota a forma de arbusto de 2 a 2,5 m. Como representado na figura 1, as plantas de café possuem flores brancas a partir das quais se formam frutos de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro. O arbusto inicia a floração aos três ou quatro anos, e alcança sua produção máxima aos 10 a 15 anos. O amadurecimento dos frutos geralmente acontece de 8 a 12 meses depois da floração (BELITZ & GROSH, 1997), sendo que *C. arabica* L. requer 6 a 8 meses para amadurecer enquanto *C. canephora* Pierre requer 9 a 11 meses. O crescimento dos frutos não é sincronizado durante o desenvolvimento, com diferentes proporções de vários tamanhos de frutos na mesma planta (DE CASTRO & MARRACCINI, 2006). Um cafeeiro produz cerca de 2.000 a 4.000 frutos maduros por ano, o que corresponde à produção de cerca de 605 a 1.210 g de café moído (POTTER & HOTCHKISS, 1995).



Figura 1- Folhas, flores, frutos e grãos de *Coffea arabica* L.

Fonte: <<http://www.wikipedia.org>> (2006).

O fruto do café possui aspecto semelhante a uma cereja, vermelho ou amarelo quando maduro, e é constituído de casca, polpa ou mucilagem e sementes recobertas pelo pergaminho, que corresponde a uma membrana. A bebida é preparada a partir das sementes, os chamados grãos, que são duas por fruto, as quais adquirem as características aromáticas próprias da bebida apenas durante a torração (CARVALHO JÚNIOR, 2002). Na figura 2 estão representadas as partes de um fruto de café.

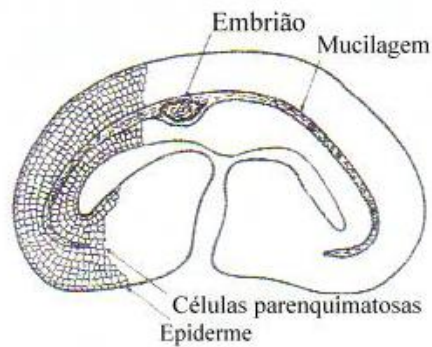


Figura 2 - Esquema do corte transversal de um grão de café.

Fonte: CLIFFORD & WILSON (1985).

2.1.3 Classificação

A classificação do café baseia-se nas características físicas como forma, tamanho, cor, uniformidade, e na qualidade da bebida (TEIXEIRA, 1999). As principais classificações do café são por tipo ou defeitos, por peneira e pela qualidade da bebida.

A classificação por tipo ou defeitos é realizada com base na presença de grãos defeituosos e impurezas em uma amostra de 300 g de café, em função do número de defeitos (BÁRTHOLO & GUIMARÃES, 1997). A ocorrência de defeitos em grãos de café é atribuída a diversos fatores como condições deficientes de cultivo e procedimentos inadequados de colheita, principalmente a técnica de derrça, e pós-colheita. Segundo BÁRTHOLO et al. (1989), os defeitos podem ser de natureza intrínseca, tais como grãos pretos, verdes e ardidos, cochos, mal granados, quebrados e brocados, ou de natureza extrínseca, representando elementos estranhos como paus pedras, cascas, etc. A maioria dos grãos está madura quando colhidos, mas sempre haverá uma quantidade significativa de grãos não maduros ou passados. Para se ter idéia, em Minas Gerais, o maior produtor nacional de café, estima-se que grãos defeituosos correspondem a aproximadamente 20% do total produzido (CARVALHO et al., 1997). A presença de grãos defeituosos de café promove mudanças na composição química do café cru, que podem mudar a aceitabilidade do produto final (MAZZAFERA, 1999).

A classificação por peneira, feita segundo as dimensões e crivos destas, é baseada no tamanho e formato dos grãos de café, existindo peneiras de crivos redondos para os cafés chatos e de crivos alongados para as mocas. Então, se pesam os grãos retidos na peneira e faz-se o cálculo da distribuição percentual por peneira de um lote de café (BÁRTHOLO et al., 1989; COELHO, 2000). Esta classificação é muito

importante, pois permite a separação dos grãos em grupos, o que possibilita uma torração mais uniforme (TEIXEIRA, 1999).

A classificação do café pela qualidade da bebida (tabela 2) é principalmente definida pela prova de xícara, que consiste da análise sensorial por degustadores treinados.

Tabela 2 - Classificação oficial do café quanto à qualidade da bebida

Grupo		Subgrupo	Descrição
Arábica	Bebidas finas	Estritamente mole	apresenta, em conjunto, todos os requisitos de aroma e sabor "mole", porém mais acentuado
		Mole	aroma e sabor agradável, brando e adocicado
		Apenas Mole	sabor levemente doce e suave, mas sem adstringência ou aspereza de paladar
		Duro	sabor acre, adstringente e áspero, porém não apresenta paladares estranhos
	Bebidas fenicadas	Riado	leve sabor, típico de iodofórmio
		Rio	sabor típico e acentuado de iodofórmio
		Riozona	aroma e sabor muito acentuado, assemelhado ao iodofórmio ou ao ácido fênico, repugnante ao paladar
Robusta	Excelente	sabor neutro e acidez mediana	
	Boa	sabor neutro e ligeira acidez	
	Regular	sabor típico de robusta sem acidez	
	Anormal	sabor não característico ao produto	

MAPA (2003).

Segundo BÁRTHOLO & GUIMARÃES (1997), também faz parte desta classificação a análise de vários quesitos como variedade do café, forma, tamanho, aspecto e cor de grãos, entre outros. Os grãos classificados são então testados para determinar o potencial da qualidade da bebida. Na prova de xícara, pequenas quantidades de grãos são torrados, moídos e são usados para preparo da bebida (POTTER & HOTCHKISS, 1995).

Apesar de ser considerada subjetiva por alguns especialistas, a prova de xícara é adotada na metodologia de análise para credenciamento dos cafés pela Organização Internacional do Café (OIC), o que se deve ao fato de ainda não ser possível definir critérios físico-químicos associados à análise sensorial para a classificação da bebida (VITORINO et al., 2001).

2.2 PROCESSAMENTO DO CAFÉ

Antes do processamento dos frutos do cafeeiro é feita a remoção dos materiais estranhos e, em seguida, os frutos classificados passam por uma etapa de limpeza (VARNAM & SUTHERLAND, 1997).

O café é processado principalmente por duas vias: a via seca e a via úmida (figura 3). Na via seca, os frutos de café colhidos e limpos são diretamente secados, sendo esta a via de processamento mais praticada no Brasil. Na via úmida os frutos passam por uma etapa de despulpamento antes da secagem (GIRANDA, 1998).

Na etapa de despulpamento pela via úmida, máquinas são utilizadas para quebrar e separar a polpa do restante do fruto. A separação da polpa deixa uma mucilagem nas sementes, que mais tarde é removida por meio de métodos que incluem fermentação microbiana das sementes, utilização de enzimas que digerem a pectina e outros tratamentos de lavagem (POTTER & HOTCHKISS, 1995). Os grãos despulpados utilizam menor tempo e menor área do terreiro para secagem, são menos suscetíveis ao crescimento de microorganismos que provocam fermentações e produzem, de maneira geral, bebida mais suave (BÁRTHOLO & GUIMARÃES, 1997).

Após a limpeza, no caso da via seca, ou do despulpamento, no caso da via úmida, o café é submetido à secagem. Os grãos podem ser secos em terreiros ao sol, em secadores mecânicos que empregam ar quente, ou em sistema misto, no qual os grãos são submetidos a uma pré-secagem em terreiro e depois levados aos secadores. Ao final do processo de secagem, os grãos normalmente atingem 11 a 13% de umidade (VILELA, 1997). Para uma secagem uniforme em terreiros, as sementes devem ser freqüentemente viradas. Durante a secagem, os atributos de cor e aroma das sementes são modificados, e uma super secagem ou grandes flutuações na temperatura provocam qualidade variável das sementes de café. A secagem em máquinas permite o controle da temperatura entre outras vantagens (POTTER & HOTCHKISS, 1995).

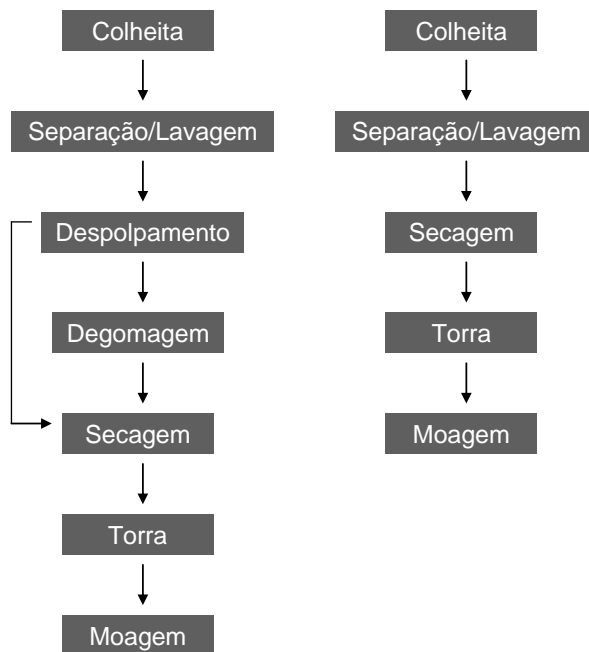


Figura 3 - Fases do processamento do café.

Após a secagem, o pergaminho dos grãos despulpados é retirado por máquinas que aplicam fricção e removem-no por meio de uma corrente de ar. A cobertura dos grãos provenientes da via seca também deve ser eliminada, o que é feito por máquinas, que diferem da empregada para grãos provenientes da via úmida por serem capazes de eliminar uma maior quantidade de cobertura. Então acontece a classificação das sementes por cor e defeitos, realizada manualmente ou por máquinas que as classificam individualmente por seletoras eletrônicas, processo que permite melhor controle da qualidade. Geralmente, os grãos de café classificados são transportados para as indústrias como grãos crus para posterior processamento. Os fabricantes utilizam diferentes misturas de cafés e compram seus grãos de países que produzem o tipo de café desejado, para obter produtos customizados para mercados especiais (POTTER & HOTCHKISS, 1995; VARNAM & SUTHERLAND, 1997).

A torração é um processo que depende da temperatura e no qual se iniciam importantes mudanças químicas no grão de café. Este processo ocorre com a movimentação de ar quente através dos grãos para que estes se aqueçam. Quando a temperatura do grão atinge 180 °C começa a combustão, com desprendimento de CO₂ e CO, a cor dos grãos passa a ser marrom e o volume destes aumenta. Até este ponto da torração, houve a evaporação da água livre, a água ligada evapora-se lentamente, pequenas mudanças químicas ocorrem, mas ainda não se desenvolveu nenhum sabor do café. O ponto de torração se dá entre 185 e 240 °C, sendo ideal entre 210 e

230 °C, quando o aroma se forma totalmente (CARVALHO et al., 1997; COELHO, 2000). Ao final da torração os grãos são resfriados com o uso de ar ou água.

O modelo de torrador mais utilizado possui um tambor rotatório horizontal, no qual os grãos de café secos reviram-se sob uma corrente de ar aquecido. Outros torradores empregam fluxo de ar cruzado ou aquecimento pelo contato com a superfície quente (VARNAM & SUTHERLAND, 1997). Novos tipos de torradores controlam automaticamente a temperatura e a umidade, re-circulam os gases, e controlam o tempo de permanência dos grãos em seu interior. Alguns processos de torração também empregam nitrogênio aquecido sob pressão, o que, entre outras vantagens, melhora o aroma da bebida devido à remoção do oxigênio (POTTER & HOTCHKISS, 1995).

As condições de torração e a composição química da matéria prima são as principais responsáveis pelo aroma e sabor do café torrado, ou seja, pela sua qualidade final (PEREIRA, 1997). A torração altera a composição do grão por causa da desidratação, da oxidação e da carbonização. Este processo aumenta o volume aparente do café em um terço do primitivo e diminui o peso de 17 a 21% (LIMA, 2005). A perda de peso é devido à produção de material volátil, constituído de umidade, gás carbônico e compostos orgânicos, sendo conseqüentemente correlacionada ao grau de torração dos grãos (DUTRA, 2000).

Após serem torrados, os grãos de café são resfriados e moídos. Moinhos com rolos múltiplos são os mais comumente utilizados para a moagem do café em escala industrial, porque produzem partículas com menor variação de tamanho. O grau de moagem é determinado pelo número de pares de rolos usados e, à medida que os grãos avançam por estes, tem seu tamanho progressivamente reduzido (VARNAM & SUTHERLAND, 1997).

A granulometria do pó de café depende de sua finalidade, e afeta o tempo de extração, o grau de turbidez, e outras propriedades da bebida extraída (POTTER & HOTCHKISS, 1995). O principal objetivo deste processo é aumentar a superfície de extração, ou aumentar a extensão da interface entre a água e o café, para facilitar a transferência de substâncias solúveis e emulsificáveis para a bebida. Ao mesmo tempo, a ruptura dos tecidos e células do grão de café acelera a liberação de CO₂ e voláteis, mas facilita a extração do aroma remanescente (ANDUEZA et al., 2003). A moagem dos grãos torrados tem influência no sabor do café. Moagens mais finas dão origem a bebidas mais fortes, pois desprendem solúveis mais rapidamente, mas

envelhecem mais rapidamente devido a oxidações de compostos responsáveis pelo aroma do café (CARVALHO et al., 1997).

Enquanto o café cru pode ser armazenado por um a três anos, o café torrado só se conserva por oito a 10 semanas, quando o aroma de torrado diminui e aparece um gosto de ranço. A estabilidade do café durante a estocagem também é afetada pela granulometria. O processo de envelhecimento pode ser atrasado pela conservação do café em temperatura o mais baixa possível e fora do contato com o oxigênio e vapor de água (BELITZ & GROSH, 1997). O café que é estocado durante longos períodos deve ser embalado em pacotes herméticos sob vácuo ou gás inerte, porque suas características de "flavor" são muito instáveis em contato com o oxigênio. A embalagem a vácuo evita as alterações oxidativas, e proporciona ao produto uma vida útil mais prolongada (POTTER & HOTCHKISS, 1995; VARNAM & SUTHERLAND, 1997).

2.3 PREPARO DA BEBIDA CAFÉ

A bebida café é uma infusão obtida pela escalda do pó preparado pela moagem do grão torrado, e baseia-se na transferência de massa de substâncias que podem difundir da fase sólida para a fase líquida. Este processo possui duas fases: a de lavagem, em que ocorre a extração e dissolução no extrato das substâncias solúveis livres da superfície do grão, e a fase de difusão, em que as substâncias das partículas celulares se solubilizam (OLIVEIRA, 2004; LIMA, 2005). Segundo VARNAM & SUTHERLAND (1997), apenas a primeira fase gera um rendimento de mais de 90% de substâncias solúveis extraídas.

Os procedimentos mais comuns para extração do café são por infusão e por filtração. No procedimento de infusão, ferve-se o café em água e a seguir filtra-se. Na filtração, o café é colocado sobre um suporte filtrante e por este passa-se a água fervente (BELITZ & GROSH, 1997).

Uma das formas mais usuais de preparar o café no Brasil é ferver a água, desligar quando em ebulição, adicionar o pó, agitar a mistura e vertê-la sobre um coador feito de algodão, flanela ou papel. Adicionar o pó à água antes desta entrar em ebulição melhora o aroma e o sabor. A infusão feita com o grão moído no momento do preparo é de melhor qualidade sensorial e a granulometria do café moído influi na capacidade de extração da água quente. Há também máquinas elétricas para a preparação do

café, que possuem um reservatório para água, uma resistência elétrica e um porta-filtro sobre o qual fica o filtro de papel, no qual é colocado o pó de café. As máquinas de café expresso são outro meio de preparar a bebida. Estas possuem uma caldeira e geram vapor d'água que é passado sob pressão por uma camada de pó de café, recém moído, sustentado por uma tela metálica muito fina. De acordo com a pressão do vapor e a quantidade de pó no porta-pó, a infusão fica mais ou menos forte (LIMA, 2005).

A qualidade da bebida café está diretamente relacionada à composição química dos grãos torrados que, por sua vez, é afetada pela espécie e composição dos grãos crus, além das condições de processamento pós-colheita (RAMALAKSHMI et al., 2007). A composição da bebida café varia também de acordo com o modo de preparo, a granulometria do pó, a quantidade de pó, o volume da água utilizada em sua preparação, a temperatura da água, a ação de misturar o extrato, e com o tempo de extração. Todos estes fatores também afetam a quantidade de solúveis de café que são extraídos do grão moído e, para assegurar o corpo da bebida, uma maior quantidade destes sólidos é desejada (POTTER & HOTCHKISS, 1995; CARVALHO et al., 1997; LIMA, 2005). Segundo MENDONÇA et al. (2005), a ruptura das células do grão de café aumenta a velocidade de extração e o rendimento destes compostos, e torrações mais escuras aumentam em até 1% o teor dos sólidos, devido à ressolubilização de celuloses e carboidratos, e à desnaturação de proteínas.

O sabor e o aroma da bebida do café são influenciados pela presença de grãos defeituosos – verdes, verde-pretos, pretos ou ardidos – ou pela ocorrência de fermentações nos grãos, que mais prejudica a bebida (BÁRTHOLO & GUIMARÃES, 1997). Ademais, segundo BELITZ & GROSH (1997), a utilização de uma temperatura que não ultrapasse 95 °C permite a obtenção de um café aromático, em que persiste a maior parte das substâncias aromáticas voláteis.

A forma pela qual a bebida café é preparada é uma variável importante em seus efeitos sobre a saúde. Segundo ROALES-NIETO et al. (2004), as formas de preparo que implicam a passagem do café através de um filtro aparecem como as mais saudáveis, por reduzir o conteúdo de alguns compostos maléficis à saúde na bebida final. Neste caso, o tipo de filtro utilizado deve ser considerado, pois são incluídos apenas filtros que realmente retenham estes compostos. As preferências culturais em bebidas de café determinam a maneira como estas serão preparadas e consumidas, e estudos mostram que as diferenças parecem afetar os benefícios para a saúde (DÓREA & COSTA, 2005).

2.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAFÉ

Estima-se que o café consista de mais de 200 compostos (HAMER, 2006). Os componentes químicos do grão variam de acordo com fatores genéticos e ambientais, tratamentos culturais, desenvolvimento e maturação dos frutos, métodos de colheita, condições de torração, armazenamento, e modo de preparo da bebida (CARVALHO et al., 1997). Os teores dos compostos sofrem variações durante o desenvolvimento e maturação, diminuindo ou aumentando, até atingirem níveis ideais característicos do grão de café maduro (PIMENTA, 1995). A composição química do café cru (tabela 3) influencia nas características sensoriais da bebida, pois os compostos químicos presentes no grão são os precursores de flavor e da cor do café torrado (LOPES, 2000).

Tabela 3 - Composição química aproximada em base seca do cafés arábica e robusta crus

Componentes*	Arábica	Robusta
Cafeína	1,2	2,2
Trigonelina	1	0,7
Cinzas	4,2	4,4
Ácidos:		
Clorogênico total	6,5	10
Alifáticos	1	1
Quínico	0,4	0,4
Açúcares:		
Sacarose	8	4
Redutores	0,1	0,4
Polissacarídeos	44	48
Lignina	3	3
Pectina	2	2
Proteína	11	11
Aminoácidos livres	0,5	0,8
Lipídeos	16	10

* Valores expresso em g/100 g em base seca.
Fonte: CLARKE (2003).

Segundo PIMENTA (1995), os frutos crus possuem maiores concentrações de proteína bruta e de aminoácidos. As proteínas se encontram livres no citoplasma ou

unidas a polissacarídeos na parede celular, e têm sido pouco investigadas em grãos de café por exercerem pouca influência na formação de cor e sabor do grão torrado. Os aminoácidos ligados à proteína em comparação com os aminoácidos não ligados são inertes nas reações de torração (VARNAM & SUTHERLAND, 1997). Os teores de aminoácidos não-protéicos em café cru são da ordem de mg/100 g, e, freqüentemente, os mais abundantes são alanina, prolina, asparagina, ácido glutâmico, fenilalanina e triptofano. A comparação dos cafés *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre variedade *robusta* mostrou que no café robusta a maioria dos aminoácidos ocorre em maiores concentrações (ARNOLD et al., 1994; CASAL et al., 2003; MURKOVIC & DERLER, 2006). O café possui também outros compostos nitrogenados além de proteínas e aminoácidos, como cafeína, trigonelina, serotonina, dentre outros (VARNAM & SUTHERLAND, 1997).

Os carboidratos do grão cru estão na forma de açúcares livres de baixo peso molecular, principalmente sacarose e açúcares redutores, e de polissacarídeos. Da parte lipídica do grão de café, que se compõe fundamentalmente de trigliceróis, fazem parte o óleo do café, presente no endosperma, e a cera de café, que se encontra na capa exterior (VARNAM & SUTHERLAND, 1997).

Nas cinzas do café predominam potássio (1,1%), cálcio (0,2%), magnésio (0,2%), e outros elementos presentes em quantidades traço (BELITZ & GROSCH, 1997).

O café também possui aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres, compostos heterocíclicos, piridinas, compostos sulfurados, hidrocarbonetos, e fenóis. Possui também vitaminas, como tiamina, riboflavina, ácido pantotênico, colina, ácido fólico, vitamina B₆ e traços de B₁₂ (LIMA, 2005).

O *Coffea arabica* L. possui concentrações maiores de carboidratos, lipídios e trigonelina, e o *Coffea canephora* Pierre variedade *robusta*, exibe maiores teores de compostos fenólicos, cafeína e ácido clorogênico (CARVALHO et al., 1997).

Durante a torração, complexos mecanismos bioquímicos estão envolvidos no processo de formação de cor, sabor, e aroma do café, como as reações de Maillard, caramelização de açúcares, degradação de ácidos clorogênicos, proteínas e polissacarídeos (PEREIRA, 1997).

Na torração, as proteínas desnaturam e se degradam em fragmentos de menor peso molecular e os aminoácidos livres são degradados de modo drástico e só permanecem traços (VARNAM & SUTHERLAND, 1997). O conteúdo total de aminoácidos nos hidrolisados ácidos diminui cerca de 30% depois da torração. Os aminoácidos particularmente reativos (arginina, ácido aspártico, cistina, histidina, lisina,

serina, treonina, e metionina) diminuem consideravelmente no café torrado, em comparação com o café cru, enquanto os aminoácidos estáveis (alanina, ácido glutâmico, glicina, leucina, fenilalanina, prolina, e tirosina) apresentam um aumento relativo (BELITZ & GROSH, 1997).

Os carboidratos de baixo peso molecular, principalmente a sacarose, são degradados progressivamente à medida que se aumenta a intensidade da torração. Ocorre também uma perda notável de polissacarídeos, o que pode ser comprovado pelo aumento de açúcares de cadeia mais curta. Apesar disso, o número de monossacarídeos produzidos é muito limitado, devido à produção de anidridos e produtos de condensação a partir destes (VARNAM & SUTHERLAND, 1997).

As mudanças que ocorrem durante a torração nos carboidratos, ácidos, voláteis, óleos, elementos químicos, gás carbônico e proteínas, provocam a liberação de carbonilas e aminas. As aminas são responsáveis pelo odor de peixe e de amoníaco de muitos cafés torrados. Aminoácidos reagem com carboidratos, polimerizando e dando origem aos produtos escuros. Partículas insolúveis de proteínas ligam-se às substâncias graxas, que formam no café coado partículas coloidais responsáveis pela turbidez do café (CARVALHO et al., 1997). Em alguns casos, os complexos formados durante as primeiras etapas da torração se rompem em aminoácidos nas etapas posteriores (VARNAM & SUTHERLAND, 1997).

A cafeína é termoestável, ou seja, não é destruída por torração excessiva, o que, em parte, explica a prioridade de atenção dada a este composto na pesquisa científica. As outras substâncias como aminoácidos, açúcares, lipídios, niacina e ácidos clorogênicos são preservados, alterados ou degradados pela torração excessiva do café (FLORES et al., 2000).

2.5 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO CAFÉ

Há algumas décadas o café não era considerado um alimento funcional. Autores como SIVETZ & FOOTE (1963) afirmavam que o café possuía apenas o valor de proporcionar ao seu consumidor prazer e satisfação através do aroma, do sabor e dos efeitos fisiológicos e psicológicos adequados. Atualmente, muitos estudos epidemiológicos e da composição do café têm sido desenvolvidos, e têm demonstrado que este possui várias propriedades funcionais.

Alimentos funcionais são aqueles responsáveis por efeitos na promoção da saúde ou na prevenção de doenças, que melhoram ou mantêm a qualidade de vida em relação à saúde antes que tratamento médico seja necessário. O senso comum é que a ocorrência natural de componentes ativos no alimento ajude a definir se este é ou não um alimento funcional (TAKEDA et al., 2004; DÓREA & COSTA, 2005).

Diversos estudos têm mostrado que o consumo de café pode causar certos benefícios. O café é freqüentemente recomendado como um estimulante e para prevenir a hipertensão, além de ser um bronco dilatador e boa fonte de potássio para a dieta (VARNAM & SUTHERLAND, 1997).

Estudos relatam associações do consumo diário moderado de café com menor incidência de cirrose (KLATSKY et al., 1993; TVERDAL & SKURTVEIT, 2003; KLATSKY et al., 2006); menor risco de diabetes tipo 2 (VAN DAM et al., 2006); efeitos benéficos em relação à mortalidade por doenças coronárias (WOODWARD & TUNSTALL-PEDOE, 1999); e diminuição da incidência de alguns tipos de câncer (OBA et al., 2006; OHFUJI et al., 2006). O café também possui um grande número de compostos antioxidantes, que podem proteger o sistema biológico contra os efeitos potencialmente danosos dos radicais livres a diversos alvos celulares (YEN et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2007; GÓMEZ-RUIZ et al., 2007; LÓPEZ-GALILEA et al., 2007). Além disso, SHIMODA et al. (2006) sugeriram que o extrato de café cru é, possivelmente, efetivo contra o ganho de peso e o acúmulo de gordura, por inibição da absorção de gordura e ativação do metabolismo de lipídios no fígado.

Efeitos benéficos do consumo moderado de café também têm sido encontrados em relação ao Sistema Nervoso Central. Os efeitos do consumo de café vão além de mudanças no estado de alerta e no humor, e há vários estudos mostrando seus efeitos neurológicos positivos (DÓREA & COSTA, 2005). São encontradas associações com menor risco de suicídio (KLATSKY et al., 1993; KAWACHI et al., 1996), diminuição da incidência do mal de Parkinson (ROSS et al., 2000; STARK, 2006), prevenção da depressão (FLORES et al., 2000), e diminuição no consumo de álcool e cigarros (SANTOS et al., 1991; FLORES et al., 2000; SKOG, 2006).

Muitos estudos epidemiológicos atribuem os efeitos do café à cafeína. Esta age estimulando o SNC e o músculo cardíaco e relaxando o músculo liso, o que causa um aumento do metabolismo basal e incrementa a capacidade para o esforço muscular (NEHLIG et al., 1992; VARNAM & SUTHERLAND, 1997). Entretanto autores (KLATSKY et al., 2006; OHFUJI et al., 2006; VAN DAM et al., 2006) ressaltam que outros constituintes do café, além da cafeína, devem atuar em suas propriedades

funcionais, já que os mesmos efeitos muitas vezes não são observados com o consumo de chá ou ocorrem com a ingestão de cafés descafeinados.

KLATSKY et al. (2006) observaram que o consumo de quatro ou mais xícaras de café por dia reduzia o risco de cirrose hepática, especialmente cirrose alcoólica, com diminuição das concentrações de transaminases hepáticas no soro. Os autores ressaltaram que esta mesma relação não foi encontrada com o consumo de chá, o que os levou a pensar que alguma substância não identificada no café, não a cafeína, deve conferir este efeito protetor.

VAN DAM et al. (2006) sugeriram que o consumo moderado de café, tanto regular quanto descafeinado, pode diminuir o risco de diabetes tipo 2 em mulheres jovens e de meia-idade, resultados que sugerem que outros constituintes do café, não a cafeína, podem afetar o desenvolvimento desta doença.

OHFUJI et al. (2006), ao demonstrar a ação protetora do café em relação à incidência de carcinoma hepatocelular em pessoas infectadas com o vírus da hepatite C, também ressaltaram que outros constituintes do café, além da cafeína, devem atuar em suas propriedades funcionais, já que o mesmo efeito não foi observado com o consumo de chá.

Em sua revisão a respeito de efeitos do consumo de café, ROALES-NIETO et al. (2004) ressaltaram que raramente se identifica com clareza o componente do café relacionado com o benefício à saúde tratado, de maneira que a maioria das relações estabelecidas é entre o consumo de café e saúde. Ainda segundo estes autores, as relações do consumo de café com a saúde são tão complexas como sua composição, e tão variadas como suas formas de preparo e a quantidade que se ingere. Portanto, mais trabalhos experimentais são necessários para se compreender totalmente os vários componentes farmacologicamente ativos do café e suas interações com fatores tais como propensão genética, outros componentes da dieta e estilo de vida (HAMER, 2006).

Como abordado em diversos trabalhos, o café possui muitas outras substâncias além da cafeína, e, portanto, a possibilidade de que estes compostos interfiram nos níveis de neurotransmissores no cérebro deve ser estudada.

2.6 SEROTONINA E OS PRECURSORES, TRIPTOFANO E 5-HIDROXITRIPTOFANO

2.6.1 Serotonina

A serotonina (5-HT) é largamente distribuída nos reinos animal e vegetal. No organismo de mamíferos, mais de 90% da 5-HT se encontra em células do trato gastrointestinal. No sangue, a 5-HT é encontrada nas plaquetas, que concentram este neurotransmissor por meio de um mecanismo de transporte ativo. Também há 5-HT numa variedade de regiões do cérebro, mas principalmente nos núcleos da rafe do tronco cerebral, que possui corpos celulares de neurônios serotoninérgicos, que sintetizam, armazenam e liberam a 5-HT como neurotransmissor (KATZUNG & JULIUS, 2002). Na figura 4 tem-se a estrutura da 5-HT.

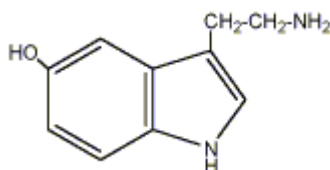


Figura 4 - Estrutura química da serotonina.

A 5-HT desempenha diferentes funções ao se ligar em uma variedade de receptores na membrana celular. Os papéis fisiológicos periféricos da 5-HT são motilidade gastrointestinal, vômitos, agregação plaquetária, hemostasia, mediação inflamatória, sensibilização de nociceptores e controle da microcirculação. Os papéis no SNC incluem controle do apetite, do sono, do humor, alucinações, comportamento estereotipado e percepção da dor. A 5-HT também está envolvida em condições como depressão, ansiedade e enxaqueca, e atua como precursora da melatonina, que desempenha um papel ainda não totalmente compreendido no comportamento de sono-vigília (RANG et al., 1995, KATZUNG & JULIUS, 2002).

A depressão está associada com a redução da neurotransmissão serotoninérgica, e com alterações no sono, mais freqüentemente insônia. Observa-se que durante a vigília o sistema serotoninérgico está ativo e, durante o sono este está inativo. ADRIEN (2002) propõe que a diminuição do sono em pacientes depressivos pode não ser

apenas um sintoma desta psicopatologia, mas um processo endógeno compensatório, para manter altos os níveis de 5-HT. O tratamento da depressão é realizado com o aumento da concentração de 5-HT na sinapse por meio de bloqueio do transportador ou inibição da enzima monoaminaoxidase (MAO), que metaboliza a 5-HT.

A produção de 5-HT ocorre pela conversão do triptofano em 5-hidroxitriptofano (nas células cromafins e nos neurônios, porém não nas plaquetas) pela ação da triptofano hidroxilase, uma enzima exclusiva de células produtoras deste composto. O 5-hidroxitriptofano (5-HTP) é, em seguida, descarboxilado em 5-HT por uma descarboxilase inespecífica (RANG et al., 1995).

A principal rota do metabolismo da 5-HT envolve a enzima MAO, mas há também carreadores Na^+ -dependentes envolvidos na terminação de sua ação, localizados nas membranas dos neurônios terminais serotoninérgicos e das plaquetas. As plaquetas só adquirem a 5-HT por meio deste carreador, já que não têm as enzimas requeridas para a síntese (SUNDERS-BUSH & MAYER, 2001). Ao ser oxidada pela MAO a 5-HT é transformada em ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), que é excretado na urina e pode fornecer uma medida da síntese de 5-HT no organismo (KATZUNG & JULIUS, 2002). Baixos níveis de 5-HIAA no fluido cerebrospinal também são observados, mas apenas em pacientes depressivos suicidas (GIEDKE, 2003). Na figura 5 são apresentadas as vias de produção e metabolismo da 5-HT.

CIRILO et al. (2003) observaram a presença de 5-HT em grãos de café cru, e em menor concentração em grãos torrados. O aumento do tempo de torração resultou em um aumento significativo nos teores de 5-HT, o que o autor sugere ter sido causado pela descarboxilação térmica do 5-HTP. No entanto, a 5-HT presente nos grãos não pode influenciar a concentração de 5-HT cerebral, pois além de não ultrapassar a barreira hemato-encefálica (GOIHL, 2006), a maior parte é metabolizada antes de penetrar na corrente sanguínea (RANG et al., 1995). Por outro lado, a presença de 5-HT nos grãos de café indica a possível presença de seus precursores.

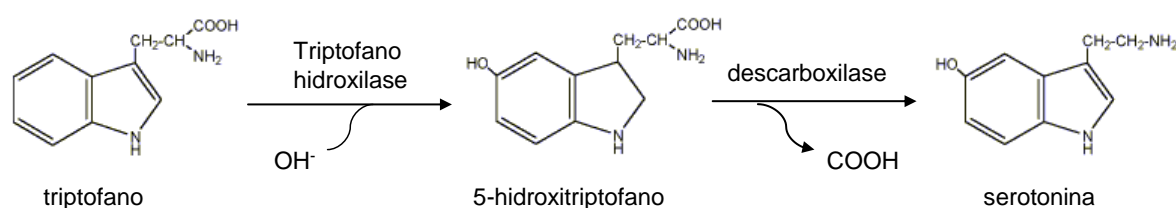


Figura 5 - Via de produção de serotonina.

2.6.2 Triptofano

O triptofano (figura 6) é um aminoácido aromático essencial, tanto para homens como animais, pois não pode ser produzido no organismo, e tem de ser obtido na dieta, sendo recomendados 100 mg/kg de massa corporal por dia (MARKLOVÁ et al., 2000). É também o aminoácido em menor concentração nas proteínas dietéticas: 1% nas proteínas de origem animal e 1,4% nas proteínas de origem vegetal (ROSSI & TIRAPEGUI, 2004).

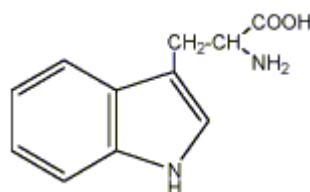


Figura 6 - Estrutura química do triptofano.

Além de ser precursor da 5-HT, o triptofano apresenta outras funções como: contribuição no crescimento normal e síntese protéica, influência no sono, comportamento, fadiga, ingestão alimentar, precursor da vitamina B3 (niacina) e é um dos aminoácidos que estimula a secreção de insulina e hormônio do crescimento (ROSSI & TIRAPEGUI, 2004). O excesso de triptofano dietético, que não é utilizado para a síntese de proteínas, age como um suplemento terapêutico (GOIHL, 2006).

A quantidade de triptofano no plasma influencia a síntese de 5-HT, e, portanto, uma dieta com altos níveis de triptofano aumenta a concentração de 5-HT cerebral. KOOPMANS et al. (2006) observaram que porcos, cuja dieta foi suplementada com 0,5% de triptofano, apresentaram aumento da atividade serotoninérgica hipotalâmica, com conseqüências benéficas no trato gastrointestinal e diminuição do estresse. GOIHL (2006) mostrou que o triptofano também pode diminuir a conduta agressiva, e ADRIEN (2002) observou que, em pacientes depressivos, há uma redução da concentração plasmática de triptofano, e uma diminuição da atividade serotoninérgica no cérebro.

O triptofano é ativamente transportado para o cérebro por um carreador que também transporta outros aminoácidos neutros e ramificados. Os níveis de triptofano no cérebro não são influenciados apenas por sua concentração no plasma, mas também pelas concentrações plasmáticas de outros aminoácidos que competem pelo

carreador cerebral (SUNDERS-BUSH & MAYER, 2001). Na barreira hemato-encefálica o triptofano livre compete com outros cinco aminoácidos neutros (leucina, isoleucina, valina, fenilalanina e tirosina) para seu transporte e síntese de 5-HT cerebral. Entre os aminoácidos competidores, o que possui a menor concentração plasmática é o triptofano (50 mM), sendo estimado que a razão entre triptofano e aminoácidos neutros é de 1:100 (ROSSI & TIRAPEGUI, 2004). Para aumento da síntese de 5-HT cerebral, é necessário um favorecimento da captação cerebral de triptofano livre, em detrimento dos seus competidores aminoácidos neutros. Os processos fisiológicos que provocam aumento desta razão são os que favoreceriam a síntese de 5-HT (ROSSI & TIRAPEGUI, 2005). Como vários aminoácidos neutros são precursores de neurotransmissores, a competição na barreira hemato-encefálica pode ter uma função na regulação da síntese destes (WURTMAN et al., 1981).

A ingestão de carboidrato aumenta o triptofano cerebral. Depois da ingestão de carboidrato a concentração de aminoácidos aromáticos no cérebro aumenta, e a concentração de aminoácidos de cadeia ramificada diminui, pois estes vão para os músculos devido à liberação de insulina (TEFF & YOUNG, 1995; TAKEDA et al., 2004).

Além disso, o alto conteúdo de triptofano não-protéico, mais facilmente absorvido, poderia ter o efeito de aumentar a viabilidade deste aminoácido ao cérebro, influenciando a síntese do neurotransmissor 5-HT (COMAI et al., 2007a). Portanto, a importância de se conhecer o teor de triptofano não-protéico nos alimentos é facilmente compreensível, considerando que o triptofano é um dos aminoácidos limitantes do valor biológico em proteínas vegetais (COMAI et al., 2007b).

O triptofano presente nos alimentos é relativamente estável durante o processamento e estocagem. Apenas tratamentos severos causam uma degradação significativa deste aminoácido, que ocorre essencialmente em função da temperatura e duração dos tratamentos. No entanto, este aminoácido é estável durante o tratamento térmico na ausência de oxigênio. Seu anel indol é suscetível à clivagem oxidativa e substituição por diversos reagentes, principalmente aldeídos e carbocations, mas resíduos de triptofano estão, freqüentemente, localizados no interior das moléculas de proteínas de alimentos, e não são afetados pelos outros componentes (FRIEDMAN & CUQ, 1988).

2.6.3 5-Hidroxitriptofano

O 5-HTP (figura 7) é o precursor imediato na biossíntese de 5-HT a partir do aminoácido triptofano, e por isto é preferido em aplicações terapêuticas. A velocidade de conversão de triptofano a 5-HTP pela enzima triptofano hidroxilase é a etapa limitante na produção de 5-HT, e é influenciada por fatores como deficiência de vitamina B6, estresse e hipomagnesemia. Os níveis de 5-HT no cérebro são correlacionados com a provisão de 5-HTP. Este composto pode ser metabolizado em 5-HT fora do cérebro, mas quando isso acontece, sua contribuição para a 5-HT cerebral é insignificante. Portanto, a atividade fisiológica da 5-HT depende amplamente da síntese da 5-HT no cérebro a partir de 5-HTP (DAS et al., 2004).

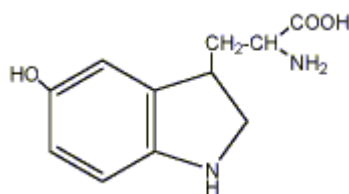


Figura 7 - Estrutura química do 5-HTP.

A administração oral de 5-HTP provoca um aumento significativo da 5-HT cerebral. A absorção intestinal de 5-HTP não requer a presença de transportador e não é afetada pela presença de outros aminoácidos, o que permite que este composto seja ingerido juntamente com as refeições. Ao contrário do triptofano, o 5-HTP não pode ser transformado em niacina ou se tornar parte de proteínas. Cerca de 70% da dose oral de 5-HTP vai para a corrente sanguínea e atravessa facilmente a barreira hemato-encefálica, aumentando efetivamente a síntese de 5-HT no SNC. O transporte deste composto na barreira hemato-encefálica não necessita da presença de um transportador específico, o que é uma vantagem sobre o triptofano que, devido ao tipo de transporte, tem sua passagem para o cérebro prejudicada pela presença de outros aminoácidos neutros (MAGNUSSEN & NIELSEN-KUDSK, 1980; DAS et al., 2004).

O 5-HTP é um suplemento dietético popular que tem substituído o triptofano como um auxiliar no tratamento da depressão, para melhorar os sintomas da fibromialgia, ajudar na perda de peso, diminuir a pressão sanguínea, prevenir dores de cabeça, e ajudar pessoas que sofrem de insônia (BIRDSALL, 1998; DAS et al., 2004).

A substituição do triptofano por 5-HTP como suplemento alimentar tem acontecido desde 1989, quando uma síndrome rara denominada "síndrome de eosinofilia-mialgia" acometeu três pacientes no Novo México, Estados Unidos, que haviam ingerido triptofano sintético de um mesmo fabricante como suplemento alimentar (HERTZMAN et al., 1990). Mais tarde, uma pesquisa feita pela Food and Drug Administration (FDA) nas práticas de fabricação revelaram que o triptofano estava contaminado devido ao uso de menos carvão ativo no procedimento de purificação e devido à utilização de uma nova cepa de bactéria no processo de fermentação. Muita atenção tem sido dada à segurança do 5-HTP por consumidores, indústrias, academias e pelo governo, e não há casos definitivos de toxicidade deste composto em todo o mundo nos últimos 20 anos (DAS et al., 2004).

2.6.4 Métodos de determinação de triptofano

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos para encontrar a melhor forma de determinar triptofano, no sentido de se obter a máxima recuperação e maior seletividade, originando a crescente quantidade de novos procedimentos analíticos desenvolvidos. Os métodos publicados não são somente a respeito da quantificação do triptofano em sua forma livre, mas incluem seus metabólitos e triptofano presente em proteínas e peptídeos, com seus correspondentes métodos de hidrólise (MÓLNAR-PERL, 1997).

A determinação de triptofano apresenta vários problemas analíticos devido a sua natureza lábil na presença de luz, íons hidrogênio, e oxigênio, e, portanto, os hidrolizados de proteína devem ser analisados imediatamente após a preparação (FRIEDMAN & CUQ, 1988).

SERVILLO et al. (1982) investigaram diretamente o hidrolisado ou a proteína intacta para determinação de triptofano, utilizando o processo de espectrofotometria de derivada segunda. Há outras variações dos métodos de quantificação de triptofano na proteína intacta, como o método espectrofotométrico desenvolvido por SASTRY & TUMMURU (1985), em que 5-hidroximetilfurfural, formado a partir de glicose em condições ácidas, condensa com ácido tioglicólico, que, em presença de triptofano, produz um complexo de coloração rósea.

Entretanto, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o método mais utilizado para a determinação de triptofano, tanto protéico quanto não-protéico. Há

diversas variações nos métodos cromatográficos utilizados, mas, em geral, as etapas mostradas na figura 8 são as mais comumente utilizadas na análise de triptofano.

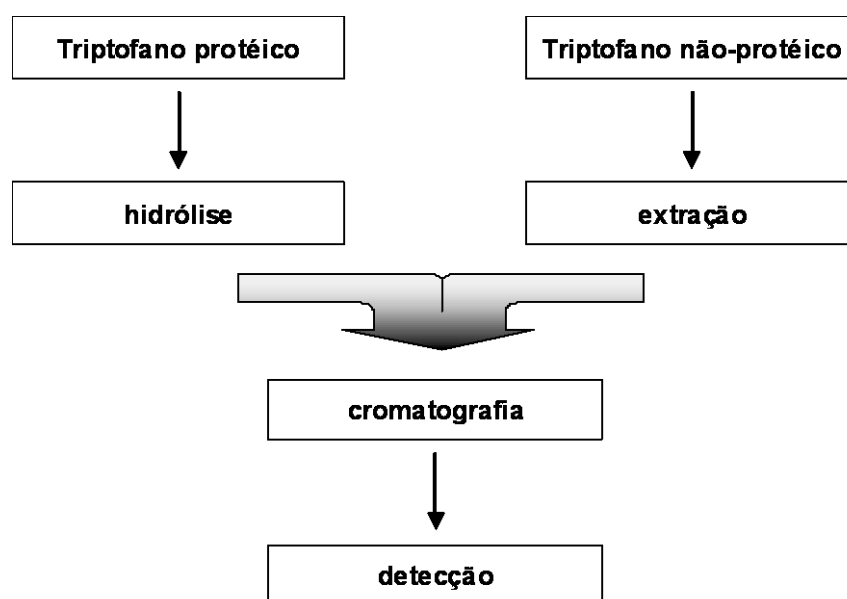


Figura 8 - Fluxograma das etapas para a determinação cromatográfica de triptofano.

O triptofano, ao contrário dos outros aminoácidos, não pode ser submetido à hidrólise ácida com HCl 6 mol/L, pois é destruído por oxidação. Este aminoácido tem de ser analisado separadamente ou usando-se processos de hidrólise modificados, que mantenham sua estabilidade (RAVINDRAN & BRYDEN, 2005). Pode-se utilizar HCl juntamente com aditivos como triptamina (FÁBIAN et al., 1990) e β -mercaptoetanol (NG et al., 1987), que estabilizam o triptofano e diminuem consideravelmente sua degradação durante esta etapa. A hidrólise de proteínas para a análise de triptofano também pode também ser realizada com enzimas, como pronase, proteinase K e carboxipeptidase ou com um coquetel de enzimas (KLEEBERG et al., 2000).

No entanto, a forma mais utilizada para hidrolisar proteínas para a determinação de triptofano é com agentes básicos. Neste caso, a hidrólise de proteínas pode ser feita com NaOH (YUST et al., 2004; RAVINDRAN & BRYDEN, 2005; DELGADO-ANDRADE et al., 2006), LiOH ou $Ba(OH)_2$ (DELHAYNE & LANDRY, 1986; ILEV & TCHORBANOV, 1992; ALEGRÍA et al., 1996; COMAI et al., 2007a; COMAI et al., 2007b). Segundo RAVINDRAN & BRYDEN (2005), o uso de NaOH parece oferecer vantagens sobre o uso de $Ba(OH)_2$ ou LiOH, já que neste caso problemas de

precipitação ou adsorção associados com $\text{Ba}(\text{OH})_2$ e problemas de solubilidade associados com LiOH não ocorrem.

O triptofano não-protéico presente na amostra, ou seja, aquele que não faz parte da estrutura protéica, deve ser extraído para a determinação cromatográfica. Para este fim alguns métodos utilizados são: extração em fase sólida (MATTIVI et al., 1999; MARKLOVÁ et al., 2000), extração com água e tampão (COMAI et al., 2007a; COMAI et al., 2007b), e extração em condições moderadamente ácidas com HCl 0,1 mol/L (PORTUGAL, 2001).

A separação do triptofano é comumente realizada por CLAE de fase reversa (ALEGRÍA et al., 1996; MATTIVI et al., 1999; KLEEBERG et al., 2000; MARKLOVÁ et al., 2000; PRESITS & MÓLNAR-PERL, 2003; YUST et al., 2004; HECHT et al., 2005; DELGADO-ANDRADE et al., 2006). São também utilizadas a cromatografia de troca iônica (RAVINDRAN & BRYDEN, 2005), a cromatografia gasosa (FÁBIAN et al., 1990) e a cromatografia de filtração gélida (ILEV & TCHORBANOV, 1992). Porém, poucos pesquisadores utilizam as vantagens de alta sensibilidade e seletividade da cromatografia gasosa, devido às dificuldades em seu procedimento (MÓLNAR-PERL, 1997).

As formas de detecção de triptofano mais utilizadas são através da absorção na região ultravioleta (DELHAYNE & LANDRY, 1986; ILEV & TCHORBANOV, 1992; ALEGRÍA et al., 1996; MARKLOVÁ et al., 2000; YUST et al., 2004; HECHT et al., 2005) ou da emissão de fluorescência (CHAN et al., 1995; MATTIVI et al., 1999; PORTUGAL, 2001; PRESITS & MÓLNAR-PERL, 2003; RAVINDRAN & BRYDEN, 2005; DELGADO-ANDRADE et al., 2006; COMAI et al., 2007a; COMAI et al., 2007b), porque este composto já apresenta estas propriedades, devido ao anel aromático presente em sua estrutura. Na maioria dos casos a detecção por fluorescência é preferida devido à maior sensibilidade em relação à absorção de luz ultravioleta.

A derivação do triptofano pode ser vantajosa se o método puder ser realizado de forma simples, em meio aquoso e em temperatura ambiente, pois aumenta a sensibilidade e seletividade da análise (PRESITS & MÓLNAR-PERL, 2003). A reação de derivação é realizada após a hidrólise da proteína ou extração do triptofano e pode ser feita pré ou pós-coluna, utilizando-se compostos como fenilisotiocianato (ALEGRÍA et al., 1996), *o*-fataldialdeído (PRESITS & MÓLNAR-PERL, 2003; RAVINDRAN & BRYDEN, 2005), *p*-dimetilaminobenzaldeído, *p*-fenilenediamina (NAGAJARA et al., 2003) e ninidrina (PINTER-SZAKACS & MOLNAR-PERL, 1990).

2.6.5 Métodos de determinação de 5-HTP

O 5-HTP é freqüentemente investigado em fluidos biológicos como urina, sangue e fluido cérebro-espinhal, para a verificação de condições fisiopatológicas associadas à síntese de 5-HT. Atualmente têm sido desenvolvidos também diversos trabalhos para a determinação de 5-HTP em extratos de semente de *Griffonia simplicifolia*, fonte natural deste composto.

As etapas para determinação de 5-HTP são apresentadas na figura 9. A extração de 5-HTP é comumente realizada pelo método líquido-líquido, utilizando-se acetonitrila ou metanol aquosos (LEMAIRE & ADOSRAKU, 2002; TAKAGAI & IGARASHI, 2003; KOPPISETTI et al., 2005). KUMAR et al. (1999) utilizaram para este fim sulfato de zinco 20% e NaOH 10%. Alguns autores também relataram a extração deste composto por meio de cromatografia de troca catiônica (ARNERI et al., 1981; KILTS & BERO, 1984).

A separação do 5-HTP pode ser realizada por métodos como eletroforese capilar (TAKAGAI & IGARASHI, 2003; WISE & SHEAR, 2006), cromatografia em camada delgada (APONTE et al., 1996) e cromatografia de troca iônica (DREUX & BOUSQUET, 1975). No entanto, o método mais utilizado para separação deste composto é a CLAE de fase reversa (ARNERI et al., 1981; KILTS & BERO, 1984; ISHIDA et al., 1993; KUMAR et al., 1999; YI et al., 1999; LEMAIRES & ADOSRAKU, 2002; FUJINO et al., 2003; PRESITS & MOLNÁR-PERL, 2003; BABU et al., 2005; KOPPISETTI et al., 2005).

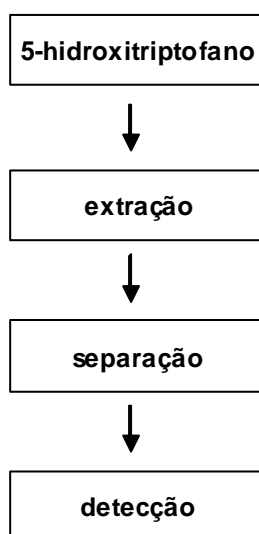


Figura 9 - Fluxograma das etapas para a determinação cromatográfica de 5-HTP.

O 5-HTP é freqüentemente detectado por absorção no ultravioleta (LEMAIRE & ADOSRAKU, 2002; TAKAGAI & IGARASHI, 2003; BABU et al., 2005) ou emissão de fluorescência (APONTE et al., 1996; WISE & SHEAR, 2006), devido às propriedades químicas inerentes a este composto. A derivação é um método que permite a diminuição do limite de detecção, e pode ser realizada antes ou depois da separação pela reação do 5-HTP com compostos como *o*-ftaldialdeído (DREUX & BOUSQUET, 1975) ou *o*-ftaldialdeído e ácido 3-mercaptopropiônico (PRESITS & MOLNÁR-PERL, 2003), benzilamina e hexacianoferrato de potássio (ISHIDA et al., 1993), ou benzilamina e 1,2-difeniletilenodiamina (FUJINO et al., 2003). O 5-HTP também já foi detectado em alguns trabalhos pelo método eletroquímico (ARNERIC et al., 1981; KILTS & BERO, 1984; KUMAR et al., 1999; YI et al., 1999) ou por espectrometria de massa (KOPPISETTI et al., 2005).

2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação consiste de uma minuciosa avaliação à qual se submete um método analítico, para garantir que este gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra (RIBANI et al., 2004). Segundo a ANVISA (2003), a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Os parâmetros para validação de métodos analíticos têm sido definidos em grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais, sendo diferentes entre as diversas organizações. Não há um procedimento normalizado que estabeleça como executar a validação de métodos instrumentais de separação (RIBANI et al., 2004). Embora não haja um consenso sobre quais parâmetros devam ser incluídos em um processo de validação de um método analítico, segundo LANÇAS (2004), os seguintes normalmente fazem parte da maioria dos processos de validação: seletividade, exatidão e precisão, linearidade e faixa de trabalho, limite de detecção e quantificação, sensibilidade e especificidade, robustez, estabilidade e conformidade do sistema. Para JENKE (1996), as figuras de mérito mais freqüentes em publicações relacionadas à validação de métodos são exatidão e precisão, seguidas de especificidade ou seletividade, linearidade, limite de detecção, robustez e sensibilidade. Segundo este mesmo autor, a exclusão da exatidão e da precisão num processo de validação implicaria na necessidade de justificativas pertinentes, enquanto a exclusão de figuras

de mérito menos freqüentes seria menos controversa. SOUZA & BRITO (2002) ressaltaram a importância de que a seleção das figuras de mérito para um determinado protocolo esteja relacionada com os objetivos da validação.

A estratégia de validação deve se preocupar com todas as etapas, desde a coleta e a preservação das amostras até a emissão do resultado final, passando pela documentação dos resultados obtidos em cada etapa (SOUZA et al., 2001).

As figuras de mérito mais comumente utilizadas em validação de métodos analíticos estão definidas a seguir:

Seletividade. Corresponde à capacidade de um método em determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias susceptíveis de interferirem na determinação (LANÇAS, 2004). Um método seletivo produz resposta para vários analitos que podem se distinguir entre si. Para garantir a seletividade do método, deve-se avaliar se o sinal emitido pelo equipamento é devido exclusivamente ao analito ou resulta da soma das contribuições de múltiplos componentes.

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método (RIBANI et al., 2004).

Limite de detecção. É a menor concentração de um analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato (LANÇAS, 2004).

O limite de detecção pode ser obtido por vários procedimentos, dentre os quais, por avaliação visual (diminuindo sucessivamente a concentração do analito). Somente para os métodos que apresentam ruído na linha de base, o limite de detecção corresponderá à concentração ou à massa do analito capaz de produzir um sinal com relação sinal/ruído de 3:1 ou 2:1.

Limite de quantificação. É a menor concentração do analito na matriz avaliada que pode ser determinada em níveis aceitáveis de exatidão e precisão (EURACHEM, 1998).

Linearidade e faixa de trabalho. A faixa de trabalho é o intervalo de concentrações dos padrões onde os requisitos de linearidade são satisfeitos. O limite inferior da faixa de trabalho deve coincidir com o limite de quantificação.

Pode-se confirmar a linearidade e determinar a faixa de trabalho construindo-se curvas de calibração, da concentração do analito em função da resposta obtida no sistema de detecção, com replicatas em torno da concentração esperada do analito (SOUZA & BRITO, 2002).

Exatidão. É o grau de aproximação entre a média de um conjunto de resultados obtidos experimentalmente e o valor verdadeiro ou reconhecido como tal. A exatidão indica a diferença entre o valor obtido e o valor real do analito na matriz, sendo geralmente expressa em termos de tendência (bias), ou seja, o desvio (positivo ou negativo) da média do valor obtido em relação ao valor real (EURACHEM, 1998).

Uma forma de se avaliar a exatidão é por meio de ensaios de recuperação, que se trata da proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na amostra, que é extraída e passível de ser quantificada. A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, e estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis traços (RIBANI et al., 2004).

Precisão. É o grau de dispersão dos resultados, obtidos sob condições especificadas, em torno do valor médio. A precisão pode ser avaliada em condições de repetibilidade, sendo expressa em termos de coeficiente de variação ou desvio padrão relativo (SOUZA & BRITO, 2002).

A repetibilidade é o grau de concordância entre os resultados obtidos pela aplicação de um mesmo procedimento analítico sob as mesmas condições de medida, em intervalos curtos de tempo. Se a mesma amostra é analisada por laboratórios diferentes, a medida de precisão recebe o nome de reprodutibilidade (EURACHEM, 1998). Experimentalmente, as medidas de precisão podem ser obtidas realizando-se um mínimo de 10 determinações em concentrações diferentes (EURACHEM, 1998) ou um mínimo de 9 determinações (3 concentrações com 3 replicatas) independentes (ICH, 1996).

Sensibilidade. É a capacidade de um método distinguir, alterando a resposta de medida do experimento, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas (EURACHEM, 1998).

A sensibilidade do método não pode ser confundida com o limite de detecção. A sensibilidade representa a capacidade de discriminação entre amostras de teores de analito próximos.

Robustez. É a capacidade de permanência de resultados diante de pequenas variações em parâmetros operacionais e ambientais (EURACHEM, 1998).

Ao longo do uso rotineiro, variações nas condições de aplicação do método analítico podem ocorrer (pH, temperatura, fluxo de gases, fluxo de fase móvel, estabilidade das soluções analíticas, etc) e afetar seu desempenho. Em especial, algumas etapas do método são determinantes para o seu bom funcionamento. Durante o processo de validação, essas etapas devem ser investigadas e seu efeito sobre o desempenho global do método deve ser avaliado usando testes de robustez.

Conformidade do sistema. É a verificação do sistema para garantir seu desempenho analítico antes e durante as análises. Baseia-se no conceito de que o equipamento, eletrônica, operações analíticas e amostras a serem analisadas constituem um sistema integral, que deve ser avaliado como tal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Amostras

Os grãos de café das espécies *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre variedade robusta foram fornecidos pela Incofex Armazéns Gerais LTDA, sediada no município de Viçosa, MG. Os grãos de *Coffea arabica* (Catuaí amarelo, bebida dura, safra 2007/2008) foram provenientes de Viçosa, MG, e os grãos de *Coffea canephora* variedade robusta (bebida limpa, safra 2006/2007) provenientes de Lajinha, MG. Amostras de três lotes diferentes de cada espécie foram recolhidas. Estas diferentes espécies estão descritas neste trabalho como café arábica e café robusta, respectivamente.

3.1.2 Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados foram de grau analítico, exceto os solventes utilizados para a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acetonitrila e metanol, que eram de grau cromatográfico. A água ultra pura foi obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). Os padrões de triptofano e 5-hidroxitriptofano foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Desenvolvimento e validação de metodologia por CLAE-par iônico para determinação simultânea de triptofano e 5-HTP

Uma metodologia por CLAE-par iônico foi desenvolvida para a determinação simultânea de triptofano e 5-HTP em café. Inicialmente, testes foram realizados para

otimizar as condições operacionais, o gradiente de eluição, e o tempo de duração da análise.

Em seguida, diferentes métodos foram comparados quanto à eficiência em promover a extração simultânea de triptofano não-protéico e 5-HTP da matriz de café, e o método de extração mais eficiente passou por etapas de otimização.

Após a seleção e otimização do método selecionado para extração do triptofano e do 5-HTP, foi realizada a validação, com avaliação de seletividade, limite de detecção do equipamento, linearidade, limite de quantificação, exatidão e precisão e estudo da estabilidade das soluções-padrão.

3.2.1.1 Definição das condições de trabalho para a separação de triptofano e 5-HTP por CLAE

As condições de trabalho para a ótima resolução dos picos de triptofano e 5-HTP foram testadas com soluções padrão quanto à forma de eluição e ao tempo de duração da análise. Com referência no método de CIRILO et al. (2003) para aminas, foram utilizados coluna C18 em fase reversa, fase móvel constituída de: A – tampão acetato 0,2 mol/L contendo octanosulfonato de sódio 15 mmol/L e pH 4,9 e B – acetonitrila, e sistema de derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído, sendo os compostos quantificados fluorimetricamente com 340 e 445 nm de excitação e emissão, respectivamente.

Foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência da Shimadzu (Kyoto, Japão) composto por três bombas modelo LC-10 AD e LC-10 ADVP, com injetor automático modelo SIL-10 ADVP, detector espectrofluorimétrico modelo RF-10AXL a 340 de excitação e 445 de emissão, e uma unidade de controle CBM-20 A conectada a um microcomputador.

3.2.1.2 Comparação de métodos de extração simultânea de triptofano não-protéico e 5-HTP

Métodos de extração foram comparados quanto à eficiência de recuperação de triptofano e 5-HTP, utilizando-se amostras de café fortificadas com quantidades conhecidas destes. Foram investigadas as extrações com água e tampão fosfato de potássio 0,1mol/L(COMAI et al., 2006), acetonitrila a 7% (KOPPISETTI et al., 2005), metanol a 50% (LEMAIRE & ADOSRAKU, 2002) e HCl 0,1mol/L (PORTUGAL, 2001).

Foram utilizadas amostras de café fortificadas com duas concentrações distintas de triptofano e 5-HTP (adições de 800 µg e 2 mg dos padrões). A eficiência dos procedimentos de extração foi determinada em cinco repetições.

3.2.1.3 Otimização do método de extração

O método de extração simultânea com metanol a 50% (LEMAIRE & ADOSRAKU, 2002), que mostrou maior eficiência em extrair triptofano não-protéico e 5-HTP das amostras de café, foi otimizado em duas etapas, descritas a seguir. Nestas etapas foram avaliadas modificações no método que poderiam melhorar sua eficiência na extração dos compostos de interesse.

a) Influência do tempo de agitação

Diferentes tempos de agitação (10 e 30 minutos), nas etapas de remoção da fase lipídica e de extração de triptofano não-protéico e 5-HTP segundo método adaptado de LEMAIRES & ADOSRAKU (2002), foram comparados quanto a sua eficiência na extração de triptofano não-protéico e de 5-HTP das amostras de café. As amostras foram, inicialmente, fortificadas com 100 µg dos padrões. As análises foram realizadas em triplicata.

b) Influência do número de etapas sucessivas

O método com três etapas de extração foi comparado com o método com duas etapas, adaptados de LEMAIRES & ADOSRAKU (2002), quanto a sua eficiência em extrair triptofano não-protéico e 5-HTP das amostras de café. No método com três etapas de extração utilizou-se 15 mL, e no método com duas etapas foram utilizados 20 mL de metanol a 50% em cada etapa. As amostras foram inicialmente fortificadas com 100 µg dos padrões. As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.1.4 Procedimentos de validação

Seletividade. Extratos de café foram fortificados com padrões de triptofano e 5-HTP em duplicata para investigar a interferência da matriz. Os cromatogramas foram avaliados quanto à presença de compostos interferentes, resolução do pico e concordância nos tempos de retenção dos compostos nas soluções padrão e nas amostras adicionadas.

Seletividade. Extratos de café foram fortificados com padrões de triptofano e 5-HTP em duplicata para investigar a interferência da matriz. Os cromatogramas foram avaliados quanto à presença de compostos interferentes, resolução do pico e concordância nos tempos de retenção dos compostos nas soluções padrão e nas amostras adicionadas.

Limite de detecção do equipamento. Soluções padrão foram analisadas em concentrações decrescentes. O limite de detecção foi a menor concentração dos compostos que mostrou resposta pelo menos três vezes o nível de ruído da linha de base (EURACHEM, 1998).

Limite de detecção do método. Foram analisadas amostras de café adicionadas de padrão em concentrações cada vez menores. O limite de detecção do método foi a menor concentração capaz de gerar um pico pelo menos três vezes maior que o sinal obtido para o ruído, mesmo que não tenham sido obtidos os valores percentuais de recuperação e coeficiente de variação descritos como aceitáveis pelo CODEX (1993). Estes valores são de 80 a 110% e 15%, respectivamente, para analitos em níveis maiores que 0,01 mg/100 g.

Limite de quantificação do método. Foram analisadas amostras de café adicionadas de padrão em concentrações cada vez menores, sendo o limite de quantificação considerado como a menor concentração em que o triptofano e o 5-HTP foram detectados pelo equipamento em valores percentuais de recuperação e coeficientes de variação descritos como aceitáveis pelo CODEX (1993). O limite de quantificação do método foi determinado em 10 repetições.

Linearidade. A linearidade da resposta do detector ao triptofano e ao 5-HTP foi verificada pela realização da análise da regressão linear utilizando-se o método estatístico de Quadrados Mínimos. Um mínimo de seis concentrações (0,3; 5; 10; 20; 30 e 40 µg/mL) de soluções padrão de triptofano e 5-HTP foram analisadas em triplicata. Em seguida, foram construídos os gráficos (área do pico x concentração) e, por regressão linear, foram determinados as equações das curvas analíticas e seus coeficientes de correlação. As curvas foram feitas em três dias diferentes.

Exatidão e precisão. A exatidão e precisão do método foram calculadas através da recuperação média (exatidão) e coeficientes de variação (precisão) das amostras (matriz) adicionadas de concentrações conhecidas do padrão. Foram analisadas amostras adicionadas de três concentrações diferentes em triplicata. O critério estabelecido pelo CODEX (1993) foi utilizado para avaliar a recuperação e o coeficiente de variação.

Estabilidade das soluções padrão. Soluções padrão de triptofano e 5-HTP de concentração 5 µg/mL foram analisadas durante um mês em intervalos eqüidistantes para que fossem avaliadas suas estabilidades neste período.

3.2.2 Estudo comparativo dos teores de triptofano protéico e não-protéico e de 5-HTP em grãos de café cru arábica e robusta

Foram utilizadas amostras de cafés crus arábica e robusta, fornecidas pela Incofex Armazéns Gerais LTDA, sediada no município de Viçosa-MG. As amostras foram posteriormente moídas para granulometria inferior a 20 mesh em mixer (modelo MAGC, Arno, São Paulo, SP, Brasil) e armazenadas em recipientes plásticos sob atmosfera de nitrogênio a 6 °C, protegidas da luz para minimizar a oxidação do triptofano.

A umidade das amostras foi determinada por secagem em estufa em 102 ± 2 °C até peso constante (CASAL et al., 2005), e também foi analisado o teor de proteína total utilizando o método de Micro-Kjeldahl (AOAC, 1995).

Para determinação do triptofano total foi realizada a hidrólise alcalina da amostra, segundo o método da AOAC (1995), e posterior análise deste composto pela metodologia por CLAE-par iônico, previamente otimizada e validada neste trabalho. A exatidão e a precisão deste método de análise foram avaliadas utilizando-se amostras adicionadas de solução padrão de triptofano.

A determinação simultânea de triptofano não-protéico e 5-HTP foi realizada por meio das etapas de extração destes compostos das amostras com metanol a 50% (LEMAIRE & ADOSRAKU, 2002, adaptado) e separação por CLAE-par iônico. Os teores de triptofano protéico foram determinados por diferença entre os teores de triptofano total e de não-protéico. As análises foram feitas em triplicata, e posteriormente foram realizadas as análises estatísticas.

3.2.3 Estudo do efeito de níveis de torração nos teores de triptofano protéico e não-protéico e 5-HTP em grãos de café

Amostras de cafés crus arábica e robusta foram torradas em três níveis, correspondentes às torrações clara, média e escura, utilizando-se torrador comercial com corrente de ar (i-Roast 2, modelo 40001, Hearthware, Gurnee, IL, EUA), em três repetições feitas em dias consecutivos. As amostras foram, posteriormente, moídas para granulometria inferior a 20 mesh em mixer (modelo MAGC, Arno, São Paulo, SP, Brasil), e armazenadas em recipientes plásticos sob atmosfera de nitrogênio a 6 °C, protegidas da luz para minimizar a oxidação do triptofano.

As amostras de café foram caracterizadas quanto a sua cor pelo sistema CIE L*a*b* e perda de peso durante a torração. A umidade foi determinada por secagem em estufa em 102 ± 2 °C até peso constante (CASAL et al., 2005), e o teor de proteína total das amostras analisado segundo o método da AOAC (1995).

Foram realizadas determinações de triptofano total (AOAC, 1995), triptofano não-protéico e 5-HTP (LEMAIRE & ADOSRAKU, 2002, adaptado), e os teores de triptofano protéico foram determinados por diferença entre os teores de triptofano total e de não-protéico. As análises foram feitas em triplicata.

3.2.4 Estudo comparativo dos teores de triptofano protéico e não-protéico e 5-hidroxitriptofano na bebida café arábica e robusta

Para preparo das bebidas foram utilizados 20 g café em pó com torração média (171 °C, 15 minutos) e granulometria inferior a 20 mesh, e 150 mL de água deionizada. O café foi adicionado à água, previamente aquecida a 90 °C em agitador magnético com aquecimento (modelo TE-085, Tecnal, São Paulo, SP, Brasil), e submetido à agitação por 3 minutos. Posteriormente, a água adicionada do café foi passada por filtro de papel (n° 102, Melitta, São Paulo, SP, Brasil) e a infusão recolhida em recipiente escuro, imediatamente resfriada em banho de gelo, e armazenada a -23 °C até o momento da análise.

As bebidas foram caracterizadas quanto ao teor de sólidos totais, à concentração e à porcentagem de extração, por secagem em estufa em 102 ± 2 °C até peso constante (LÓPEZ-GALILEA et al., 2007). O teor de nitrogênio total foi determinado nas bebidas segundo o método da AOAC (1995).

Para a determinação do triptofano total, as amostras foram previamente liofilizadas em liofilizador de bancada (Freeze Dry System/Freezone® 4,5, modelo 77500, Kansas, USA) e hidrolisadas segundo o método da AOAC (1995). As análises de triptofano não-protéico e 5-HTP foram realizadas por injeção das amostras no CLAE após filtração com membrana tipo HAWP (Millipore Corp. Milford, MA, EUA), e os teores de triptofano protéico foram determinados por diferença entre os teores de triptofano total e triptofano não-protéico. As análises foram feitas em triplicata, e posteriormente foram realizadas as análises estatísticas.

3.3 METODOS DE ANÁLISE

3.3.1 Preparo das soluções padrão

Os padrões foram pesados em balança analítica e as soluções foram preparadas nas concentrações adequadas com solução de metanol a 50%. Posteriormente, foram armazenadas em recipientes plásticos escuros sob atmosfera de nitrogênio a -23 °C.

3.3.2 Ensaios de torração

Amostras de 120 gramas de café cru, provenientes dos três lotes, na proporção 1:1:1, foram submetidas à torração a 171 °C por 8 minutos para torra clara, 171 °C por 15 minutos para torra média e 210 °C por 15 minutos para torra escura, utilizando-se torrador comercial com corrente de ar (i-Roast 2, modelo 40001, Hearthware, Gurnee, IL, EUA). As amostras recém obtidas foram resfriadas em dessecador até atingirem a temperatura ambiente, e, posteriormente foram armazenadas em recipientes plásticos sob atmosfera de nitrogênio a 6 °C, protegidas da luz para minimizar a oxidação do triptofano.

3.3.3 Caracterização da cor

A cor do café torrado e moído foi determinada em triplicata usando-se um colorímetro (ColorTec PCM, Pittsford, EUA). O instrumento foi calibrado contra um branco antes das leituras. A cor foi expressa em parâmetros da escala CIE

("Commision Internationale de Eclairage") L^* , a^* , b^* . A partir destes dados, foram calculados a saturação [$C^*ab=(a^*2+b^*2)1/2$] e tonalidade [$h=\tan^{-1} b^*/a^*$].

3.3.4 Extração simultânea de triptofano não-protéico e 5-HTP

Quatro diferentes procedimentos para extração simultânea de triptofano não-protéico e 5-HTP de amostras de café foram realizados: (1) com água e tampão fosfato de potássio 0,1 M; (2) com acetonitrila a 7%; (3) com metanol a 50%; e (4) com HCl 0,1 mol/L. Antes de cada processo de extração as amostras foram desengorduradas segundo metodologia de COMAI et al. (2007a). Para tal, uma amostra de 5 g de café foi desengordurada por suspensão em 10 mL (para café cru) ou 20 mL (para café torrado) de acetona e agitada por 30 min em mesa agitadora (modelo TE-140, Tecnal) em temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada (modelo CR 3i, Jouan, St-Herblain, França) a 8422 x g por 10 min a 0 °C e a camada orgânica foi removida. Este procedimento foi repetido com o sedimento.

Extração com água e tampão fosfato de potássio 0,1 M

Água e tampão fosfato de potássio 0,1 mol/L foram utilizados como extratores, segundo COMAI et al. (2007a). Ao sedimento foram adicionados 10 mL de água destilada e, a seguir, foi feita a agitação em mesa agitadora (modelo TE-140, Tecnal, Piracicaba, SP), por 30 min em temperatura ambiente. Então, foi centrifugado (centrífuga refrigerada, modelo CR 3i, Jouan St-Herblain, França) a 8422 x g por 10 min a 0 °C, e o sobrenadante, contendo o triptofano livre, o triptofano ligado a proteínas solúveis em água, e o 5-HTP foi coletado. Esta operação foi repetida e os sobrenadantes foram combinados. O sedimento, obtido depois da extração com água, foi suspenso em 10 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 mol/L pH 8,9, agitado por 30 min e, depois, centrifugado. As duas extrações foram combinadas e filtradas em papel de filtro n. 1.

Extração com acetonitrila a 7%

Ao sedimento foram adicionados 20 mL de acetonitrila a 7% em água (KOPPISETTI et al., 2005), e este foi agitado por 30 minutos em temperatura ambiente, e centrifugado por 10 min a 8422 x g a 0 °C. O sobrenadante foi recolhido, e este procedimento foi repetido com o sedimento. As duas extrações foram combinadas e filtradas em papel de filtro n. 1.

Extração com metanol a 50%

Ao sedimento foram adicionados 20 mL de metanol a 50% em água (LEMAIRE & ADOSRAKU, 2002), agitado por 30 min em temperatura ambiente, e centrifugado por 10 min a 8422 x *g* a 0 °C. O sobrenadante foi recolhido, e este procedimento foi repetido com o sedimento. As duas extrações foram filtradas em papel de filtro n. 1 e combinadas.

Extração com HCl 0,1 mol/L

Para a realização desta extração foi utilizado o método de PORTUGAL (2001). Ao sedimento foram adicionados 20 mL de HCl 0,1 mol/L em água, agitado por 30 min em temperatura ambiente, e centrifugado por 10 min a 8422 x *g* a 0 °C. O sobrenadante foi recolhido, e este procedimento foi repetido com o sedimento. Os sobrenadantes combinados foram filtrados em papel de filtro n. 1 e combinados. Foram pipetados 10 mL do filtrado, adicionados 5 mL de ácido ortofosfórico 0,5 mol/L, NaOH 1,0 mol/L até pH 3 e 10 mL de metanol. Posteriormente, esta solução foi transferida para balão volumétrico de 50 mL e completada com água destilada.

Os extratos foram, posteriormente, armazenados em recipientes plásticos escuros sob atmosfera de nitrogênio a -23 °C.

3.3.5 Hidrólise alcalina para obtenção de triptofano protéico

A hidrólise para obtenção do triptofano total das amostras de café foi realizada segundo o método da AOAC (1995), utilizando vidraria modificada. Uma amostra finamente moída de 30 mg de café foi desengordurada por suspensão em 10 mL de éter de petróleo, e agitada por 20 min em temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 8422 x *g* por 10 min a 0 °C, e a camada orgânica foi removida. Para a análise da bebida de café, 10 mL de amostra foram previamente liofilizados em liofilizador de bancada (Freeze Dry System/Freezone® 4,5, modelo 77500, Kansas, EUA) e não passaram pela etapa de remoção de lipídios. Posteriormente, foram adicionados 4 mL de NaOH 4,2 N e, em seguida, transferiu-se para tubo de hidrólise, lavando-se o tubo de centrífuga com mais duas porções de 2 mL de NaOH 4,2 N. Para a bebida café, 8 mL de NaOH 4,2 N foram diretamente adicionados ao tubo em que a amostra foi liofilizada. Foram adicionadas três gotas de 1-octanol e fez-se vácuo nos tubos utilizando-se bomba de vácuo (Edwards, modelo E2M18, São Paulo, BRASIL). Em seguida as amostras foram deixadas em estufa a 110 °C por 20 h. Depois de

resfriarem a temperatura ambiente, os tubos tiveram a tampa e a boca lavados com 1 mL de tampão citrato de sódio 0,2 N pH 4,25 transferindo para um béquer. O hidrolisado foi, então, transferido para o béquer, lavando-se o tubo de hidrólise com mais duas porções de 2 mL do tampão citrato de sódio. O pH da solução foi ajustado para 4,25 com HCl concentrado, e esta foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com água destilada. Em seguida, a solução foi centrifugada por 15 min em 8422 x g, e o sobrenadante foi filtrado em filtro n. 1. Os hidrolisados foram posteriormente armazenados em recipientes plásticos escuros, sob atmosfera de nitrogênio a -23 °C.

3.3.6 Separação e determinação de triptofano e 5-HTP por CLAE-par iônico

A metodologia utilizada tem como referência o trabalho de CIRILO et al. (2003) para aminas. Os extratos ou hidrolisados foram filtrados em membrana tipo HAWP, com 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho de poro (Millipore Corp. Milford, MA, EUA) e injetados em cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, modelo LC-10 AD (Kyoto, Japão), com câmara de mistura a baixa pressão; conjunto de lavagem automática de pistão; injetor automático Shimadzu modelo SIL-10 ADVP; detector espectrofluorométrico modelo RF-10 AXL (Shimadzu, Kyoto, Japão); e uma unidade de controle CBM-20 A conectada a um computador. O sistema de derivação pós-coluna foi montado com uma câmara de mistura (volume morto igual a zero), instalada entre a saída da coluna e o detector; um tubo de teflon (sob o abrigo da luz) de 2 mm de comprimento e 0,25 mm de diâmetro conectado entre a câmara de mistura e o detector e a bomba LC-10 AD (Shimadzu, Kyoto, Japão).

Os compostos foram separados por CLAE de fase reversa-par iônico e quantificadas fluorimetricamente a 340 e 445 nm de excitação e emissão, respectivamente, após derivação pós-coluna com *o*-oftalaldeído, conforme descrito adiante.

Foi utilizada coluna µBondapak C18 em fase reversa de 3,9 x 300 mm, 10 µm, pré-coluna µBondapak C18 (Waters, Milford, MA, EUA) e sistema gradiente de eluição em ambiente com temperatura controlada (21 ± 1 °C). A fase móvel utilizada foi constituída de dois solventes: A – tampão acetato 0,2 mol/L contendo octanosulfonato de sódio 15 mmol/L e pH ajustado para 4,9 com ácido acético e B – acetonitrila. As

fases móveis foram filtradas em membranas (47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho de poro) tipo HAWP para solvente aquoso (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). O fluxo utilizado foi de 0,8 mL/min com gradiente de eluição.

A solução derivante foi preparada dissolvendo-se 25 g de ácido bórico e 22 g de hidróxido de potássio em 500 mL de água ultra-pura, pH ajustado para 10,5 com hidróxido de potássio. A esta solução foram adicionados 0,2 g de *o*-ftalaldeído (Sigma, St Louis, MO, EUA) dissolvido em 3 mL de metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha), 1,5 mL de Brij-35 e 1,5 mL de mercaptoetanol (Merck, Darmstadt, Alemanha). A solução derivante foi preparada diariamente, mantida sob abrigo da luz e bombeada à câmara de mistura a um fluxo de 0,4 mL/min.

Este método foi capaz de detectar e quantificar o triptofano e o 5-HTP, por meio da comparação dos tempos de retenção entre os padrões e as amostras, e confirmada pela adição de solução padrão contendo o composto suspeito à amostra. O conteúdo de cada composto foi calculado por interpolação em curva analítica.

3.3.7 Determinação dos compostos nitrogenados

Os teores de compostos nitrogenados e o teor de proteínas totais foram determinados pelo método Micro-Kjeldahl descrito pela AOAC (1995). Foram utilizadas amostras de 0,25 g de café ou de 20 mL da bebida café previamente concentrada em estufa a 110 °C por 10 horas. As amostras foram submetidas à digestão com 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, juntamente com 0,3 g de mistura catalítica constituída por sulfato de potássio, óxido de selênio, e sulfato de cobre triturados na proporção de 10:1:1, a uma temperatura de 350 °C. A completa digestão foi assegurada após 30 min da obtenção de um líquido claro e transparente de tonalidade azul-esverdeada.

A etapa de destilação foi realizada em aparelho Kjeldahl. O produto da digestão foi quantitativamente transferido para o tubo de destilação, com o auxílio de aproximadamente 50 mL de água destilada. Cada tubo contendo a amostra digerida foi adaptado no destilador e acrescido, lentamente, de 20 mL de solução de NaOH 50% (p/v) colocada no reservatório presente na porção superior do aparelho. Na extremidade do condensador foi colocado um erlenmeyer de 125 mL, contendo 10 mL de solução de ácido bórico a 2 % e três gotas de indicador misto (solução etanólica de vermelho de metila 0,2% e solução etanólica de verde de bromocresol a 0,2%, na proporção de 1:5) para que toda a amônia recém destilada fosse ali recebida. O aquecimento foi iniciado imediatamente após o fechamento de todas as saídas do

aparelho para que fosse evitada a perda de amônia. A destilação da amostra foi realizada até que toda a amônia fosse recolhida (volume aproximado de 50 mL no erlenmeyer).

O destilado contido no balão foi titulado com solução de ácido clorídrico 0,1 N até que a cor mudasse de verde para lilás. O volume de solução gasto na titulação do destilado foi utilizado para o cálculo do teor de compostos nitrogenados e do teor protéico presente nas amostras, através das equações:

$$\text{C.N.} = \frac{V \times Fc \times 0,0014}{m} \times 100$$

$$P = 6,25 \times \text{C.N.}$$

em que o C.N. é o teor de compostos nitrogenados (g/100 g), V é o volume gasto de HCl na titulação em mL, Fc é o fator de correção da solução de HCl, mol/L é a massa inicial da amostra em g, e P é o teor de proteína das amostra (g/ 100 g). As amostras foram analisadas em triplicata.

3.3.8 Determinação, concentração e extração dos sólidos totais na bebida

As bebidas foram caracterizadas quanto ao teor de sólidos por secagem em estufa em 102 ± 2 °C até peso constante (LÓPEZ-GALILEA et al., 2007). A extração foi definida como a porcentagem de sólidos totais com relação à dose de café utilizada, e a concentração como a porcentagem de sólidos totais em relação ao volume da bebida.

3.3.9 Análise estatística dos dados

A análise estatística dos dados foi realizada por análise de variância e a comparação das médias foi feita usando-se o teste de Tukey, com nível de significância de 95%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

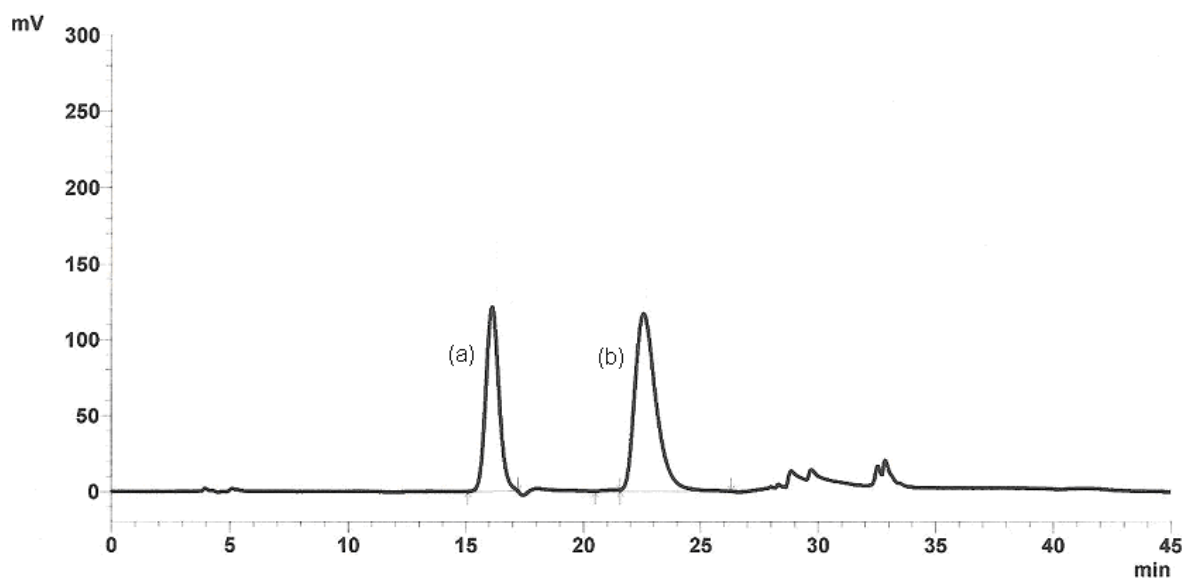
4.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA POR CLAE-PAR IÔNICO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE TRIPTOFANO E 5-HTP EM CAFÉ

4.1.1 Definição das condições de trabalho

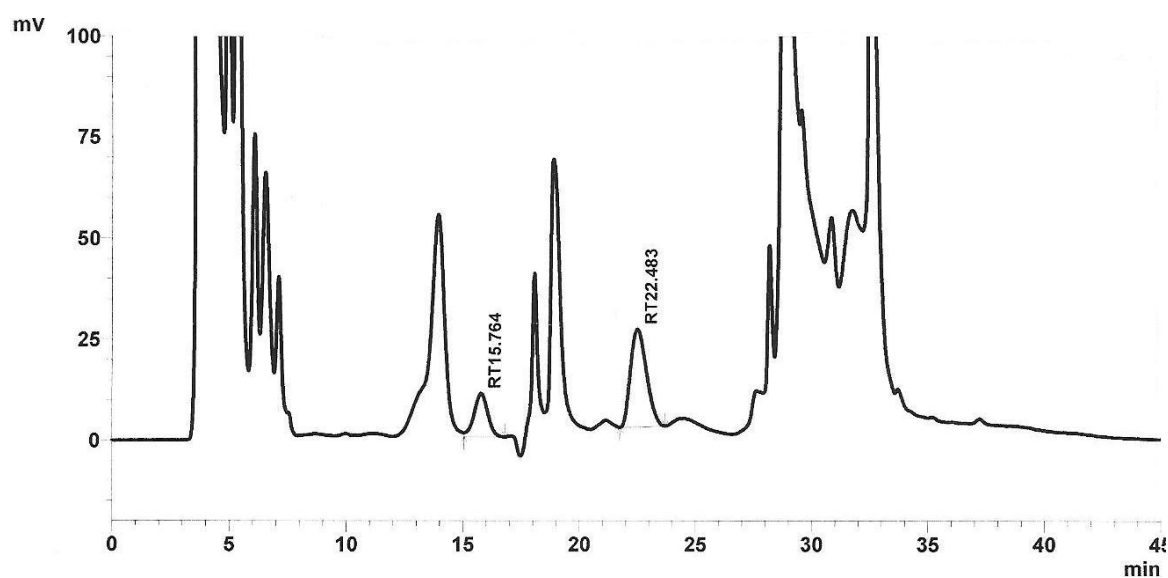
As condições de trabalho para a ótima resolução dos picos de triptofano e 5-HTP em soluções padrão foram obtidas com sistema em gradiente de eluição (tabela 4) e corrida cromatográfica de 45 min (figura 10).

Tabela 4 - Gradiente ótimo para quantificação simultânea de 5-HTP e triptofano

Tempo (min)	Gradiente de eluição	
	A (%)	B (%)
0,01	98	2
1	99	1
9	99	1
10	83	17
11	98	2
12	98	2
13	87	13
14	98	2
18	98	2
22	70	30
32	70	30
35	98	2
45	98	2



(A)



(B)

Figura 10- Perfil cromatográfico da separação e detecção por fluorescência de (a) 5-HTP e (b) triptofano em (A) solução padrão e (B) amostra de café arábica adicionada de padrões.

4.1.2 Comparação de métodos de extração simultânea de triptofano não-protéico e 5-HTP

Na tabela 5 são apresentados os resultados de recuperação obtidos para o triptofano e para o 5-HTP, em amostras fortificadas com duas quantidades diferentes

dos padrões, por meio das extrações com água e tampão fosfato de potássio, acetonitrila 7%, metanol a 50%, e HCl 0,1 N.

Tabela 5 - Percentuais de recuperação de triptofano não-protéico e 5-HTP obtidos por meio de diferentes metodologias de extração

Extratores	Quantidades dos compostos adicionadas (mg)			
	Triptofano		5-HTP	
	0,8	2,0	0,8	2,0
Água + Tampão Fosf. de Potássio	67,1 ± 9,6 a	62,1 ± 7,7 b	13,5 ± 2,1 c	12,7 ± 1,9 d
Acetonitrila 7%	78,6 ± 13,6 a	81,4 ± 8,1 a	26,4 ± 8,6 c	20,6 ± 2,9 c
Metanol 50%	74,3 ± 10,4 a	67,6 ± 2,7 b	74,6 ± 9,2 a	69,4 ± 5,5 a
HCl 0,1 N	63,4 ± 8,4 a	59,8 ± 3,3 b	59,4 ± 9,9 b	59,6 ± 4,1 b

* Valores médios com letras diferentes em uma mesma coluna são significativamente diferentes (Tukey 5%).

Conforme os resultados obtidos, o método escolhido como mais eficiente para a extração simultânea de triptofano não-protéico e 5-HTP foi o que utiliza como extrator o metanol 50%. Apesar de não ter apresentado o melhor resultado para extração de triptofano adicionado de 2, 0 mg dos analitos, a análise por meio deste método foi a que mostrou melhores resultados para os compostos em conjunto.

4.1.3 Otimização do método de extração simultânea de triptofano não-protéico e 5-HTP

a) Influência do tempo de agitação na extração de triptofano não protéico e 5-HTP de grãos de café

Não houve diferença significativa pelo teste ANOVA (5%) para as concentrações dos dois compostos obtidas nas diferentes extrações realizadas com os dois tempos de agitação, como pode ser observado na tabela 6. Baseado nestes resultados foi possível diminuir o tempo de agitação durante a extração de 30 para 10 minutos.

Tabela 6 - Resultados encontrados para extração de triptofano não-protéico e 5-HTP com diferentes tempos de agitação

Tempo de agitação	Concentração média* (mg/100 g) ± desvio padrão	
	Triptofano	5-HTP
10 minutos	3,56 ± 0,34	1,36 ± 0,25
30 minutos	3,56 ± 0,32	1,35 ± 0,19

*Não houve diferença significativa pelo teste ANOVA (5%).

b) Influência do número de etapas sucessivas na extração de triptofano não protéico e 5-HTP de grãos de café

Análise estatística comparando os dados obtidos (tabela 7) demonstrou não haver diferença significativa pelo teste ANOVA (5%) para as concentrações dos compostos obtidas com duas e três etapas de extração. Desta forma, a terceira etapa de extração não influenciou a quantidade dos compostos extraída da amostra. Portanto, a extração com duas etapas foi selecionada como para a análise.

Tabela 7 - Resultados encontrados para extração de triptofano não-protéico e 5-HTP com duas e três etapas de extração

Número de etapas de extração	Concentração média* (mg/100g) ± desvio padrão	
	Triptofano	5-HTP
2	3,93 ± 0,37	2,14 ± 0,23
3	3,68 ± 0,08	2,01 ± 0,12

*Não houve diferença significativa pelo teste ANOVA (5%).

4.1.4 Validação do método de determinação de triptofano e 5-HTP por CLAE-par iônico

Seletividade

A avaliação dos cromatogramas (figura 10) dos extratos de café adicionados de triptofano e 5-HTP mostraram que o método produz respostas para vários analitos presentes na amostra. Apesar disto, os picos dos compostos de interesse puderam ser distinguidos entre si e dos outros componentes, mostrando resolução e concordando com os tempos de retenção destes compostos nas soluções padrão.

Limite de detecção do equipamento

O limite de detecção do equipamento tanto para o triptofano quanto para o 5-HTP foi de 0,3 µg/mL, por ser a menor concentração que mostrou resposta pelo menos três vezes o nível de ruído da linha de base em metanol a 50% (EURACHEM, 1998).

Limite de detecção do método

Não foi possível estabelecer o limite de detecção do método para o triptofano por não se dispor de matriz similar ao café desprovida deste composto. O limite de detecção do método para o 5-HTP foi de 0,2 mg/100 g por mostrar resposta pelo menos três vezes o nível de ruído da linha de base em amostras de café (EURACHEM, 1998).

Limite de quantificação do método

Também não foi possível estabelecer o limite de quantificação do método para o triptofano por não se dispor de matriz similar ao café desprovida deste composto. O limite de quantificação do método para o 5-HTP foi de 0,3 mg/100 g por apresentar recuperação de 109,6% e coeficiente de variação de 6,3%, valores descritos como aceitáveis pelo CODEX (1993).

Linearidade

A linearidade da resposta do equipamento no intervalo de 0,3 a 40 µg/mL foi verificada em três dias diferentes, conforme apresentado na tabela 8. O coeficiente de correlação (R^2) obtido a partir da construção das curvas analíticas foi maior que 0,99 tanto para o triptofano quanto para o 5-HTP. Na figura 11 estão apresentados exemplos de curvas analíticas de 5-HTP (A) e triptofano (B) obtidas.

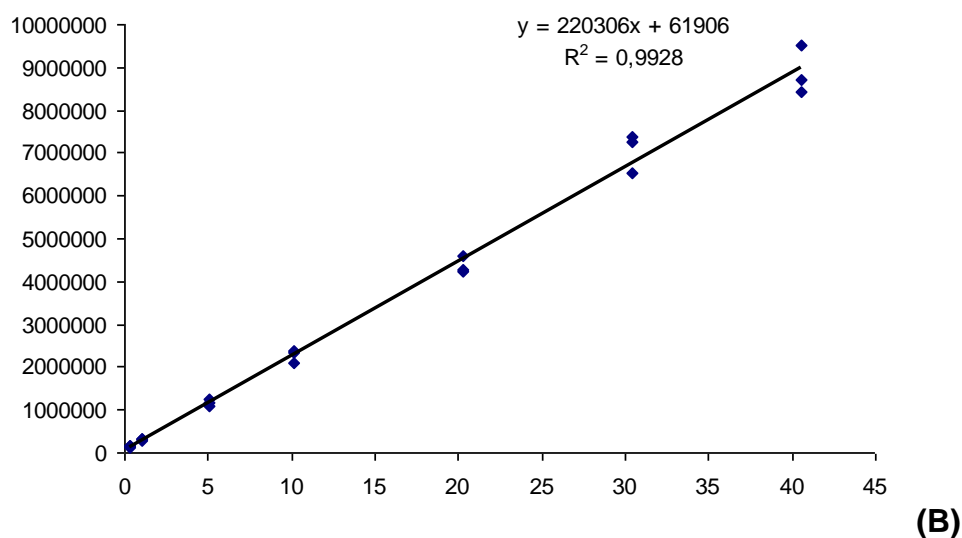
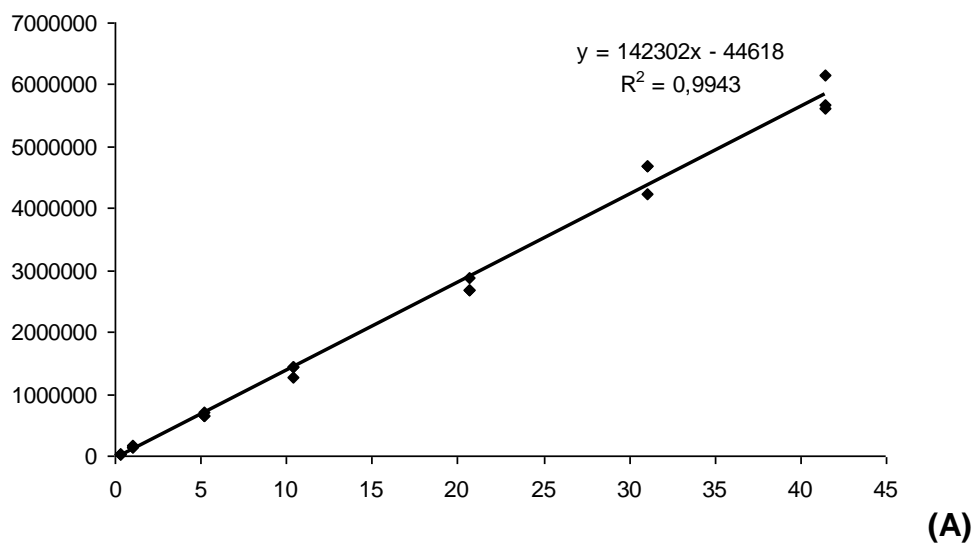


Figura 11 - Curvas analíticas de 5-HTP (A) e triptofano (B), nas concentrações de 0,3 a 40 µg/mL, suas respectivas equações de regressão linear e coeficientes de correlação.

Exatidão e precisão

Como não foi possível obter uma matriz sem o triptofano, estudos de recuperação foram realizados pelo método de adição, utilizando-se quantidades conhecidas de padrão às amostras de café. Os valores de recuperação e coeficiente de variação obtidos (tabela 9) estão de acordo com os descritos como aceitáveis pelo CODEX (1993).

Tabela 8 - Equações das curvas analíticas e seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) obtidas para triptofano e 5-HTP em três dias diferentes

Curva analítica	Triptofano		5-HTP	
	Equação	R^{2*}	Equação	R^{2*}
1	$y = 178379x - 15014$	0,9918	$y = 118499x - 3054$	0,9920
2	$y = 228863x + 13573$	0,9975	$y = 134448x - 13183$	0,9976
3	$y = 220306x + 61906$	0,9928	$y = 142302x - 44618$	0,9943

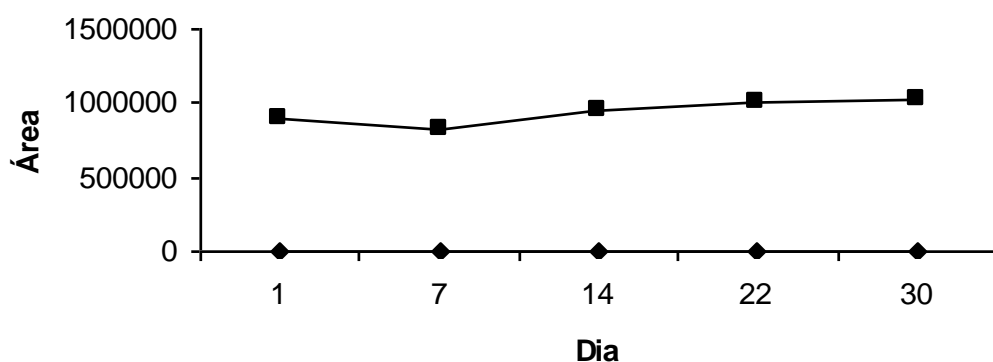
* R^2 = coeficiente de determinação.

Tabela 9 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação para amostra adicionadas de triptofano e 5-HTP

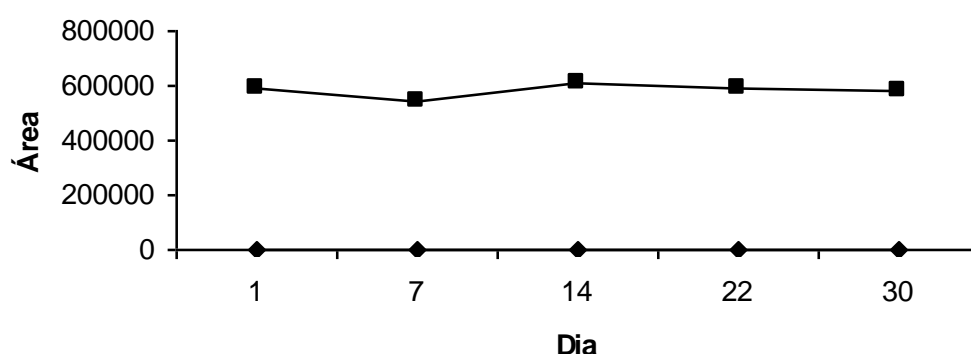
Concentração (mg/100 g)	Percentual (%)	
	Recuperação	Coeficiente de variação
<i>Triptofano</i>		
1,0	100,0	5,4
2,0	91,3	1,8
3,0	88,3	4,2
<i>5-HTP</i>		
1,0	108,5	4,7
2,0	94,2	3,1
3,0	84,3	6,1

Estabilidade das soluções padrão

A resposta do equipamento às soluções padrão de triptofano e 5-HTP analisadas durante um mês são apresentadas na figura 12. Segundo os dados obtidos, conclui-se que as soluções padrão permanecem estáveis no intervalo de tempo de um mês, quando armazenadas em condições adequadas, ou seja, em recipientes plásticos escuros sob atmosfera de nitrogênio a $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$.



(A)



(B)

Figura 12 - Análise de soluções padrão de concentração 5 µg/mL de triptofano (A) e 5-HTP (B) em diferentes dias no intervalo de um mês.

4.2 TEORES DE TRIPTOFANO E 5-HTP EM GRÃOS DE CAFÉ ARÁBICA E ROBUSTA CRUS

Além de determinar os teores de triptofano e 5-HTP nas amostras, estas foram submetidas a análises dos teores de umidade e de proteínas para eliminar a interferência deste primeiro parâmetro nos teores dos analitos por amostra e para expressar os teores de triptofano por conteúdo protéico.

4.2.1 Teores de umidade

Na tabela 10 estão apresentados os teores de umidade em amostras de café arábica e robusta. Observa-se que houve diferença significativa nos teores de umidade

entre os diferentes lotes de café da mesma espécie, e os grãos de café robusta apresentaram maiores teores comparado aos grãos de café arábica.

A importância da determinação da umidade do café está associada a dois fatos. Primeiro, ao fato de que condições variadas do processo de secagem podem levar a teores diferentes de umidade. Desta forma, a expressão dos resultados em base seca é essencial para comparação dos resultados. Segundo, a quantidade de água assegura a qualidade do grãos, uma vez que contribui para a atividade biológica e mudanças químicas e físicas durante seu armazenamento (FERNANDES et al., 2003a; AFONSO JÚNIOR et al., 2004).

Os teores de umidade encontrados nas amostras coincidem com os comumente encontrados na literatura (BELITZ & GROSH, 1997; MAZZAFERA, 1999; MONTAVON et al., 2003; CASAL et al., 2005), que variam de 8 a 12,1%. Durante o processamento pós-colheita, os grãos são secados até atingirem um conteúdo de umidade de 12% ou menos (VARNAM & SUTHERLAND, 1997).

Tabela 10 - Teores médios de umidade de diferentes amostras de café arábica e robusta crus

Lotes	Teor (g/100 g)* \pm desvio padrão	
	Arábica	Robusta
1	8,89 \pm 0,04 a	10,34 \pm 0,16 a
2	8,57 \pm 0,11 b	10,07 \pm 0,04 b
3	8,49 \pm 0,16 b	10,31 \pm 0,10 ab
Média	8,65 \pm 0,21 B	10,24 \pm 0,16 A

* Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma coluna apresentam diferença significativa pelo teste Tukey (5%); médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma linha apresentam diferença significativa pelo teste ANOVA (5%).

4.2.2 Teores de proteína

Os teores de proteína encontrados estão descritos na tabela 11. Não houve diferença significativa pelo teste ANOVA (5%) quanto aos teores de proteína em base seca entre as espécies de café arábica e robusta, sendo os teores médios de 13,92 \pm 0,98 e 13,73 \pm 0,74 g/100 g, respectivamente.

Estes resultados condizem com VARNAM & SUTHERLAND (1997), que afirmaram que há somente pequenas diferenças entre espécies de café quanto ao conteúdo protéico. Os teores apresentados se aproximam dos encontrados na literatura (BELITZ & GROSH, 1997; CASAL et al., 2005), de 8,7 a 13,6.

Tabela 11 - Teores médios de proteína em amostras de café arábica e robusta crus, expressos em base seca

Lotes	Teor* (g/100 g base seca) ± desvio padrão	
	Arábica	Robusta
1	13,34 ± 0,20	13,92 ± 0,55
2	14,38 ± 1,48	13,05 ± 0,60
3	14,05 ± 0,87	14,23 ± 0,61
Média	13,92 ± 0,98	13,73 ± 0,74

* Não houve diferença significativa entre os lotes da mesma espécie e entre as médias das espécies pelo teste ANOVA (5%).

4.2.3 Teores de triptofano e 5-HTP

Não foi encontrado 5-HTP em nenhuma das amostras analisadas. Com relação aos teores médios de triptofano não-protéico, total e protéico (tabela 12), os cafés arábica e robusta apresentaram semelhanças entre os lotes pelo teste ANOVA a 5% de significância.

A precisão e a exatidão do método de hidrólise para determinação do triptofano total (AOAC, 1995) foram investigadas por 10 análises de amostras adicionadas com 200 µL de solução padrão de triptofano de concentração 100 µg/mL. O coeficiente de variação encontrado foi de 5,1% e a recuperação média de 93%, valores descritos como aceitáveis pelo CODEX (1993).

Tabela 12 - Teores médios de 5-HTP e triptofano (não-protéico, total e protéico) em base seca em amostras de café arábica e robusta crus

Amostra	Teor ± desvio padrão				
	5-HTP ¹ (mg/100 g base seca)	Triptofano ² não-protéico (mg/100 g base seca)	Triptofano ² total (mg/100 g base seca)	Triptofano protéico ²	
				(mg/100 g base seca)	(mg/g proteína)
Arábica					
lote 1	nd	20,74 ± 0,84	144,1 ± 3,9	123,3 ± 3,7	9,25 ± 0,28
lote 2	nd	23,13 ± 1,24	143,4 ± 3,5	120,3 ± 2,9	8,37 ± 0,20
lote 3	nd	22,37 ± 1,63	141,2 ± 0,5	118,8 ± 2,1	8,46 ± 0,15
Robusta					
lote 1	nd	3,18 ± 0,01	155,4 ± 6,6	152,3 ± 6,6	10,94 ± 0,47
lote 2	nd	3,03 ± 0,07	157,5 ± 4,3	154,4 ± 4,3	11,89 ± 0,32
lote 3	nd	3,07 ± 0,14	158,2 ± 3,4	155,1 ± 3,5	10,90 ± 0,25

¹ Não detectado (limite de detecção 0,2 µg/mL; limite de quantificação 0,3 mg/100g).

² Não houve diferença significativa entre lotes da mesma espécie pelo teste ANOVA (5%).

Considerando-se que não houve diferença significativa entre os teores de triptofano dos lotes de uma mesma espécie, estes foram agrupados para avaliação de seus teores nas espécies arábica e robusta (tabela 13).

As amostras do café robusta cru apresentaram maiores teores de triptofano total e protéico do que arábica. Estes resultados estão alinhados com os encontrados por CASAL et al. (2003; 2005), que mostraram que os teores de aminoácidos obtidos após hidrólise apresentam-se maiores no café robusta.

As concentrações de triptofano por grama de proteína encontradas se aproximam das apresentadas na literatura. Segundo ROSSI & TIRAPGUI (2004), o triptofano é o aminoácido em menor concentração nas proteínas dietéticas, sendo 1 g/100 g nas proteínas de origem animal e 1,4 g/100 g nas proteínas de origem vegetal. Ao analisar os peptídeos presentes no café, LUDWIG et al. (2000) detectaram triptofano em quantidades que variaram de 0,2 a 0,9 g/100 g das moléculas.

Tabela 13 - Teores médios de triptofano e proteína em amostras de café arábica e robusta crus, em base seca

Triptofano	Teor* em base seca \pm desvio padrão	
	Arábica	Robusta
Total (mg/100 g peso seco)	142,9 \pm 2,9 b	157,0 \pm 4,5 a
Não-protéico (mg/100 g peso seco)	22,08 \pm 1,53 a	3,09 \pm 0,10 b
Protéico (mg/100 g peso seco)	120,8 \pm 3,3 b	154,0 \pm 4,5 a
Protéico (mg/g proteína)	8,69 \pm 0,46 b	11,24 \pm 0,57 a

* Médias na mesma linha seguidas por diferentes letras apresentam diferença significativa pelo teste ANOVA (5%).

Os aminoácidos totais são freqüentemente quantificados em amostras de café (NEHRING & MAIER, 1992; CASAL et al., 2003; CASAL et al., 2005). Entretanto, na literatura são escassos os trabalhos em que o triptofano total foi quantificado no café. O triptofano total foi determinado em alguns trabalhos com alimentos como ingredientes a base de leite e suplementos esportivos (DELGADO-ANDRADE et al., 2006) e farinhas de cereais e legumes (COMAI et al., 2007a; COMAI et al., 2007b), mas não se trata de uma prática comum, já que este aminoácido é destruído durante a etapa de hidrólise ácida com HCl 6 N, comumente utilizada para análise de aminoácidos.

Os teores de triptofano não-protéico estavam presentes em maior concentração no café arábica do que no robusta, e os teores de triptofano total estavam presentes em maiores concentrações no café robusta. Conseqüentemente, o triptofano não protéico prestou uma maior contribuição ao teor de triptofano total no café arábica (15% em comparação a 2% do robusta), como pode ser observado na figura 13.

Os resultados encontrados discordam dos apresentados por CASAL et al. (2003; 2005), que detectaram teores de triptofano não-protéico maiores em café robusta do que em arábica. No entanto, ARNOLD et al. (1994) encontraram variações na concentração dos aminoácidos livres individuais entre cafés da mesma espécie e diferentes origens. Estes autores ressaltaram que, apesar de trabalhos descreverem a

concentração de aminoácidos livres como ligeiramente maiores em café robusta quando comparados com arábica, existem exceções.

Os perfis e teores dos aminoácidos livres e totais em cafés podem variar dependendo de diversos fatores como espécie e variedade (MARTÍN et al., 1998; LUDWIG et al., 2000; CASAL et al., 2003), grau de maturação (MAZZAFERA, 1999), tipo de processamento pós-colheita (ARNOLD & LUDWIG, 1996; BYTOF et al., 2005), condições de torração (NEHRING & MAIER, 1992; CASAL et al., 2005) e a técnica analítica utilizada para a determinação (ARNOLD et al., 1994).

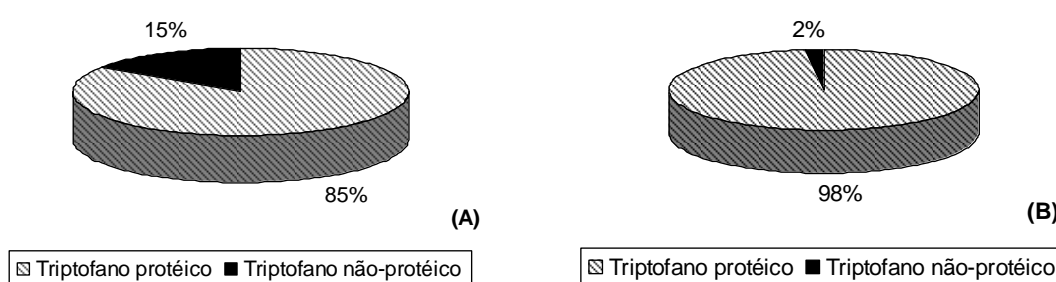


Figura 13 - Contribuição do triptofano não-protéico ao teor total de triptofano em café arábica (A) e café robusta (B).

Segundo CASAL et al. (2003), o triptofano está entre os aminoácidos livres mais abundantes em café, juntamente com a alanina, prolina, asparagina, ácido glutâmico e fenilalanina. A determinação dos teores de triptofano não protéico em cafés foi realizada em alguns trabalhos, com objetivos como: utilização do teor deste aminoácido na avaliação da influência do processamento na composição química do café (BYTOF et al., 2005), discriminação de espécies (CASAL et al., 2003), avaliação dos efeitos da torração (CASAL et al. 2005). O triptofano não-protéico é relativamente estável durante o processamento e armazenamento de alimentos, e apenas tratamentos severos causam uma degradação significativa deste aminoácido (FRIEDMAN & CUQ, 1988).

4.3 INFLUÊNCIA DA TORRAÇÃO NOS TEORES DE TRIPTOFANO E 5-HTP EM GRÃOS DE CAFÉ ARÁBICA E ROBUSTA

Além de determinar os teores de triptofano e 5-HTP nas amostras, estas foram caracterizadas quanto à perda de peso durante a torração e quanto às características de cor, e submetidas a análises dos teores de umidade e de proteína.

4.3.1 Perda de peso durante a torração

Durante a torração do café, houve alteração significativa no peso dos grãos, conforme previsto. As porcentagens médias de perda de peso dos grãos de café arábica e robusta submetidos às torrações clara (171 °C, 8 min), média (171 °C, 15 min) e escura (210 °C, 15 min) em relação ao grão cru são apresentadas na tabela 14.

Tabela 14 - Porcentagens médias de perda de peso de amostras de café arábica e robusta submetidos a diferentes níveis de torração

Torrações	Porcentagem* \pm desvio padrão	
	Arábica	Robusta
Clara (171 °C, 8 minutos)	13,90 \pm 0,20 cB	16,40 \pm 0,10 cA
Média (171 °C, 15 minutos)	17,91 \pm 0,85 bB	21,22 \pm 0,56 bA
Escura (210 °C, 15 minutos)	29,55 \pm 0,99 aB	33,07 \pm 0,94 aA

*Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma coluna apresentam diferença significativa pelo teste Tukey (5%); médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma linha apresentam diferença significativa pelo teste ANOVA (5%).

Foi observado um aumento significativo (ANOVA 5%) na perda de peso dos grãos quando submetidos a níveis de torração mais intensos, para ambas as espécies.

As duas espécies diferiram significativamente (ANOVA 5%) com relação à perda de peso quando submetidas a condições similares de torração, sendo que o café robusta apresentou maiores perdas em todos os níveis de torração.

Na figura 14 tem-se a variação de peso das amostras de café arábica e robusta com a progressão da intensidade da torração. Como pode ser observado, o café

robusta sofreu maior perda de peso quando submetido à torração clara, menos intensa, enquanto que nas torrações mais fortes mostra um perfil de perda de peso semelhante ao do café arábica.

Segundo FRANÇA et al. (2002), a torração do café é caracterizada por duas fases – secagem e pirólise. Na primeira fase, que acontece em poucos minutos, ocorre uma redução significativa da umidade com o tempo. Portanto, a maior perda de peso por parte do café robusta observada no primeiro nível de torração pode ser atribuída ao maior conteúdo de umidade deste.

Após a primeira fase de evaporação intensa de água, os grãos de café continuam a perder água e iniciam a formação de produtos gasosos (CO_2 , CO) e compostos voláteis (BELITZ & GROSH, 1997), fenômenos que, no presente trabalho, provocaram uma variação de peso semelhante para as duas espécies estudadas entre a torração clara e a torração escura (figura 14).

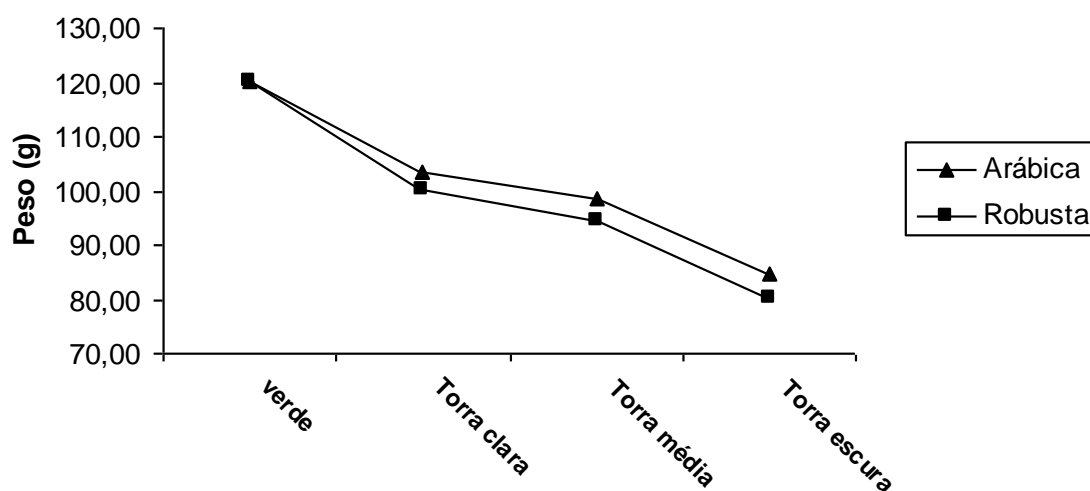


Figura 14 - Peso de amostras de café arábica e robusta crus e submetidas a diferentes níveis de torração.

b) Alteração da coloração durante a torração

Na tabela 15 são apresentados os valores dos parâmetros de cor da escala CIE (L^* , a^* , b^* , c^* e H^*) encontrados para os cafés arábica e robusta submetidos a diferentes níveis de torração. O parâmetro L^* indica luminosidade e a^* e b^* são as

coordenadas de cromaticidade e indicam vermelho (+a*), verde (-a*), amarelo (+b*) e azul (-b*), enquanto c* indica a saturação e H* a tonalidade.

Tabela 15 - Características de cor CIE L*a*b* de amostras de café arábica e robusta submetidos a diferentes níveis de torração

Características de cor	Valor médio ¹ ± desvio padrão		
	Níveis de torração		
	Clara	Média	Escura
L*			
Arábica	27,97 ± 2,00 aA	18,97 ± 0,78 aB	12,74 ± 0,83 bC
Robusta	28,84 ± 1,61 aA	18,67 ± 1,32 aB	14,53 ± 2,06 aC
a*			
Arábica	10,67 ± 1,66 aA	6,89 ± 1,57 aB	-1,34 ± 2,04 aC
Robusta	9,40 ± 1,54 bA	5,69 ± 1,12 bB	-4,92 ± 1,64 bC
b*			
Arábica	25,55 ± 3,93 aA	9,90 ± 1,77 aB	-1,10 ± 1,28 aC
Robusta	27,47 ± 3,16 aA	9,07 ± 2,45 aB	-0,29 ± 0,38 aC
c*			
Arábica	27,90 ± 3,43 aA	12,20 ± 1,46 aB	2,64 ± 1,24 bC
Robusta	29,10 ± 2,90 aA	11,67 ± 1,12 aB	5,65 ± 1,57 aC
H°			
Arábica	66,97 ± 5,28 bB	57,59 ± 8,32 aB	220,1 ± 52,17 bA
Robusta	70,88 ± 4,03 aC	56,53 ± 10,22 aB	163,8 ± 25,33 aA

*Médias de parâmetros iguais seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma coluna apresentam diferença significativa pelo teste ANOVA (5%); médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma linha apresentam diferença significativa pelo teste Tukey (5%).

A avaliação da cor do café é comumente utilizada como um índice indireto de determinação do seu grau de torração, por ser uma análise rápida e fácil (NEHRING & MAIER, 1992).

Em concordância com dados publicados na literatura (DOS SANTOS et al., 2007; SUMMA et al., 2007), os resultados obtidos, tanto para café arábica quanto para café robusta mostram uma tendência significativa (Tukey 5%) de decréscimo de L*, a* e b* (CIE) com o aumento da torração. Assim como encontrado por CIRILO et al. (2003)

foram observadas maiores saturações para as amostras das duas espécies quando submetidas a torrações menos intensas. O mesmo foi observado para a tonalidade, com exceção para a torra escura, que apresentou resultados elevados deste parâmetro.

4.3.2 Teores de umidade

Na tabela 16 estão indicados os teores médios de umidade de amostras de café arábica e robusta submetidos às torrações clara, média e escura. Os valores não apresentaram diferença significativa (Tukey 5%) entre os níveis de torração para ambas as espécies, nem diferiram significativamente (ANOVA 5%) entre estas em nenhum nível de torração em estudo.

Tabela 16 - Teores médios de umidade de amostras de café arábica e robusta submetidas a diferentes níveis de torração

Torrações	Teor médio (g/100 g) ± desvio padrão	
	Arábica	Robusta
Clara (171 °C, 8 minutos)	1,31 ± 0,38	1,63 ± 0,33
Média (171 °C, 15 minutos)	1,40 ± 0,38	1,45 ± 0,30
Escura (210 °C, 15 minutos)	1,53 ± 0,49	1,57 ± 0,38

¹Não houve diferença significativa entre amostras da mesma espécie submetidas a diferentes níveis de torração e entre amostras de diferentes espécies submetidas ao mesmo nível de torração pelo teste ANOVA (5%).

Segundo FRANÇA et al. (2002), na segunda fase da torração do café, denominada pirólise, as diferenças de umidade com o tempo são irrelevantes, e, portanto, uma possível explicação para a estabilização do teor de umidade é a de que na torração clara já se tenha alcançado a fase de pirólise. Ademais, segundo DA PORTO et al. (1991), o teor de umidade nunca alcança zero, provavelmente devido à concomitante formação de água de condensação.

Os teores de umidade encontrados neste trabalho concordam com BELITZ & GROSH (1997), segundo os quais no estado de torração completo os grãos de café possuem conteúdos de água que podem variar de 1,5 a 3,5 g/100 g.

4.3.3 Teores de proteína

Os teores médios de proteína encontrados nas amostras de café arábica e robusta submetidos a diferentes níveis de torração são apresentados na tabela 17. Não foram encontradas diferenças significativas (teste de Tukey, 5%) dos teores protéicos entre as torrações clara, média e escura para as duas espécies. Os teores de proteína também não diferiram significativamente (ANOVA 5%) entre as espécies para nenhum nível de torração estudado.

Tabela 17 - Teores médios de proteína de amostras de café arábica e robusta submetidas a diferentes níveis de torração

Torrações	Teor* (g/100 g base seca) ± desvio padrão	
	Arábica	Robusta
Clara (171 °C, 8 minutos)	13,37 ± 1,58	14,10 ± 0,66
Média (171 °C, 15 minutos)	14,26 ± 1,64	14,39 ± 1,27
Escura (210 °C, 15 minutos)	14,67 ± 2,70	14,78 ± 1,72

*Não houve diferença significativa entre amostras da mesma espécie submetidas a diferentes níveis de torração e entre amostras de diferentes espécies submetidas ao mesmo nível de torração pelo teste ANOVA (5%).

Os teores de proteína nos grãos torrados são dependentes da composição inicial do grão, grau de maturação dos frutos, espécie, variedade, dentre outros (FERNANDES et al., 2002). Durante a torração, as proteínas se desnaturam e se degradam em fragmentos de menor peso molecular. Teoricamente, a perda de proteína durante a torra pode ser de 20 a 40% em função da intensidade da torra, ainda que possa chegar a ser superior a 50% (VARNAM & SUTHERLAND, 1997).

Os teores de proteína encontrados se aproximam dos apresentados na literatura (FERNANDES et al., 2001; 2002; 2003a e b), que variaram de 14,78 a 17,18 g/100 g.

Apesar disto, os resultados parecem estar superestimados, principalmente porque se apresentam maiores que os encontrados para o café cru neste estudo. O teor protéico de grãos crus e, em maior extensão, o teor protéico de cafés torrados são superestimativas do teor real quando não são feitas correções para o nitrogênio originado da cafeína e trigonelina. Além disso, nem todo o nitrogênio dos grãos torrados está presente na forma de aminoácidos e proteínas intactos. Parte deste nitrogênio também compõe a estrutura das melanoidinas, formadas, em parte, pela decomposição dos aminoácidos e proteínas durante a torração (BEKEDAN et al., 2006).

As melanoidinas são compostos escuros formados durante o processo de torração devido à reação de Maillard que acontece, principalmente, entre aminoácidos ou proteínas e açúcares redutores (FRIEDMAN, 1996; ADAMS et al., 2005). A detecção de outros compostos que não resultam da interação entre carboidratos e aminoácidos nas melanoidinas indica que outros constituintes do café, como ácidos clorogênicos e trigonelina, estão envolvidos nas reações de escurecimento (ADAMS et al., 2005). As melanoidinas consistem de cerca de 23% do café torrado (BELITZ & GROSH, 1997). A estrutura química das melanoidinas ainda não foi completamente elucidada, mas sabe-se que em sistemas alimentícios, como os grãos de café, a composição das melanoidinas tende a ser mais complexa devido à presença de muitos possíveis reagentes (BEKEDAN et al., 2006).

4.3.4 Teores de triptofano e 5-HTP

Na tabela 18 estão apresentados os teores médios de 5-HTP, triptofano não-protéico e triptofano total, além de suas porcentagens de perda em relação ao café cru, em amostras de café arábica e robusta submetidas a diferentes níveis de torração.

Não foi possível encontrar na literatura dados sobre os teores de 5-HTP e triptofano protéico em grãos de café submetidos à torração.

Não foram detectados 5-HTP e triptofano não-protéico nos grãos de café de ambas as espécies submetidos aos diferentes níveis de torração estudados. Em estudo *in vitro*, SIMAT & STEINHART (1998) encontraram que o 5-HTP é um dos produtos da oxidação do triptofano, tanto não-protéico quanto protéico, sendo mais suscetível à oxidação que o triptofano. Além disso, segundo NAGATSU (1991), o 5-HTP pode sofrer descarboxilação térmica e formar serotonina. Portanto, é possível que

tenha ocorrido a formação de 5-HTP durante o processo de torração, e que este tenha sido destruído posteriormente.

Tabela 18 - Teores médios (e porcentagem de perda) de 5-HTP e triptofano não-protéico e total em amostras de café arábica e robusta submetidas a diferentes níveis de torração

Composto		Teor* (mg/100 g base seca) ± desvio padrão (% perda)		
		Torrões		
		Clara (171 °C, 8 minutos)	Média (171 °C, 15 minutos)	Escura (210 °C, 15 minutos)
5-HTP¹	Arábica	nd	nd	nd
	Robusta	nd	nd	nd
Triptofano não-protéico²	Arábica	nd (100%)	nd (100%)	nd (100%)
	Robusta	nd (100%)	nd (100%)	nd (100%)
Triptofano total³	Arábica	107,0 ± 9,1aA (25,1%)	65,84 ± 15,28 aB (48,4%)	33,77 ± 8,39 aC (76,4%)
	Robusta	112,4 ± 10,9 aA (28,4%)	72,80 ± 6,77 aB (53,6%)	35,97 ± 4,23 aC (77,1%)

¹ Não detectado (limite de detecção 0,2 µg/mL; limite de quantificação 0,3 mg/100 g).

² Não detectado (limite de detecção 0,3 µg/mL).

³ Médias seguidas por mesmas letras minúsculas na mesma coluna não apresentam diferença significativa pelo teste ANOVA (5%); médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma linha apresentam diferença significativa pelo teste Tukey (5%).

Os resultados encontrados para triptofano não-protéico neste trabalho concordam com os de CASAL et al. (2005). Estes autores observaram que os aminoácidos livres, inicialmente em baixos teores no café cru, são destruídos durante a torração, especialmente acima de 180 °C.

Os teores de triptofano total, referentes ao triptofano protéico, decresceram significativamente (Tukey 5%) com o aumento da intensidade da torração para as duas espécies. Não houve diferença significativa (ANOVA 5%) nos teores de triptofano total entre as espécies em nenhum dos níveis de torração estudados. No entanto, foi observado que os grãos da espécie arábica apresentaram porcentagens de perda

deste composto menores que os da espécie robusta em todos os níveis de torração estudados (tabela 18). O perfil da variação do teor de triptofano total das amostras submetidas aos diferentes níveis de torração está apresentado na figura 15.

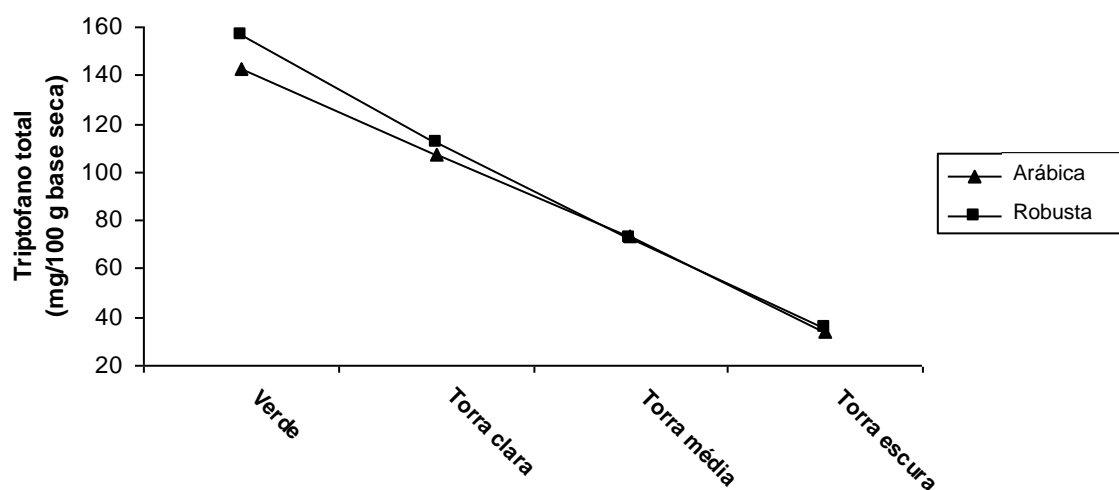


Figura 15 - Variação do teor de triptofano total de amostras de café arábica e robusta crus e submetidas a diferentes níveis de torração.

O triptofano, assim como os outros aminoácidos, é decomposto com liberação de CO_2 e reage formando compostos voláteis e melanoidinas, responsáveis pelo aroma e cor do café torrado (FERNANDES et al., 2002).

Em estudo *in vitro*, SIMAT & STEINHART (1998) observaram que a taxa de degradação do triptofano protéico é muito menor do que a taxa de degradação do triptofano não-protéico, o que concorda com os resultados apresentados neste estudo. Segundo os autores, este fenômeno pode ser devido à barreira estérica contra o ataque oxidativo proporcionada pela conformação da proteína, visto que os resíduos hidrofóbicos de triptofano estão no interior da molécula.

A oxidação por compostos como o H_2O_2 exerce a maior influência na degradação de triptofano, juntamente com a temperatura e o tempo em que o aminoácido é submetido a estes fatores (SIMAT & STEINHART, 1998). MONTAVON et al. (2003) observaram que os grãos de café podem liberar H_2O_2 durante a torração, enquanto ocorre a fragmentação e polimerização das proteínas. A formação de H_2O_2 foi detectada após 4 min de torração a 240 °C e continuou aumentando durante o processo, promovendo a oxidação e destruição dos compostos.

Os resultados encontrados neste estudo, que indicam menor porcentagem de perda de triptofano total em café arábica em comparação com o robusta, são corroborados pelo estudo de CASAL et al. (2003). Estes autores observaram que a média dos teores de aminoácidos totais analisados em café robusta diminuiu cerca de 20% com a torração (160-220 °C/14 min), enquanto no café arábica este efeito não foi observado. Segundo estes autores, os resultados indicam que a matriz do café arábica é mais protegida dos efeitos da temperatura, devido ao maior conteúdo lipídico liberado na superfície durante a torração, que age como uma barreira que protege a matriz interna. No entanto, segundo COELHO & PEREIRA (2002) com o uso de torrações mais escuras verifica-se uma pequena perda do extrato etéreo.

4.4 TEORES DE TRIPTOFANO E 5-HTP NAS BEBIDAS PREPARADAS A PARTIR DE GRÃOS DE CAFÉ ARÁBICA E ROBUSTA

Além de terem sido determinados os teores de triptofano e 5-HTP, as bebidas foram caracterizadas quanto ao teor de sólidos totais, à concentração e à extração, e submetidas à análise do teor de nitrogênio total. As bebidas analisadas neste trabalho foram preparadas da forma comumente utilizada no Brasil, com o intuito de acessar o conteúdo dos compostos nas bebidas de café consumidas no dia-a-dia dos brasileiros.

4.4.1 Caracterização das amostras

Na tabela 19 estão descritos os teores médios de sólidos totais, concentração e extração nas amostras de bebidas preparadas a partir de grãos de café das espécies arábica e robusta submetidos à torração média (171 °C, 15 min). A extração foi definida como a porcentagem de sólidos totais com relação à dose de café utilizada, e a concentração como a porcentagem de sólidos totais em relação ao volume da bebida. Para todos os parâmetros foram observadas diferenças significativas (ANOVA 5%) entre as bebidas das diferentes espécies, com valores mais elevados para a bebida dos grãos robusta.

Tabela 19 - Teores médios de sólidos totais, concentração e extração nas amostras de bebidas de cafés arábica e robusta

Parâmetros	Teor* \pm desvio padrão	
	Arábica	Robusta
Sólidos Totais (mg/mL)	32,74 \pm 0,39 B	33,87 \pm 0,18 A
Concentração (g/100 mL)	3,27 \pm 0,04 B	3,39 \pm 0,02 A
Extração (g/100 g)	24,56 \pm 0,29 B	25,40 \pm 0,14 A

*Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma linha apresentam diferença significativa pelo teste ANOVA (5%).

Para a preparação da bebida é comum utilizar misturas de cafés de dois ou mais tipos. A essa mistura atribui-se o nome de “blends”, que são muito utilizadas quando se deseja manter a uniformidade do sabor num produto natural e a obtenção de um produto de qualidade apreciável (FERNANDES et al., 2002). No entanto, neste estudo optou-se por preparar a bebida a partir de grãos da mesma espécie, com o objetivo de observar a influência deste parâmetro nas características e composição da bebida.

Foi observado que a bebida de café robusta apresentou maior valor de concentração, e, portanto, que grãos desta espécie permitem uma maior extração de sólidos pela fase líquida. Segundo PINTO et al. (2002), uma maior quantidade de sólidos solúveis é desejável, tanto do ponto de vista do rendimento, como pela sua contribuição para assegurar corpo à bebida.

As porcentagens de extração encontradas para as bebidas das duas espécies são ligeiramente maiores que as encontradas na literatura (BORRELLI et al., 2002; BEKEDAN et al., 2006). Segundo BELITZ & GROSH (1997), o café de preparação caseira possui um percentual de extração em torno de 22%. As porcentagens de extração na faixa de 18 a 22% são consideradas as mais aceitáveis (LÓPEZ-GALILEA et al., 2007).

O preparo da bebida café é fundamentalmente um processo físico que consiste na transferência de massa dos compostos que podem difundir da fase sólida à fase líquida. Os sólidos totais e o rendimento de concentração dependem do procedimento de preparo da bebida utilizado. Estes aumentam com o incremento da temperatura do solvente e a diminuição do tamanho da partícula. Por outro lado, diminuem ao

umentar a intensidade da torração e a razão café:solvente (VARNAM & SUTHERLAND, 1997; ANDUEZA et al., 2003).

4.4.2 Teores de nitrogênio total

Os teores médios de nitrogênio nas bebidas e nos sólidos das bebidas de café arábica e robusta estão apresentados na tabela 20. A bebida do café robusta apresentou teor de nitrogênio total significativamente maior (ANOVA 5%) que a bebida de café arábica. Apesar de não ter sido encontrada diferença significativa (ANOVA 5%) para o teor de nitrogênio com relação aos sólidos das bebidas das duas espécies, a de café robusta apresentou resultados ligeiramente maiores para este parâmetro.

Teores significativamente maiores de nitrogênio na bebida de café robusta podem ser explicados pelo maior teor de sólidos solúveis nesta, além da maior concentração de nitrogênio encontrada nos sólidos.

Tabela 20 - Teores médios de nitrogênio nas amostras de bebidas de café arábica e robusta

Amostra	Nitrogênio total* \pm desvio padrão	
	Arábica	Robusta
Bebida (g/100 mL)	0,11 \pm 0,01 B	0,12 \pm 0,01 A
Sólidos da bebida (g/100 g)	3,23 \pm 0,29 A	3,63 \pm 0,31 A

*Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma linha apresentam diferença significativa pelo teste ANOVA (5%).

O nitrogênio detectado na bebida utilizando-se o método de Kjeldahl pode ser proveniente de vários compostos, como cafeína, trigonelina e proteínas, que juntas correspondem a cerca de 12% do extrato seco da bebida (BELITZ & GROSH, 1997). Parte deste nitrogênio também compo a estrutura das melanoidinas, formadas em parte pela decomposição dos aminoácidos e proteínas durante a torração (BEKEDAN et al., 2006).

Segundo BEKEDAN et al. (2006), o nitrogênio não protéico consiste de cerca de 17% do conteúdo total de nitrogênio da bebida, sendo os aminoácidos das proteínas

dos grãos crus a provável fonte deste. Ainda segundo estes autores, apenas 13% das proteínas dos grãos torrados são extraídas para a bebida, e nesta aparecem na concentração de 6,4 g/100 mL. As proteínas se tornam menos solúveis em água durante a torração devido à sua desnaturação, às reações químicas pelas quais passam, e à degradação e conversão em compostos responsáveis pelo aroma do café.

4.4.3 Teores de triptofano e 5-HTP

Na tabela 21 são apresentados os teores médios de 5-HTP, triptofano não-protéico e triptofano total nas amostras de bebidas de café arábica e robusta.

Tabela 21 - Teores médios de 5-HTP e triptofano (não-protéico e total) nas amostras de bebidas de cafés arábica e robusta

Compostos	Teor \pm desvio padrão	
	Arábica	Robusta
5-HTP¹ (mg/100 g sólidos)	nd	nd
Triptofano não-protéico² (mg/100 g sólidos)	nd	nd
Triptofano total³ (μg/mL bebida)	28,1 \pm 4,1B	49,5 \pm 4,6 A
Triptofano total³ (mg/100 g sólidos)	85,63 \pm 11,70 B	146,1 \pm 13,3 A

¹ Não detectado (limite de detecção 0,2 μ g/mL; limite de quantificação 0,3 mg/100 g).

² Não detectado (limite de detecção 0,3 μ g/mL).

³ Médias seguidas por diferentes letras na mesma linha apresentam diferença significativa pelo teste ANOVA (5%).

Não foram detectados 5-HTP e triptofano não-protéico nas bebidas de nenhuma das espécies de café estudadas. Os teores de triptofano total, referentes ao triptofano protéico, foram significativamente maiores (ANOVA 5%) para o café robusta em comparação com o arábica, tanto em relação à bebida quanto em relação aos sólidos desta.

Não foram encontrados na literatura dados a respeito das concentrações de 5-HTP e triptofano na bebida café. Os resultados obtidos para 5-HTP podem indicar que

este composto, não detectado nos grãos de café utilizados para o preparo da bebida, não seja produzido durante o seu processo de preparo. Pode-se ainda supor que este seja formado a partir do triptofano e seja degradado em seguida por oxidação (SIMAT & STEINHART, 1998). Por outro lado, os resultados para triptofano não-protéico concordam com BEKEDAN et al. (2006), segundo os quais os aminoácidos livres são facilmente transformados durante a torração devido a sua reatividade na reação de Maillard.

Os maiores teores de triptofano protéico em grãos crus e torrados de café robusta em relação aos grãos da espécie arábica encontrados neste estudo explicam o resultado semelhante para as bebidas, o que mostra que a composição da bebida esta diretamente relacionada com a composição química dos grãos a partir dos quais foram preparadas.

No entanto, os teores de triptofano protéico encontrados nos sólidos da bebida de café robusta (85,63 e 146,13 mg/100 g para café arábica e robusta, respectivamente) foram maiores que os teores deste composto nos grãos (65,84 e 72,80 mg/100 g para café arábica e robusta, respectivamente) utilizados para o preparo da bebida (figura 16).

Uma possível explicação é que o triptofano protéico tenha sido menos suscetível à degradação que outros compostos presentes na matriz do café, tendo assim sua proporção aumentada. Os resíduos hidrofóbicos de triptofano estão no interior da molécula, o que faz com que a conformação da proteína proporcione a este uma barreira estérica contra o ataque oxidativo (SIMAT & STEINHART, 1998). Por outro lado, aminoácidos hidrofílicos com grupos laterais amina ou amida são mais sensíveis à degradação, o que pode ser explicado pelo fato de que grupos ϵ -amino em aminoácidos são reativos e se envolvem em reações de escurecimento não enzimático durante o processamento térmico de alimentos (BEKEDAN et al., 2006). Outros componentes como polissacarídeos, lipídios e minerais também sofrem uma sensível redução do café torrado para a bebida (BELITZ & GROSH, 1997).

Na figura 16 também pode ser observado que a proporção do teor de triptofano protéico de café robusta para arábica é muito maior nos sólidos da bebida que nos grãos torrados.

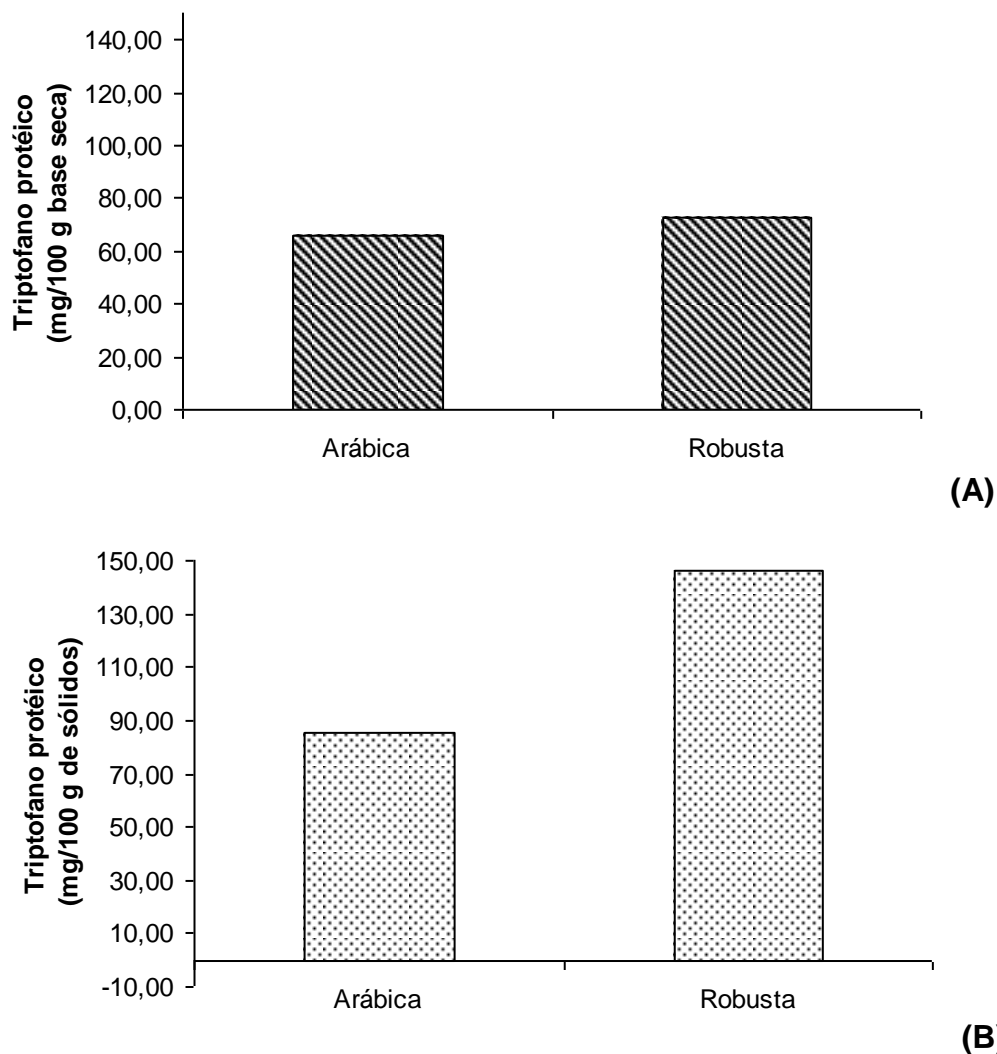


Figura 16 - Teores médios de triptofano protéico (A) em grãos submetidos a torração média e (B) nos sólidos totais das bebidas de cafés arábica e robusta.

Os resultados mostram que o triptofano está presente na bebida café, como triptofano protéico, na concentração de 28,1 a 49,5 $\mu\text{g/mL}$ da bebida, dependendo do blend de espécies utilizado. Segundo estes resultados uma xícara de café (50 mL) possui aproximadamente 1,4 a 2,5 mg de triptofano, e uma pessoa pode ingerir cerca de 4,2 a 7,5 mg de triptofano com consumo diário de três xícaras da bebida café. No entanto, é importante ressaltar que segundo COMAI et al. (2007), o valor nutricional não pode ser dependente apenas do conteúdo de triptofano, mas também da digestibilidade da proteína, da influência de fatores anti-nutricionais, e da razão de triptofano para os outros aminoácidos neutros.

5 CONCLUSOES

Foi otimizado um método para a separação e quantificação de triptofano e 5-HTP em corrida de 45 minutos e sistema em gradiente de eluição em fase móvel composta de tampão acetato 0,2mol/L e octano sulfonato 15 mM pH 4,9 e acetonitrila. Para a extração, melhores resultados foram obtidos com a utilização de metanol a 50% obtendo-se recuperações de 88,3 a 100 para o triptofano e 84,3 a 108,5 para 5-HTP. O método analítico proposto se mostrou seletivo, sensível, preciso e exato, e linear na faixa de 0,3 a 40 µg/mL, sendo adequado para a matriz de café.

O café robusta cru apresentou maiores teores de umidade que o arábica, e os teores de proteína foram semelhantes para as duas espécies. Não foi encontrado 5-HTP em ambos os cafés analisados. Foram encontrados maiores teores de triptofano total e protéico em café robusta, e o triptofano não-protéico foi encontrado em maior quantidade no café arábica.

O café robusta apresentou maiores perdas de peso que o arábica em todos os níveis de torração. Quanto às características de cor foi observada uma tendência de decréscimo de luminosidade, valores de a^* e b^* (CIE), saturação e tonalidade com o aumento da torração. Os teores de umidade e de proteína dos cafés torrados não diferiu entre os níveis de torração e entre as espécies. Não foram detectados 5-HTP e triptofano não-protéico nos grãos de café de ambas as espécies em nenhum nível de torração. Os teores de triptofano total foram semelhantes para as duas espécies, e apresentaram uma tendência de diminuição com o aumento do grau de torração. No entanto, o café arábica apresentou menores porcentagens de perda deste composto em todos os níveis de torração estudados.

A bebida de café robusta apresentou maiores valores de sólidos totais, concentração e extração, e também apresentou teor de nitrogênio total maior que a bebida de café arábica. Por outro lado, o teor de nitrogênio com relação aos sólidos das bebidas foi semelhante nas duas espécies. Não foram detectados 5-HTP e triptofano não-protéico nas bebidas de ambas as espécies de café. Os teores de triptofano total encontrados, referentes ao triptofano protéico, foram maiores para o café robusta, tanto em relação à bebida quanto em relação aos sólidos desta. Os teores de triptofano protéico encontrados nos sólidos da bebida foram maiores que nos grãos utilizados para o preparo da bebida. A proporção do teor de triptofano protéico de café robusta para o arábica também se mostrou maior nos sólidos da bebida que nos grãos torrados.

Portanto, apesar de não ter sido encontrado 5-HTP na bebida café, foi observada a presença de triptofano protéico na concentração de 28,1 a 49,5 µg/mL, o que demonstra que a bebida pode contribuir para o fornecimento deste aminoácido na dieta. No entanto, o aproveitamento deste aminoácido como precursor da serotonina ainda depende da digestibilidade da proteína e da razão de triptofano para os outros aminoácidos neutros.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIC (Associação Brasileira da Indústria de Café). *Estatísticas: Desempenho da Indústria de Café no período de Maio de 2005 a Abril de 2006*. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/estatisticas.html>>. Agosto, 2006.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). NBR ISSO/IEC 17025. *Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração*. 20 p. 2001.
- ADAMS, A.; BORRELLI, R.C.; FOGLIANO, V.; DE KIMPE, N. Thermal degradation studies of food melanoidins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 53, n. 10, p. 4136-4142, 2005.
- ADRIEN, J. Neurobiological bases for the relation between sleep and depression. *Sleep Medicine Reviews*, v. 6, n. 5, p. 341-351, 2002.
- AFONSO JÚNIOR, P.C.; CORRÊA, P.C.; GONELI, A.L.D.; VILARINHO, M.C.; FRANÇA, A.S. Dinâmica da contração volumétrica do fruto de café durante o processo de secagem. *Revista Brasileira de Armazenamento*, n. 8, p. 29-35, 2004.
- ALEGRÍA, A.; BARBERFI, R.; FARRO, R.; FERREROS, M.; LAGARDA, MJ; LOPEZ, J.C. Isocratic HPLC determination of tryptophan in infant formulas. *Journal of Chromatography A*, v. 721, p. 83-88, 1996.
- ANDUEZA, S.; DE PEÑA, M.P.; CID, C. Chemical and sensorial characteristics of espresso coffee as affected by grinding and torrefacto roast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 7034-7039, 2003.
- ANDUEZA, S.; VILA, M.; de PEÑA, M.P.; CID, C. Influence of coffee/water ratio on the final quality of espresso coffee. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 87, p. 586-592, 2007.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemist). *Official methods of analysis*. 16 ed. Washington: AOAC, 1995.
- APONTE, R.L.; DÍAZ, J.A.; PERERA, A.A.; DÍAZ, V.G. Simple thin layer chromatographic method with fiber optic remote sensor for fluorimetric quantification of tryptophan and related metabolites. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, v. 19, n. 5, p. 687-698, 1996.

- ARNERI, S.P.; GOODALE, D.B.; FLYNN, J.R.; LONG, J.P. Rapid and simple analysis of DOPA and 5-HTP using high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Brain Research Bulletin*, v. 6, n. 5, p. 407-411, 1981.
- ARNOLD, U.; LUDWIG, E.; KÜHN, R.; MÖSCHWITZER, U. Analysis of free amino acids in green coffee beans. I. Determination of amino acids after pre-column derivatization using 9-fluorenylmethylchloroformate. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, v. 199, p. 22-25, 1994.
- ARNOLD, U.; LUDWIG, E. Analysis of free amino acid in green coffee beans. II. Changes of the amino acid content in arabica coffees in connection with post-harvest model treatment. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, v. 203, p. 379-384, 1996.
- BABU, S.K.; RAMAKRISHNA, T.; SUBBARAJU, G.V. HPLC estimation of 5-hydroxytryptophan in *Griffonia simplicifolia* extracts. *Asian Journal of Chemistry*, v. 17, n. 1, p. 506-510, 2005.
- BÁRTHOLO, G.F.; FILHO, A.R.M.; GUIMARÃES, P.T.G.; CHALFOUN, S.M. Cuidados na colheita, no preparo e no armazenamento do café. *Informe Agropecuário*, v. 14, n. 162, p. 33-34, 1989.
- BÁRTHOLO, G.F.; GUIMARÃES, P.T.G. Cuidado na colheita e preparo do café. *Informe Agropecuário*, v. 18, n. 187, p. 33-42, 1997.
- BEKEDAN, E.K.; SCHOLS, H.A.; VAN BOEKEL, M.A.J.S.; SMIT, G. High molecular weight melanoidins from coffee brew. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 54, n. 20, p. 7658-7666, 2006.
- BELITZ, H.D.; GROSH, W. *Química de los alimentos*. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 1997. 1087 p.
- BIRDSALL, T.C. 5-Hydroxytryptophan: a clinically-effective serotonin precursor. *Alternative Medicine Review*, v. 3, n. 2, p. 271-280, 1998.
- BORELLI, R.C.; VISCONTI, A.; MENNELLA, C.; ANESE, M.; FOGLIANO, V. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 50, p. 6527-6533, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Agronegócio brasileiro: uma oportunidade de investimento*. Disponível em: <www.agricultura.gov.br> 23 Nov. 2004. Acessado em: 23 Mai. 2006.
- BYTOF, G.; KNOPP, S.E.; SHIEBERLE, P.; TEUTSH, I.; SELMAR, D. Influence of processing on the generation of γ -aminobutyric acid in green coffee beans. *European Food Research Technology*, v. 220, p. 245-250, 2005.

- CARVALHO, V.D.; CHAGAS, S.R.J.; SOUZA, S.M.C. Fatores que afetam a qualidade do café. *Informe Agropecuário*, v. 18, n. 187, p. 5-20, 1997.
- CARVALHO JÚNIOR, C. *Efeito de sistemas de colheita na qualidade do café (Coffea arabica L.)*. Lavras: Escola Superior de Agricultura da UFLA. 2002. 140 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- 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 on their amino acid enantiomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 6495-6501, 2003.
- CASAL, S.; MENDES, E.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; FERREIRA, M.A. Roast effects on coffee amino acid enantiomers. *Food Chemistry*, v. 89, p. 333-340, 2005.
- CHAN, K.C.; MUSCHIK, G.M.; ISSAQ, H.J. Separation of tryptophan and related indoles by micellar electrokinetic chromatography with KrF laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, v. 718, p. 203-210, 1995.
- CIRILO, M.P.G; COELHO, A.F.S.; ARAÚJO, C.M.; GONÇALVES, F.R.B.; NOGUEIRA, F.D.; GLÓRIA, M.B.A. Profile and levels of bioactive amines in green and roasted coffee. *Food Chemistry*, v. 82, p. 397-402, 2003.
- CLARKE, R.J. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*; CABALLERO, B.; TRUGO, L.C.; FINGLAS, P.; eds. Academic Press: London, v. 3, 2003. 1486 p.
- CLIFFORD, M.N.; WILLSON, K.C. Coffee – Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage. *Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products*. London: Croom Helm, 1985. 461p.
- CODEX ALIMENTARIUS. Volume 3. *Resíduos de medicamentos veterinários em los alimentos*. 2 ed. Roma. 1993.
- COELHO, K.F. *Avaliação química e sensorial da qualidade do café de bebida estritamente mole após a inclusão de grãos defeituosos*. Lavras: Escola Superior de Agricultura da UFLA. 2000. 96 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- COELHO, K.F.; PEREIRA, R.G.F.A. Influência de grãos defeituosos em algumas características químicas do café cru e torrado. *Ciências Agrotécnicas*, v. 26, n. 2, p. 375-384, 2002.
- COMAI, S.; BERTAZZO, A.; BAILONI, L.; ZANCATO, M.; COSTA, C.V.L.; ALLEGRI, G. The content of proteic and nonproteic (free and protein-bound) tryptophan in quinoa and cereal flours. *Food Chemistry*, n. 100, p. 1350-1355, 2007a.

- COMAI, S.; BERTAZZO, A; BAILONI, L.; ZANCATO, M.; COSTA, C.V.L.; ALLEGRI, G.
Protein and non-protein (free and protein-bound) tryptophan in legume seeds.
Food Chemistry, v.103, p.657-661, 2007b.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). *Terceira Previsão da Safra de Café 2006/2007*. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php>>. Consultado em 01 dez. 2007.
- DA PORTO, C.; NICOLI, M. C.; SEVERINI, C.; SENSIDONI, A.; LERICI, C.R. Study on physical and physicochemical changes in coffee beans during roasting. *Italian Journal of Food Science*, v. , p.197-207, 1991.
- DAS, Y.T.; BAGCHI, M.; BAGCHI, D.; PREUSS, H.G. Safety of 5-hydroxy-L-tryptophan. *Toxicology Letters*, v. 150, p.111-122, 2004.
- DE CASTRO, R.D.; MARRACCINI, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 18, n. 1, p. 175-199, 2006.
- DELGADO-ANDRADE, C.; RUFÍAN-HENARES, J.A.; JIMÉNEZ-PÉREZ, S.; MORALES, F.J. Tryptophan determination in milk-based ingredients and dried sport supplements by liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Chemistry*, v. 98, p. 580-585, 2006.
- DELHAYNE, S.; LANDRY, J. High-performance liquid chromatography and ultraviolet spectrophotometry for quantitation of tryptophan in barytic hydrolysates. *Analytical Biochemistry*, v. 159, n. 1, p. 175-178, 1986.
- DÓREA, J.G.; DA COSTA, T.H.M. Is coffee a functional food? *British Journal of Nutrition*, v. 93, p. 773-782, 2005.
- DOS SANTOS, M.H.; BATISTA, B.L.; DUARTE, S.M.S.; DE ABREU, C.M.P.; GOUVÊA, C.M.C.P. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p. 604-610, 2007.
- DREUX, C.; BOUSQUET, B. Determination of OH-5-tryptophan by chromatofluorimetry in carcinoid tumors. *Acta Vitaminologica et Enzymologica*, v. 29, n. 1-6, p. 32-34, 1975.
- DUTRA, E.R. *Avaliação da viabilidade de determinação do grau de torrefação de café por meio da composição de voláteis no efluente gasoso do processo*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2000. 84 p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Química).

- EMBRAPA CAFÉ (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Café). *Histórico*. Consultado em: 01 nov, 2007. Disponível em: <<http://www22.sede.embrapa.br/cafe/unidade/historico.htm>>.
- EURACHEM. *The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics*, 1998. 61 p.
- FÁBIAN, V.; PINTÉR-SZAKÁCS, M.; MOLNÁR-PERL, L. Gas chromatography of tryptophan together with other amino acids in hydrochloric acid hydrolysates. *Journal of Chromatography A*, v. 520, p. 193-199, 1990.
- FERNANDES, S.M.; PINTO, N.A.V.D.; THÉ, P.M.P.; PEREIRA, R.G.F.A.; DE CARVALHO, V.D. Teores de polifenóis, ácido clorogênico, cafeína e proteína em café torrado. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 7, n. 3, p. 197-199, 2001.
- FERNANDES, S.M.; PINTO, N.A.V.D.; PEREIRA, R.G.F.A.; DE CARVALHO, V.D. Comparação entre duas cooperativas do sul de Minas Gerais quanto à composição química de cafés com torração comercial. *Ciências Agrotécnicas*, v. 26, n. 4, p. 830-835, 2002.
- FERNANDES, S.M.; PEREIRA, R.G.F.A.; MELO, W.C.; MENDONÇA, L.M.V.L.; NERY, F.C. Avaliação da composição química do café torrado e moído durante o armazenamento. *Revista Brasileira de Armazenamento, Especial Café*, n. 7, p. 114-121, 2003a.
- FERNANDES, S.M.; PEREIRA, R.G.F.A.; PINTO, N.A.V.D.; NERY, M.C.; DE PÁDUA, F.R.M. Constituintes químicos e teor de extrato aquoso de cafés arábica (*Coffea arabica* L.) e conilon (*Coffea canephora* Pierre) torrados. *Ciências Agrotécnicas*, v. 27, n. 5, p. 1076-1081, 2003b.
- FLORES, G.B.; ANDRADE, F.; LIMA, D.R. Can coffee help fighting the drug problem? Preliminary results of a Brazilian youth drug study. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 21, n. 12, p. 1059-1070, 2000.
- FRANÇA, A. S.; OLIVEIRA, L. S., VITORINO, M. D. Efeito da taxa de aquecimento na evolução na evolução da perda de massa e teor de umidade de grãos de café durante a torra. *Revista Brasileira de Armazenamento*, v. 4, p. 26-31, 2002.
- FRIEDMAN, M. Food browning and its prevention: An overview. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 44, p. 631-653, 1996.
- FRIEDMAN, M.; CUQ, J.L. Chemistry, analysis, nutritional value, and toxicology of tryptophan in food. A review. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 36, p. 1079-1093, 1988.

- FUJINO, K.; YOSHITAKE, T.; KEHR, J.; NOHTA, H.; YAMAGUSHI, M. Simultaneous determination of 5-hydroxyindoles and catechols by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine and 1,2-diphenylethylenediamine. *Journal of Chromatography A*, n. 1012, p. 169–177, 2003.
- GIEDKE, H. On the role of serotonin in sleep regulation and depression. A commentary on "Neurobiological bases for the relation between sleep and depression" (J. ADRIEN). *Sleep Medicine Reviews*, v. 7, n. 1, p. 101-102, 2003.
- GIRANDA, R.N. *Aspectos qualitativos de cafés (Coffea arabica L.) submetidos a diferentes processos de secagem*. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1998. 83 p. (Dissertação, Mestrado em Ciências dos Alimentos).
- GOIHL, J. Tryptophan can lower aggressive behavior. *Feedstuffs*, v. 78, n. 9, p. 12-22, 2006.
- GÓMEZ-RUIZ, J.A.; LEAKE, D.S.; AMES, J.M. In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 55, p. 6962-6969, 2007.
- HAMER, M. Coffee and health: explaining conflict results in hypertension. *Journal of Human Hypertension*, v. 20, p. 909-912, 2006.
- HARDOIM, P.R.; BORÉM, F.M.; DE ANDRADE, E.T. Cinética de secagem do café cereja, bóia e cereja desmucilado, em quatro diferentes tipos de terreno. *Revista Brasileira de Armazenamento, Especial Café*, n. 7, p. 37-43, 2003.
- HECHT, C.; BIELER, S.; GRIEHL, C. Liquid chromatographic-mass spectrometric-analyses of anaerobe protein degradation products. *Journal of Chromatography A*, v. 1088, p. 121-125, 2005.
- HERTZMAN, P.A.; BLEVINS, W.L.; MAYER, J.; MAYER, J.; GREENFIELD, B.; TING, M.; GLEICH, G.J. Association of the eosinophilia-myalgia syndrome with the ingestion of tryptophan. *The New England Journal of Medicine*, v. 322, p. 869-873, 1990.
- ICH. *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of Analytical Procedures*. Geneve, 1996.
- ILEV, I.; TCHORBANOV, B. Determination of tryptophan in hydrolysates and fermentation media using gel chromatography. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 16, p. 29-33, 1992.

- ISHIDA, J.; IIZUKA, R.; YAMAGUSHI, M. High-performance liquid chromatographic determination of 5-hydroxyindoles by post-column fluorescence derivatization. *Analyst*, v. 118, p. 165–169, 1993.
- ISO (International Standard Organization). *General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories*, ISO/IEC 17025, 2001.
- JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. I General concepts and guidelines. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 19, p. 719-736, 1996.
- KATZUNG, B.G.; JULIUS, D.J. Histamina, serotonina e os alcalóides do esporão do centeio. In: KATZUNG, B.G. (Ed) *Farmacologia Básica & Clínica*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 233-256.
- KAWACHI, I.; WILLET, W.C.; COLDITZ, G.A.; STAMPFER, M.J.; SPEITZER, F.E. A prospective study of coffee drinking and suicide in women. *Archives of Internal Medicine*, v. 11, p. 521-525, 1996.
- KEMA, I.D.; VRIES, E.G.E.; MUSKIET, A.J. Review: Clinical chemistry of serotonin and metabolites. *Journal of Chromatography B*, v. 747, p. 33–48, 2000.
- KILTS, C.D.; BERO, L.A. Quantitative determination of 5-hydroxytryptophan in dissected brain regions by one-line trace enrichment HPLC with electrochemical detection. *Life Sciences*, v. 35, n. 1, p. 87-95, 1984.
- KLATSKY, A.L.; ARMSTRONG, M.A.; FRIEDMAN, G.D. Coffee, tea and mortality. *Annals of Epidemiology*, v. 3, p. 375-381, 1993.
- KLATSKY, A.L.; MORTON, C.; UDALTSOVA, N.; FRIEDMAN, G.D. Coffee, cirrhosis, and transaminase enzymes. *Archives of Internal Medicine*, v. 166, p. 1190-1195, 2006.
- KLEEBERG, K.K.; VAN WICKERN, B.; SIMAT, T.J.; STEINHART, H. Determination of hydroxytryptophan isomers in γ -irradiated egg white, chicken meat, and shrimps. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 467, p. 685-691, 2000.
- KOOPMANS, S.J.; GUZIK, A.C.; VAN DER MEULEN, J.; DEKKER, R.; KOGUT, J.; KERR, B.J.; SOUTHERN, L.L. Effects of supplemental L-tryptophan on serotonin, cortisol, intestinal integrity, and behavior in weanling piglets. *Journal of Animal Science*, v. 84, n. 4, p. 963-969, 2006.
- KOPPISETTI, G.; SIRIKI, A.; SUKALA, K.; SUBBARAJU, G.V. Estimation of L-5-hydroxytryptophan in rat serum and Griffonia seed extracts by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 549, p. 129-133, 2005.

- KUMAR, A.M.; FERNANDEZ, J.B.; SCHNEIDERMAN, N.; GOODKIN, K.; EISDORFER, C.; KUMAR, M. Simultaneous determination of 5-hydroxytryptamine, 5-hydroxytryptophan, 5-hydroxyindolacetic acid, dopamine, and homovanillic acid in whole blood, using isocratic HPLC with electrochemical detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 22, n. 14, p. 2211-2223, 1999.
- LANÇAS, F.M. *Validação de métodos cromatográficos de análise*. São Carlos: Editora Rima, 2004. 62 p.
- LANDRY, J.; DELHAYE, S. Simplified procedure for the determination of tryptophan of foods and feedstuffs from barytic hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 40, p. 776-779, 1992.
- LEMAIRE, P.A.; ADOSKARU, R.K. An HPLC method for the direct assay of the serotonin precursor, 5-hydroxytryptophan, in seeds of *Griffonia simplicifolia*. *Phytochemical Analysis*, v. 13, p. 333-337, 2002.
- LIMA, U.A. Bebidas estimulantes – café. In: VENTURINI FILHO, W.G. (Ed.) *Tecnologia de Bebidas*. São Paulo: Edgard Blucher, 2005. p. 119-124.
- LIU, T.Y.; CHANG, Y.H. Hidrolysis of proteins with it p-toluenesulfonic acid. *Journal of Biological Chemistry*, v. 246, p. 2842-2848, 1971.
- LOPES, L.M.V. *Avaliação da qualidade de grãos crus e torrados de cultivares de cafeeiro (Coffea arábia L.)*. Lavras: UFLA, 2000, 95p. (Dissertação, Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- LÓPEZ-GALILEA, I.; DE PEÑA, M.P.; CID, C. Correlation of selected constituents with the total antioxidant capacity of coffee beverages: influence of the brewing procedure. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 55, p. 6110-6117, 2007.
- LUDWIG, E.; LIPKE, U.; RACZEK, U.; JÄGER, A. Investigations of peptides and proteases in green coffee beans. *European Food Research Technology*, v. 211, p. 111-116, 2000.
- MAGNUSSEN, I.E.; NIELSEN-KUDSK, F. Bioavailability and related pharmacokinetics in man of orally administered L-5-hydroxytryptophan in a steady state. *Acta of Pharmacology and Toxicology*, v. 46, p. 257-262, 1980.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). *Regulamento técnico de identidade e de qualidade para a classificação do café beneficiado grão cru*. Instrução Normativa n. 08, 2003.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). *1727-2007, 280 anos, Introdução do café no Brasil: Informe estatístico do café*. Agosto, 2007. 17 p.

- MARKLOVÁ, E.; MAKOVIC'KOVÁ, H.; KRÁKOROVA, I. Screening for defects in tryptophan metabolism. *Journal of Chromatography A*, v. 870, p. 289-293, 2000.
- MARTÍN, M.J.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, G. Discrimination between arabica and robusta green coffee varieties according to their chemical composition. *Talanta*, v. 46, p. 1259-1264, 1998.
- MATTIVI, F.; VRHOVSEK, U.; VERSINI, G. Determination of indole-3-acetic acid, tryptophan and other indoles in must and wine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, v. 855, p. 227-235, 1999.
- MAZZAFERA, P. Chemical composition of defective coffee beans. *Food Chemistry*, v. 64, p. 547-554, 1999.
- MAZZAFERA, P.; SHIMIZU, M.M. Compositional changes of proteins and amino acids in germinating coffee seeds. *Brasílian Archives of Biology and Technology*, v. 43, p. 259-265, 2000.
- MELO, B.; BÁRTHOLO, G.F.; MENDES, A.N.G. Café: variedades e cultivares. *Informe Agropecuário*, v. 19, n. 193, p. 92-96, 1998.
- MENDONÇA, L.M.V.L.; PEREIRA, R.G.F.A.; MENDES, A.N.G. Parâmetros bromatológicos de grãos crus e torrados de cultivares de café (*Coffea arabica* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 2, p. 239-243, 2005.
- MÓLNAR-PERL, I. Tryptophan analysis in peptides and proteins, mainly by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 763, p. 1-10, 1997.
- MONTAVON, P; MAURON, A. F.; DURUZ, E. Changes in green coffee profiles during roasting. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 51, n.8, p.2335-2343, 2003.
- MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. Recovery of tryptophan in peptides and proteins by high-temperature and short-term acid hydrolysis in the presence of phenol. *Analytical Biochemistry*, v. 189, p. 223-230, 1990.
- MURKOVIC, M.; DERLER, K. Analysis of amino acids and carbohydrates in green coffee. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 69, p. 25–32, 2006.
- NAGAJARA, P.; YATHIRAJAN, H.S.; VASANTHA, R.A. Highly sensitive reaction of tryptophan with *p*-phenylenediamine. *Analytical Biochemistry*, v. 312, p. 157-161, 2003.
- NAGATSU, T. Application of high performance liquid chromatography to the study of biogenic amine-related enzymes. *Journal of Chromatography*, v. 566, n. 2, p. 287-307, 1991.

- NAKAZAWA, M.; MANABE, K. The direct hydrolysis of proteins containing tryptophan on polyvinylidene difluoride membranes by mercaptoethanesulfonic acid in the vapour phase. *Analytical Biochemistry*, v. 206, p. 105-108, 1992.
- NEHLIG, A.; DAVAL, J.L.; DEBRY, G. Caffeine and the central nervous system: mechanism of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research*, v. 17, p. 139-170, 1992.
- NEHRING, U.P.; MAIER, H.G. Indirect determination of the degree of roast in coffee. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, v.195, p. 39-42, 1992.
- NG, L.T.; PASCAUD, A.; PASCAUD, M. Hydrochloric acid hydrolysis of proteins and determination of tryptophan by reversed phase high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, v. 167, p. 47-52, 1987.
- NIELSEN, H.K.; HURRELL, R.F. Tryptophan determination of food proteins by HPLC after alkaline hydrolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 36, p. 893-907, 1985.
- OBA, S.; SHIMIZU, N.; NAGATA, C.; SHIMIZU, H.; KAMETANI, M.; TAKEYAMA, N.; OHNUMA, T.; MATSUSHITA, S. The relationship between the consumption of meat, fat, and coffee and the risk of colon cancer: A prospective study in Japan. *Cancer Letters*, v. 244, p. 260-267, 2006.
- OHFUJI, S.; FUKUSHIMA, W.; TANAKA, T.; HABU, D.; TAMORI, A.; SAKAGUSHI, H.; TAKEDA, T.; KAWADA, N.; SEKI, S.; NISHIGUSHI, S.; SHIOMI, S.; HIROTA, Y. Coffee consumption and reduced risk of hepatocellular carcinoma among patients with chronic type C liver disease: A case-control study. *Hepatology Research*, v. 36, p. 201-208, 2006.
- OLIVEIRA, S.D. *Caracterização físico-química e teor de aminas bioativas em café cru e torrado*. Belo Horizonte: Universidade federal de Minas Gerais, 2004. 109 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- PENKE, B.; FERECZI, R.; KOVACS, K. A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins. *Analytical Biochemistry*, v. 60, p. 45-50, 1974.
- PEREIRA, R.G.F.A. *Efeito da inclusão de grãos defeituosos na composição química e qualidade do café (Coffea arabica L.) "estritamente mole"*. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1997. 96 p. (Tese, Doutorado em Ciências dos Alimentos).
- PIMENTA, C.J. *Qualidade do café (Coffea arabica L.) originado de frutos colhidos em quatro estádios de maturação*. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1995. 94 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência dos Alimentos).

- PINTER-SZAKACS, M.; MOLNAR-PERL, I. Determination of tryptophan in unhydrolyzed food and feedstuffs by the acid ninhydrin method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 38, p. 720-726, 1990.
- PINTO, N.A.V.D.; FERNANDES, S.M.; GIRANDA, R.N.; PEREIRA, R.G.F.A.; DE CARVALHO, V.D. Avaliação de componentes químicos de padrões de bebida para o preparo do café expresso. *Ciências Agrotécnicas*, v. 26, n. 4, p. 826-829, 2002.
- PORTUGAL. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Decreto-Lei nº 214/2001. Estabelece métodos analíticos para determinar a quantidade de vitaminas A e E, e triptofano em alimentos. Diário da República nº 178 (I-A), 2 ag. 2001, p. 4705-4715.
- POTTER, N.N.; HOTCHKISS, J.H. *Food Science*. 5 ed. New York: Chapman & Hall, 1995. 608 p.
- PRESITS, P.; MÓLNAR-PERL, I. HPLC of tryptophan and its metabolites using simultaneously UV, native fluorescence and pre-column fluorescence derivatization. *Chromatographia Supplement*, v. 57, p. 87-92, 2003.
- RAMALAKSHMI, K.; KUBRA, I.R.; RAO, L.J.M. Physicochemical characteristics of green coffee: comparison of graded and defective beans. *Journal of Food Science*, v. 72, n. 5, p. 333-337, 2007.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. *Outros mediadores periféricos: 5-hidroxitriptamina e purinas*. In: RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. (Ed.) *Farmacologia*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p. 139-141.
- RAVINDRAN, G.; BRYDEN, W.L. Tryptophan determination in proteins and feedstuffs by ion exchange chromatography. *Food Chemistry*, v. 89, p. 309-314, 2005.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- ROALES-NIETO, J.G.; PEDRO, E.M.S.; LUCIANO, A.G.; CORONADO, J.L.B. Efectos del consumo de café para la salud cardiovascular, la diabetes y el desarrollo de câncer. *Psicothema*, v. 16, n. 4, p. 531-547, 2004.
- ROSS, W.G.; ABBOTT, R.D.; PETROVITCH, H.; MORENS, D.M.; GRANDINETTI, A.; TUNG, K.; TANNER, C. M.; MASAKI, K. H.; BLANCHETTE, P.L.; CURB, J. D.; POPPER, J. S.; WHITE, L. R. Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson Disease. *JAMA*, v. 283, p. 2674-2679, 2000.

- ROSSI, L.; TIRAPEGUI, J. Implicações do sistema serotoninérgico no exercício físico. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 48, n. 2, p. 227-233, 2004.
- ROSSI, L.; TIRAPEGUI, J. Serotonina e a neuromodulação alimentar. *Revista Nutrição em Pauta*, ano XIII, n. 72, p. 38-40, 2005.
- SANTOS, R.M.; VIEIRA, S.; LIMA, D.R. Effects of coffee in alcoholics. *Annals of Internal Medicine*, v. 115, p. 499, 1991.
- SASTRY, C.S.P.; TUMMURU, M.K. Spectrophotometric determination of tryptophan in proteins. *Journal of Food Science and Technology*, v. 22, p. 146-147, 1985.
- SERVILLO, L.; COLONNA, G.; BALESTRIERI, C.; RAGONE, R.; IRACE, G. Simultaneous determination of tyrosine and tryptophan residues in proteins by second-derivative spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, v. 126, p. 251-257, 1982.
- SHIMODA, H.; SEKI, E.; AITANI, M. Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, mar., p. 6-9, 2006.
- SILVA, J.S. *Colheita, secagem e armazenagem do café*. In: I Encontro sobre Produção de Café com Qualidade, Viçosa, MG, *Anais...* Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, 1999, p. 39-80.
- SIMAT, T.J.; STEINHART, H. Oxidation of free tryptophan and tryptophan residues in peptides and proteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, n. 46, p. 490-498, 1998.
- SINDICAFESP (Sindicato da Indústria do Café do estado de São Paulo). *OIC estima produção mundial de café e 121 milhões de sacas*. Disponível em: <http://www.sindicafesp.com.br/nota_safra_mar06.html>. Mar. 2006.
- SIVETZ, M. Chemical properties of coffee. *Coffee processing Technology*, Westport, v. 2, p. 162-186, 1963.
- SIVETZ, M.; FOOTE, H.E. *Coffee Processing Technology*, v. 1. Westport: AVI, 1963.
- SKOG, O.J. Studying cultural change: Were the changes in alcohol and coffee consumption in the nineteenth century a case of beverage substitution? *Acta Sociologica*, v. 49, n. 3, p. 287-302, 2006.
- SOUZA, S.V.C.; SILVA, G.; DINIZ, M.H.G.M. Determinação de resíduos de nitrofurazona, furazolidona e nicarbazina em tecidos de origem animal. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, n. 1, p. 34-38, 2001.

- SOUZA, S.V.C.; BRITTO, R.B. *Validação de métodos: aplicação em análises de resíduos em alimentos*. In: Encontro para a Qualidade de Laboratórios. Anais... São Paulo: REMESP. p. 155-163, 2002.
- STARK, H. Kaffee gegen Morbus Parkinson. *Pharmazie in unserer Zeit*, v. 35, n. 3, p. 188-888, 2006.
- SUMMA, C.A.; DE LA CALLE, B.; BROHEE, M.; STADLER, R.H.; ANKLAM, E. Impact of the roasting degree of coffee on the *in vitro* radical scavenging capacity and content of acrylamide. *LWT- Food Science and Technology*, v. 40, p. 1849-1854, 2007.
- SUNDERS-BUSH, E.; MAYER, S.E. 5-Hydroxytryptamine (serotonin): receptor agonists and antagonists. In: HARDMAN, J.G & LIMBIRD, L.E. (Ed.). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10 ed. New York:: McGraw-Hill, 2001.
- TAKAGAI, Y.; IGARASHI, S. Determination of ppb levels of tryptophan derivatives by capillary electrophoresis with homogeneous liquid-liquid extraction and sweeping method. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 51, n. 4, p. 373-377, 2003.
- TAKEDA, E.; TERAOKA, J.; NAKAYA, Y.; MIYAMOTO, K.; BABA, Y.; CHUMAN, H.; KAJI, R.; OHMORI, T.; ROKUTAN, K. Stress control and human nutrition. *The Journal of Medical Investigation*, v. 51, p.139-145, 2004.
- TEFF, K.L; YOUNG, S.N. The effect of carbohydrate and protein administration on amino acids in the pancreas, brain, intestine, and plasma of the rat. *Nutritional Biochemistry*, v. 6, p. 564-569, 1995.
- TEIXEIRA, A.A. *Classificação do café*. In: I Encontro sobre Produção de Café com Qualidade, Viçosa, MG. Anais... Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, 1999, p. 81-95.
- TVERDAL, A.; SKURTVEIT, S. Coffee intake and mortality from liver cirrhosis. *Annals of Epidemiology*, v. 13, p. 419-423, 2003.
- VAN DAM, R.M.; WILLHIT, W.C.; MANSON, J.E.; HU, F.B. Coffee, caffeine, and risk of type 2 diabetes: A prospective cohort study in younger and middle-aged U.S. women. *Diabetes Care*, v. 29, p. 398-403, 2006.
- VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. Café. IN: VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. *Bebidas: tecnologia, química y microbiología*. Espanha: Acribia, 1997. p. 197-263.
- VILELA, E.R. Secagem e qualidade do café. *Informe Agropecuário*, v. 18, n. 187, p. 53-63, 1997.
- VITORINO, P.F.P.G.; ALVES, J.D.; CHAGAS, S.J.R.; BARTHOLLO, G.F. *Seria a atividade da polifenoloxidase um bom indicador da qualidade da bebida café?* In:

- Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2, 2001, Vitória, *Simpósio...* p. 1019-1024.
- WHO. World Health Organization Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. 32nd report, WHO Technical Report Series, No.823, Geneva, 1992.
- WISE, D.D.; SHEAR, J.B. Quantitation of nicotinamide and serotonin derivatives and detection of flavins in neuronal extracts using capillary electrophoresis with multiphoton-excited fluorescence. *Journal of Chromatography A*, v. 1111, p. 153–158, 2006.
- WOODWARD, M.; TUNSTALL-PEDOE, H. Coffee and tea consumption in the Scottish Heart Health Study Follow up: conflicting relations with coronary risk factors, coronary disease, and all cause mortality. *Journal of Epidemiologic Community Health*, v. 53, p. 481-487, 1999.
- WURTMAN, R.J.; HEFTI, F.; MELAMED, E. Precursor control of neurotransmitter synthesis. *Pharmacological Reviews*, v. 32, p. 315-335, 1981.
- YEN, W.J.; WANG, B.S.; CHANG, L.W.; DUH, P.D. Antioxidant properties of roasted coffee residues. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 53, p. 2658-2663, 2005.
- YI, Y.; LIAO, W.; ZHAO, Q.; LU, X. Separation and detection of tryptophan metabolites in biological samples. *Chinese Journal of Chromatography*, v. 17, n. 2, p. 158-161, 1999.
- YUST, M.M.; PEDROCHE, J.; GIRÓN-CALLE, J.; VIOQUE, J.; MILLÁM, F.; ALAIZ, M. Determination of tryptophan by high-performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection. *Food Chemistry*, v. 85, p. 317-320, 2004.